

Aus dem Institut für Pathologie
am Klinikum Augsburg
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. Bruno Märkl)

Tumor Budding, uPA und PAI-1 im Kolorektalen Karzinom: Update und Validierung einer prospektiven Studie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simon Franz
aus
Augsburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Bruno Märkl

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Frank Kolligs

Prof. Dr. med. Andreas Jung

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

19.03.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Definition	4
1.2	Epidemiologie	4
1.3	Ätiologie	4
1.4	Pathogenese	5
1.4.1	Adenom-Karzinom-Sequenz.	5
1.4.2	Serratierter Karzinogeneseweg	5
1.4.3	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)	7
1.4.4	Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP).	8
1.5	Diagnostik	9
1.5.1	Anamnese	9
1.5.2	Endoskopische Verfahren	9
1.5.3	Stuhltests	9
1.5.4	Radiologische Verfahren	10
1.5.5	Ergänzende Diagnostik	10
1.6	Therapie	10
1.6.1	Präoperative Diagnostik	10
1.6.2	Operation	11
1.6.3	Radio- und Chemotherapie	13
1.7	Pathologie	15
1.7.1	TNM-Klassifikation	15
1.7.2	Staging nach Dukes	18
1.7.3	Infiltrationstyp nach Jass	19
1.7.4	Zusatzdiagnostik	20
1.8	Prognose	21
1.8.1	Überlebensraten in Abhängigkeit vom Tumorstadium	21
1.8.2	Tumor Budding	21
1.8.3	Lymphknoten	23
1.8.4	Plasminogenaktivatorsystem	23

1.8.5	Weitere Prognosefaktoren	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Zielsetzung	26
2.2	Studienaufbau	27
2.2.1	Patientenkollektive	27
2.2.2	Follow-up	28
2.2.3	Probenvorbereitung	28
2.2.4	Histologie	29
2.2.5	Labor Assays	29
2.2.6	Tumor Budding, Immunhistochemie und Entzündungsscores . . .	30
2.2.7	Statistik	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Test-Set: Patienten und Follow-up	32
3.2	Test-Set: Krankheitsspezifisches Überleben (CSS)	32
3.3	Validierungs-Set: Patienten und Korrelation zwischen uPA, PAI-1 und Tu- mor Budding	35
3.4	Validierungs-Set: Proteasen-Level und Tumor Budding entsprechend an- derer histopathologischer Faktoren	42
3.5	Gepoolte Daten	53
4	Diskussion	55
5	Danksagung	71
6	Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Definition

Als Grenzmarke zwischen Kolon- und Rektumkarzinom gilt in Europa ein Abstand von 16 cm zwischen der Linea Anokutanea und dem distalen Tumorrand, der mit dem starren Rektoskop gemessen wird.

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des Kolorektalen Karzinoms liegt in Europa zwischen weniger als 20 Fällen pro 100.000 Einwohnern in Griechenland und mehr als 40 Fällen pro 100.000 Einwohnern in Deutschland. Im Jahr 2000 wurden in Deutschland insgesamt 28.696 Fälle von Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom verstorben sind, registriert. [1]. Damit ist es die zweithäufigste krebbsbedingte Todesursache bei Männern nach dem Lungenkarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom. 90 % der kolorektalen Karzinome treten bei Patienten, die älter als 50 Jahre sind, nur selten treten Fälle vor dem 40. Lebensjahr auf. Die Inzidenz verdoppelt sich bei den Personen, die älter als 40 Jahre sind etwa alle 10 Jahre [2], das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 70 Jahren [3].

Das Karzinomrisiko zeigt Tabelle 1.1.

Die Lokalisationshäufigkeit des kolorektalen Karzinoms steigt nach distal an, im Zökum und Kolon ascendens sowie im Kolon transversum und Kolon descendens jeweils 10%, im Sigmoid 30% und im Rektum 50% [4].

1.3 Ätiologie

Genetische Faktoren spielen nur bei 10% der Fälle eine Rolle. Wichtig sind hier die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), eine obligate Präkanzerose das hereditäre, nichtpolyposöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCCS, Lynch-Syndrom) und kolorektale Karzinome in der Familienanamnese.

Ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, Übergewicht, Alkohol- und Niko-

Tabelle 1.1: Risikogruppen für kolorektale Karzinome [3]

Risikogruppe/-erkrankung	Risiko
Morbus Crohn	3%
Colitis ulcerosa	20%
Zustand nach Ureterosigmoidostomie	10%
hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)	60%
Mamma-, Ovarial- und Uteruskarzinom	10%
familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	100%
kolorektale Adenome	
> 1 cm	10%
> 2 cm	50%
in der Familie	10%
Normalbevölkerung	2%

Alkoholkonsum wirken sich ungünstig aus, wohingegen sich eine mediterrane Kost, schnelle Stuhlpassage, Acetylsalicylsäure, nichtsteroidale Antiphlogistika und regelmäßige körperliche Aktivität positiv auswirken [2].

Weitere Risikofaktoren sind kolorektale Adenome, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Karzinome von Mamma, Ovar und Uterus sowie die Bilharziose [2]. Generell kommen kolorektale Karzinome in der Stadtbevölkerung häufiger vor als auf dem Land und sind in armen, unterentwickelten Ländern deutlich seltener [1].

1.4 Pathogenese

1.4.1 Adenom-Karzinom-Sequenz

Tumorprogressionsmodell (nach Vogelstein und Fearon):

Die Tumorentwicklung vom gesunden Gewebe über das Adenom zum Karzinom dauert circa zehn Jahre und wird durch eine Häufung mehrerer genetischer Veränderungen verursacht. Damit meint man die Aktivierung von Onkogenen (KRAS) und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (p53, APC). Wird eine kritische Anzahl an genetischen Mutationen erreicht, kann das zu Beginn noch kontrollierte Wachstum in ein nicht mehr kontrolliertes, malignes Wachstumsverhalten übergehen (maligne Transformation) [2].

1.4.2 Serratiertes Karzinogeneseweg

Das sessile serratierte Adenom (SSA) ist die Präkanzerose für das erworbene MSI-Karzinom und ist meistens rechtsseitig lokalisiert. Das serratierte Karzinom hingegen findet sich

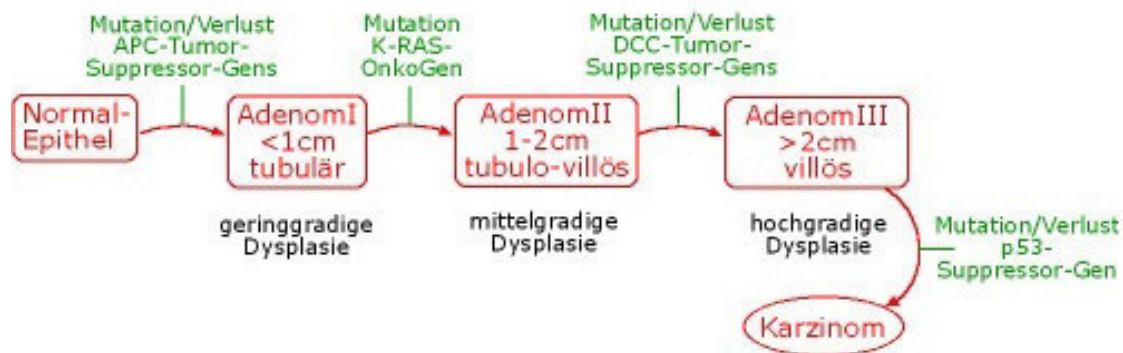


Abbildung 1.1: Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz [2]

eher links im Kolon. Der erste Schritt des serratierten Karzinogeneseweges ist die Beeinträchtigung der physiologischen Apoptose in den Krypten. (BRAF- und KRAS-Gen vermittelt). Durch den Aufstau der retinierten Zellen kommt es zur charakteristischen serratierten Kryptenmorphologie. Aufgrund der verlängerten Lebenszeit der Kryptenepithelien kommt es zu einer verstärkten Methylierung der DNA, woraus eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) resultiert: Hier ist daher auch die Rede vom CIMP(CpG-Island-Methylation)-Phänotyp, mit einem hohen (CIMP-H) und einem niedrigen (CIMP-L) Methylierungstyp. Mindestens 7,5% aller Kolorektalen Karzinome zeigen einen serratierten Phänotyp, dabei lassen sich histologisch eine Reihe von Wachstumsformen unterscheiden: serratiert, muzinös und trabekulär. Die molekularbiologischen Veränderungen des serratierten Karzinoms unterstützen die Theorie eigenständiger präneoplastischer Läsionen, herkömmliche Adenome weisen diese molekularen Veränderungen nur sehr selten auf. Es gibt zwei unterschiedliche serratierte Karzinogenesewege:

- den MSI-H-serratierten Weg, der vom sessil serratierten Adenom (SSA) ausgeht. Diese Tumore sind meist proximal gelegen und mit einer klinisch günstigeren Prognose assoziiert (Fünfjahresüberlebensrate >70%)(sogenannte alternative serratierte Route oder molekularer Typ 1 nach Jass)
- den MSI-L-serratierten Weg, der vom traditionellen serratierten Adenom (TSA) ausgeht. Diese Tumore sind hauptsächlich im distalen Kolon lokalisiert und haben eine klinisch ungünstigere Prognose. Die meisten MSI-L-Tumore sind vermutlich MSS (Fünfjahresüberlebensrate <30%)(sogenannter Mischtyp oder molekularer Typ 3 nach Jass) [5].

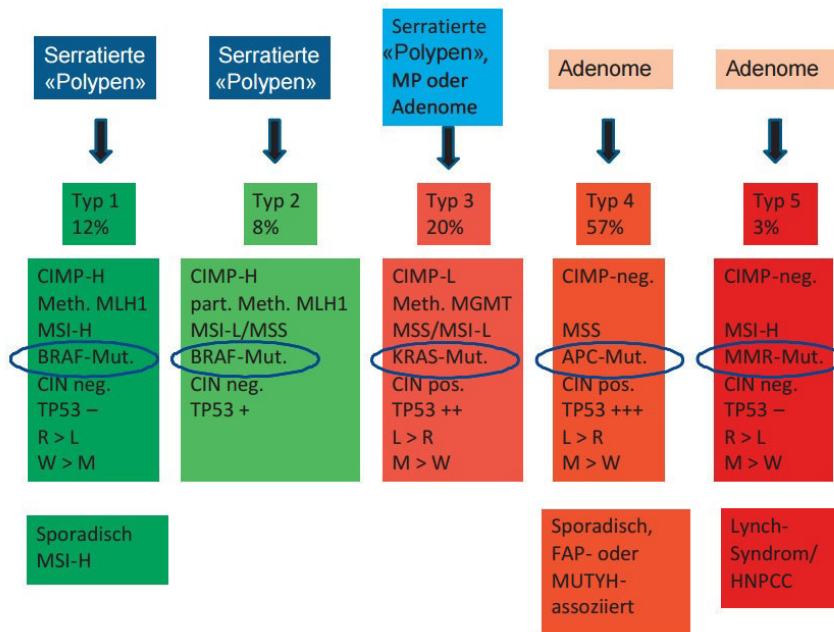


Abbildung 1.2: Die unterschiedlichen Karzinogenesewege des KKR modifiziert nach Jass [6]

1.4.3 Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Das autosomal-dominant vererbte HNPCC oder Lynch-Syndrom geht mit einem höheren Risiko und bereits im jüngeren Alter auftretenden kolorektalen Karzinomen einher. Es ist mit 5% die häufigste erbliche Form des KKR, das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt rund 45 Jahre. Weitere mit HNPCC assoziierte Karzinome sind Endometrium-, Ovarial-, Urothel-, Dünndarm-, Gallengangs- und Magenkarzinome. Die Ursache liegt in einem Defekt der DNA-Mismatch-Reperaturgene, der unter anderem zu einer Mikrosatelliteninstabilität führt. Die Diagnose entspricht der des Kolorektalen Karzinoms, bei Verdacht auf eine erbliche Komponente werden zusätzlich molekulargenetische und humangenetische Untersuchungen durchgeführt, dazu gehören die IHC von DNA-Reperaturproteinen, die Suche nach Mikrosatelliteninstabilität, sowie der Nachweis einer Keimbahnmutation. Hilfestellung bei der Diagnostik bieten die Amsterdam-II- und Bethesda-Kriterien. Die Amsterdam-II-Kriterien beinhalten folgende Kriterien: Mindestens drei Familienmitglieder mit einem HNPCC-assoziierten Karzinom, in zwei aufeinanderfolgenden Generationen, mindestens eine Verwandtschaft ersten Grades, mindestens eine Person unter 50 Jahre alt und Ausschluss einer FAP. Die überarbeiteten

Bethesda-Kriterien beinhalten die Diagnose eines KRK vor dem 50. Lebensjahr, die Diagnose von anderen HNPCC-assoziierten Karzinomen, die Diagnose eines KRK vor dem 60. Lebensjahr bei histologischen Vorliegen eines MSI-H-Tumors, die Diagnose eines KRK und mindestens ein Verwandter ersten Grades mit einem HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr oder die Diagnose eines KRK und mindestens zwei Verwandte ersten oder zweiten Grades mit einem HNPCC-assoziierten Tumor unabhängig vom Alter. Patienten mit einem HNPCC und deren Familienmitgliedern wird eine genetische Beratung und die regelmäßige Teilnahme an Vorsorgeuntersuchungen empfohlen. Dazu gehören ab dem 25. Lebensjahr jährliche Koloskopien, jährliche gynäkologische Untersuchung und jährliche Abdomensonographie. Ab dem 35. Lebensjahr kommen noch jährliche Oesophagogastroduodenoskopien sowie Endometriumbiopsien dazu [4].

1.4.4 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die FAP wird autosomal-dominant vererbt, bei 25% handelt es sich jedoch um eine Neumutation. Ursächlich ist eine Mutation des APC-Tumorsuppressor-Gens. Bei den Patienten fallen bei der Endoskopie über 100 Polypen im gesamten Gastrointestinaltrakt auf, vor allem im Kolon. Das Lebenszeitrisko, an einem KRK zu erkranken, beträgt 100%, so dass jährliche Vorsorgekoloskopien ab dem 10. Lebensjahr empfohlen werden. Die Tabelle 1.2 bietet noch einmal einen Überblick über die Häufigkeit und das Entartungsrisiko kolorektaler Polypen.

Tabelle 1.2: Häufigkeit und Entartungsrisiko kolorektaler Polypen [7]

Polypenart/ Polypose	Häufigkeit	Entartungsrisiko
Hyperplastischer Polyp	>85%	praktisch nicht
Hyperplastische Polypose	selten	50%
Adenome	55%	bis 35% wenn > 1 cm
-Tubulär	63%	
-Tubulovillös	26%	
-Villös	11%	
FAP	1%	100%
TSA	1%	geschätzt < 5%
SSA	11%	geschätzt < 5%
Juvenile Polypose	< 1%	20-60%
HNPCC	5%	80%

1.5 Diagnostik

Eine sehr wichtige Rolle bei kolorektalen Karzinomen spielt, wie bei allen Krebsarten, die Früherkennung. Daher sollte ab dem 50. Lebensjahr mit der Darmkrebsvorsorge begonnen werden. Folgende Verfahren können genutzt werden:

1.5.1 Anamnese

Obwohl es keine zuverlässigen Frühsymptome gibt, sollten folgende Symptome aufmerksam machen: Blutbeimischungen im Stuhl, plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheit im Alter über 40, Ileuserscheinungen, Chronische Blutungsanämie, Schmerzen, Leistungsminderung, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust [2].

1.5.2 Endoskopische Verfahren

Koloskopie

Die Koloskopie besitzt die höchste Sensitivität und Spezifität für das Detektieren von Adenomen und Karzinomen und gilt daher als Goldstandard. Bei unauffälligem Befund wird eine Kontrollkoloskopie nach 10 Jahren empfohlen. Die digitale rektale Untersuchung gehört dabei obligat dazu.

Sigmoidoskopie

Die Sigmoidoskopie sollte man nur Patienten anbieten, die eine Koloskopie als Vorsorgemaßnahme ablehnen.

Kapsel-Koloskopie

Die Kapsel-Koloskopie ist eine praktische neue Methode, kann aber aufgrund fehlender Datenlage noch nicht zur Darmkrebsfrüherkennung empfohlen werden [8].

1.5.3 Stuhltests

Fäkaler okkultter Bluttest

Bei Patienten mit durchschnittlichem Risiko für kolorektale Karzinome, die eine Koloskopie ablehnen, sollte jährlich ein Fäkaler okkultter Bluttest (FOBT) durchgeführt werden. Bei positivem Ergebnis ist dann trotzdem eine endoskopische Untersuchung des kompletten Dickdarms erforderlich.

Alternativ zum klassischen Guajak-Test können auch immunologische FOBT mit höherer Sensitivität und Spezifität (>90%) eingesetzt werden [8].

1.5.4 Radiologische Verfahren

Die Untersuchung des Kolons mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) sind Methoden hoher Sensitivität (100%) für die Detektion von Karzinomen und dienen ebenfalls als Alternative bei Personen, die die klassische Koloskopie ablehnen oder bei denen Stenosen vorhanden sind, die eine Koloskopie unmöglich machen [8].

1.5.5 Ergänzende Diagnostik

Bei bestätigtem kolorektalen Karzinom sollte als ergänzende Diagnostik die Tumorausbreitung sowie die Operabilität beurteilt werden. Als Hilfsmittel dienen CT, MRT und Sonografie. Dabei sollte ebenfalls auf Metastasensuche gegangen werden. Außerdem kann der Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen) bestimmt werden, dessen Bedeutung nicht in der Primärdiagnostik, sondern vor allem in der Nachsorge liegt. Steigende Werte nach der Therapie deuten auf ein Rezidiv hin [2].

1.6 Therapie

1.6.1 Präoperative Diagnostik

Zur Beurteilung des Sphinkter ani externus und der Lokalisation ab Anus bei Rektumkarzinomen ist die digital-rektale Untersuchung unerlässlich. Es sollte eine vollständige Koloskopie mit Biopsie angestrebt werden. Bei unpassierbarer Stenose wird postoperativ eine Koloskopie nach drei bis sechs Monaten durchgeführt. Zum Ausschluss von Organüberschreitung und Lebermetastasen nutzt man die Abdomensonographie, eventuell auch ein Spiral-CT oder MRT. Mit CT, MRT oder Röntgen-Thorax werden Lungenmetastasen ausgeschlossen. Für die Suche nach hepatischen und extrahepatischen Metastasen lohnt sich der Einsatz des FDG-PET-CT (Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomographie-CT), da hier auch kleine und an ungünstigen Stellen gelegene Metastasen erkannt werden. Nur die Verwendung von intraoperativem Ultraschall erzielte noch bessere Ergebnisse [9]. Das Karzinoembryonales Antigen (CEA) ist ein für die Prognose relevanter Marker, wobei hohe Serumspiegel für ein ausgedehntes Karzinom sprechen und als ungünstig angesehen werden. Nach vollständiger chirurgischer Resektion sinken die Serumspiegel auf Normwerte ab und steigen erst bei einem Rezidiv wieder an. Hierbei ist laut Shinkins et al. [10] vor allem der Trend des Wertes (steigende Plasmaspiegel $\geq 1,02$ Mikrogramm pro Liter pro Monat) aussagekräftig, aussagekräftiger als die Absolutwerte. Als Screeningmethode

ist die CEA-Bestimmung allerdings nicht geeignet, weil Frühkarzinome nur gering erhöhte Serumspiegel zeigen und dadurch die Spezifität des Tests niedrig ist.

1.6.2 Operation

Lymphknotendisektion

Die lymphogene Metastasierung erfolgt zunächst in die parakolischen Lymphknoten, danach weiter zu den mittleren Lymphknotenstationen entlang der Radialarterien und zu den zentral gelegenen Lymphknoten am Hauptstamm der Arteria mesenterica superior und Arteria mesenterica inferior. Aus der Absetzung an der zentralen versorgenden Arterie ergibt sich das Ausmaß der Resektion. Zur Wiederherstellung der Darmpassage wird anschließend eine End-zu-End-Anastomose angelegt, beziehungsweise durch die Bauchwand geleitet (Stoma oder Anus praeter) [8].

Karzinome des Coecums und des Colon ascendens

Dort gelegene Karzinome metastasieren über die Vena ileocolica und die Vena colica dextra, sodass beide Gefäße am Stamm abgesetzt und mit dem Coecum und Colon ascendens reseziert werden. Das Omentum majus wird nur bei direktem Kontakt mit dem Tumor entfernt [8].

Karzinome der rechten Flexur und des rechten Colon transversum

Hier muss zusätzlich zur Arteria ileocolica und Arteria colica dextra die Arteria colica media abgesetzt werden. Daraus erschließt sich der distale Resektionsrand im Bereich der linken Colonflexur, dem Übergang der arteriellen Versorgung von der A. mesenterica superior zur A. mesenterica inferior. Zusätzlich werden die Gastroepiploica-dextra-Arke entlang der großen Magenkurvatur, das Omentum majus und die Lymphknoten entlang des Pankreaskopf reseziert [8].

Karzinome des mittleren und distalen Colon transversum und der linken Flexur

Diese Karzinome metastasieren entlang der Arteria colica media in Richtung Arteria mesenterica superior und entlang der Arteria colica sinistra in Richtung Arteria mesenterica inferior. Daraus resultiert eine Resektion des Transversums inklusive beider Colonflexuren, bei Tumorbefall auch des kompletten Omentum majus. Die Kontinuität der Darmpassage kann als Ascendo-Sigmoideostomie wieder hergestellt werden. Befalle-

ne Lymphknoten am Pankreasunterrand werden vom Isthmus bis zum Pankreasschwanz entfernt [8].

Karzinome des Colon descendens

Hier wird eine Hemikolektomie links mit zentraler Duchtrennung der Arteria mesenterica inferior durchgeführt. Die aborale Resektionsgrenze liegt dabei im oberen Drittel des Rektums, die proximale im linken Flexurbereich. Eventuell adhäsive Anteile des Omentum majus werden mitreseziert [8].

Karzinome des Sigmas

Ist der Tumor auf das Sigma begrenzt, kann die Arteria colica sinistra geschont werden, ansonsten wird bei zentralem Lymphknotenbefall ebenfalls eine Hemikolektomie links notwendig [11]. Bei Kolontumoren ist dabei die laparoskopische Operation der offenen chirurgischen gleichwertig [12].

Rektumkarzinome

Für die Resektion des Primarius im Rektum gibt es folgende Behandlungsmethoden [11]:

- Anteriore Rektumresektion mit Wiederherstellung der Darmkontinuität
- Totale mesorektale Rektumresektion mit koloanaler Anastomose
- Abdominoperineale Rektumresektion mit definitiver Anlage eines Kolostomas
- Diskontinuitätsresektion nach Hartmann
- Posteriore Resektion
- Transanale Karzinomexstirpation

Welches Verfahren angewendet wird, entscheidet sich anhand der Lokalisationshöhe, des Tumorstadiums, der Tumorgröße und anhand der Risikoerkrankungen des Patienten. Bei Karzinomen im oberen Drittel des Rektums wird in der Regel eine anteriore, bei Tumoren des mittleren oder unteren Drittels eine tiefe anteriore Rektumresektion durchgeführt. Der Sicherheitsabstand wird von der Wachstumsart und dem Differenzierungsgrad des Tumors bestimmt und ist mit distal zwei Zentimetern ausreichend. Das mesorektale Gewebe muss komplett reseziert werden. Ist der Sicherheitsabstand nicht ausreichend, erfolgt eine abdominoperineale Resektion des Rektums. Im Notfall ist die Diskontinuitäts-

resektion nach Hartmann indiziert, dabei wird primär ein Kolostoma angelegt, welches sekundär zurückverlagert werden kann [11].

1.6.3 Radio- und Chemotherapie

Neoadjuvante und adjuvante Radio- und Chemotherapie kommen in Kombination mit der chirurgischen Therapie nur in fortgeschrittenen Stadien zum Einsatz. Kontraindikationen sind: Leberzirrhose, unkontrollierte Infektionen, Herzinsuffizienz, schwere koronare Herzkrankheit, eingeschränkte Knochenmarksfunktion und eine präterminale und terminale Niereninsuffizienz.

Chemotherapie bei Kolonkarzinomen

Bei Karzinomen im Stadium II und III, bei denen eine R0-Resektion erreicht werden konnte, nutzt man eine 5-Fluorouracil/Folinsäure-haltige adjuvante Chemotherapie (Majo-Schema, NSABP-Schema). Dadurch wird eine signifikante Reduzierung der Rezidivrate und eine Verlängerung des Überlebens erzielt. Hier muss erwähnt werden, dass der Benefit der Chemotherapie im Stadium II nur klein ist und daher nur bei Risikofaktoren empfohlen wird. Bei Patienten im Stadium IV kann mithilfe der adjuvanten Therapie mit dem FOLFOX-Protokoll (5-FU, Leukovorin, Oxaliplatin) eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine mittlere Überlebenszeit von 19,5 Monaten erreicht werden. Alternativ nutzt man dasXELOX-Schema (Capecitabin statt 5-Fluorouracil), welches keinen erheblichen Unterschied zum FOLFOX-Regime zeigt [13]. Neuerdings werden diese Schemata zusätzlich mit Antikörpern gegen den Wachstumsrezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor) (Cetuximab, Panitumumab) [14] und gegen den Rezeptor der Angiogenese VEGF (vascular endothelial growth factor) (Bevacizumab) kombiniert und verbessert dadurch die mittlere Überlebenszeit auf 22 Monate. Die Bindung von Cetuximab und Panitumumab an EGFR führt zu Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion, Angiogenesehemmung, Antikörperabhängige zellvermittelte Zelltoxizität und EGFR-Internalisierung und -Degradation. Cetuximab und Panitumumab sind gleichwertig in der Therapie [15]. Ausschließlich Patienten, deren Tumoren ein nicht-mutiertes KRAS-Gen aufweisen (Wildtyp), profitieren von der Therapie mit einem der beiden Antikörper [16]. Auch zeigt sich, dass Patienten mit BRAF-Mutationen kein verbessertes progressionsfreies Überleben unter der Therapie mit Cetuximab und Panitumumab aufweisen [17]. Das KRAS-Protein befindet sich in der EGFR-Signalkaskade dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet, so dass bei einer Mutation die Signalübertragung dauerhaft aktiv ist, auch wenn Cetuximab oder Panitumumab den EGF-Rezeptor blockieren. Deswegen hat die

Mutation des KRAS-Gens prädiktive Bedeutung.

Radiotherapie und neoadjuvante Chemotherapie sind bei Kolonkarzinomen nicht indiziert [8].

Therapie bei Rektumkarzinomen

Im Stadium I nach R0-Resektion ist keine Radiochemotherapie notwendig. Im UICC-Stadium II und III ist in den meisten Fällen die neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie indiziert. Die neoadjuvante Therapie sollte neben der Bestrahlung entweder eine 5-Fluorouracil-Monotherapie oder eine Kombination mit Folinsäure beinhalten. Die Radiochemotherapie ist präoperativ deutlich wirksamer als postoperativ und birgt dabei keine erhöhte postoperative Morbidität [18]. Die Lokalrezidivrate ist signifikant niedriger, die Rate an postoperativen Komplikationen nicht erhöht, sowohl die akute als auch die chronische Toxizität in der neoadjuvanten Gruppe ist im Vergleich niedriger. Bei distal sitzenden Rektumkarzinomen kann die Rate schließmuskelerhaltender Verfahren durch eine neoadjuvante Therapie im Vergleich zur sofortigen Operation um 100% erhöht werden. Ein Problem der neoadjuvanten Therapie ist die Übertherapie von Personen, bei denen zu Unrecht ein Darmwanddurchbrechender (T3) oder lymphknotenpositiver (N1,2) Tumor festgestellt wurde. Daher kann es bei bildgebend fraglichen Stadien auch sinnvoll sein, erst zu operieren. Weitere Kriterien für die primäre Operation können T3-Tumore mit Fettgewebsinfiltration unter 5 mm und Tumore mit einer Distanz zum mesorektalen Absetzungsrand von mehr als 1 mm in der MRT-Diagnostik sein. Falls es intraoperativ zu einem Einriss des Tumors kommt oder mikroskopische Reste in situ verbleiben (R1-Resektion) besteht die Empfehlung zur postoperativen Radiochemotherapie, sollte bis dahin keine neoadjuvante Therapie erfolgt sein. Trotzdem sollte zusätzlich zur neoadjuvanten Radiochemotherapie eine adjuvante Chemotherapie erfolgen [8].

Metastasen

Resektable Metastasen:

Erscheint eine R0-Resektion prinzipiell machbar, so sollten Metastasen in Leber oder Lunge primär operativ entfernt werden.

Isolierte inoperable Lebermetastasen:

Therapie der Wahl ist die systemische Chemotherapie nach obigem Schema. Der Nutzen einer zusätzlichen lokalen Therapie (Lasertherapie, Radiofrequenzablation, TACE) ist bisher nicht nachgewiesen. Dessen ungeachtet scheint die selektive interne Radiotherapie

(SIRT) selbst bei ausgedehnten Metastasen effektiv zu wirken [19].

Bei einem primär metastasierenden kolorektalen Karzinom ist zusätzlich zur Radiochemotherapie die chirurgische Resektion des Primarius anzustreben, um Komplikationen wie der Entstehung eines Ileus entgegenzuwirken.

Nachsorge

Vor allem in den ersten 5 Jahren nach kurativer Behandlung eines Kolon- oder Rektumkarzinoms besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs. Deshalb wird der Patient in den ersten 2 Jahren vierteljährlich klinisch untersucht, inklusive FOBT und Bestimmung der CEA-Spiegel. Zweimal pro Jahr wird eine Endoskopie, Abdominalsonographie oder eine CT- oder MRT-Untersuchung durchgeführt. Nach 2 Jahren wird das Nachsorgeintervall auf 6 Monate, nach 5 Jahren auf 12 Monate verlängert [1].

1.7 Pathologie

1.7.1 TNM-Klassifikation

Kolorektale Karzinome wachsen langsam. Bis sich aus einem kleinen Tumor ein stenosierendes Karzinom entwickelt, vergehen mehrere Jahre. Auch Metastasen finden sich meist erst relativ spät. Das Tumorwachstum kann papillös, schüsselförmig ulzerierend zirkulär stenosierend oder diffus infiltrierend erfolgen [1]. Adenokarzinome werden nach dem Ausmaß ihrer glandulären Strukturen graduiert: G1 (gut): > 95%; G2 (mäßig): > 50% < 95%; G3 (schlecht): > 5% < 50%; G4 (undifferenziert): < 5% drüsige Differenzierung. Alternativ kann zwischen Low-Grade (G1/2)- und High-Grade (G3/4)-Adenokarzinomen unterteilt werden. Die am geringsten differenzierte Komponente des Tumors bestimmt das Grading. Das muzinöse Adenokarzinom und das Siegelringzellkarzinom werden als G3-Karzinome klassifiziert, sofern sie mikrosatellitenstabil sind. MSI-Karzinome sind grundsätzlich als low grade zu klassifizieren [20]. Ziel des Stagings mithilfe der TNM-Klassifikation ist es, den Tumor einem Stadium zuzuordnen, um die Prognose abschätzen zu können und um individuelle Behandlungsstrategien für jeden Patienten zu entwickeln. Daneben dient es der Justierung für vergleichende Untersuchungen aus klinischen und wissenschaftlichen Gründen. Prätherapeutisch wird das Staging mithilfe der Endosonographie, der Computertomographie oder der Magnetresonanztomographie vorgenommen, postoperativ kann der Befund histopathologisch präzisiert werden. Damit der Tumor richtig beurteilt werden kann, ist es wichtig, dass der Gewebekblock den Bereich mit der maximalen Infiltration sowie den tiefen Exzisionsrand enthält. Damit dieser zuverlässig

erkannt wird, nutzt man Tusche. Die Ausbreitung des Tumors in das Mesenterium oder das retroperitoneale Gewebe sowie in andere Organe wie Vagina, Blase oder Prostata wird ebenfalls dokumentiert. Der distale und proximale Resektionsrand muss nur angeschaut werden, wenn der Tumor weniger als 3 cm entfernt ist, ein aggressives Wachstum vorliegt oder extensive Gefäßinfiltration zeigt [6]. T (Tumor) beurteilt die Tiefeninvasion des Primärtumors, N (Nodus) beurteilt, ob Lymphknotenmetastasen vorliegen und M (Metastasen) beurteilt das Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Tumorstadieneinteilung findet sich in den Tabellen 1.3 und 1.4.

Tabelle 1.3: TNM-Klassifikation (UICC, 2017) [2]

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4a	Tumor infiltriert viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2a	Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M0	keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten), ohne Peritonealmetastasen
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

Nach endoskopischer Polypektomie eines Adenoms wird entschieden, ob eine chirurgische Nachresektion durchgeführt wird. Empfohlen wird es bei wenig differenzierten (G3, G4) Karzinomen, bei siegelringzelliger Differenzierung bei Blut- oder Lymphgefäßinvasion und wenn im Resektionsrand Tumorzellen nachgewiesen werden. Allerdings findet sich nur in 0,2 bis 8% der Fälle ein Malignom. Die Tiefe der Infiltration des Tumors in

Tabelle 1.4: Stadiengruppierung (UICC, 2017) [2]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

die Submukosa wird bei gestielten Polypen in Haggitt-Level eingeteilt [21] (Tabelle 1.4). Breitbasige Läsionen werden mithilfe der Submukosainfiltrationstiefe (sm) eingeteilt: sm 1 und sm 2 bei einer Infiltration des Tumors kleiner 1 mm und sm 3 bei mehr als 1 mm. Die Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen ist deutlich höher (20% zu 0 bis 6%) bei sm-3-Tumoren. Sm-1- und 2-Läsionen lassen sich im Gegensatz zu sm-3-Läsionen durch Injektion in die Submukosa anheben. Deshalb sind nur sm-1 und 2-Tumore kurativ endoskopisch resektabel [22].

WHO-Klassifikation(2010) der Tumore des Kolons und Rektums:

- Adenokarzinom
 - Adenokarzinom vom kribriformen Komedo-Typ
 - Medulläres Karzinom
 - Mikropapilläres Karzinom
 - Muzinöses Adenokarzinom
 - Serratiertes Adenokarzinom
 - Siegelringzelliges Karzinom
- Adenosquamöses Karzinom

- Spindelzelliges Karzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Undifferenziertes Karzinom

Tabelle 1.5: Haggitt-Level [21]

Haggitt-Level	Infiltration der Submukosa
Level 0	Keine
Level 1	Im Kopfbereich
Level 2	Im Halsbereich
Level 3	Bis in den Stiel
Level 4	Tiefer als der Stiel

1.7.2 Staging nach Dukes

Das Dukes-Staging-System wird in vier Gruppen unterteilt, A, B, C und D. Dabei entspricht Dukes A einem frühen Stadium, Dukes D einem weit fortgeschrittenem [23]. Eine Übersicht gibt Abbildung 1.3.

Dukes A

Der Tumor infiltriert nur die Dickdarmwand und reicht maximal bis in die Muscularis propria. Es gibt keine Lymphknotenmetastasen.

Dukes B

Das Tumorgewebe greift über die Muscularis propria hinaus auf das Mesenterium. Es gibt keine Lymphknotenmetastasen.

Dukes C

Der Tumor hat in mindestens einen lokalen Lymphknoten gestreut.

Dukes D

Der Tumor hat bereits in den gesamten Körper gestreut, zum Beispiel liegen Leber- oder Lungenmetastasen vor.

Das Dukes-D-Stadium kommt in der Literatur in verschiedenen Varianten vor. Differenzierung des Dukes-D-Stadium durch Hinzuziehen weiterer klinischer Faktoren:

- Stadium D0: chirurgisch entfernte Fernmetastasen
- Stadium D1: R1-Situation nach Abschluss der Operation
- Stadium D2: Fernmetastasen
- Stadium D3: lokaler Tumorrest und Fernmetastasen nach Abschluss der Operation

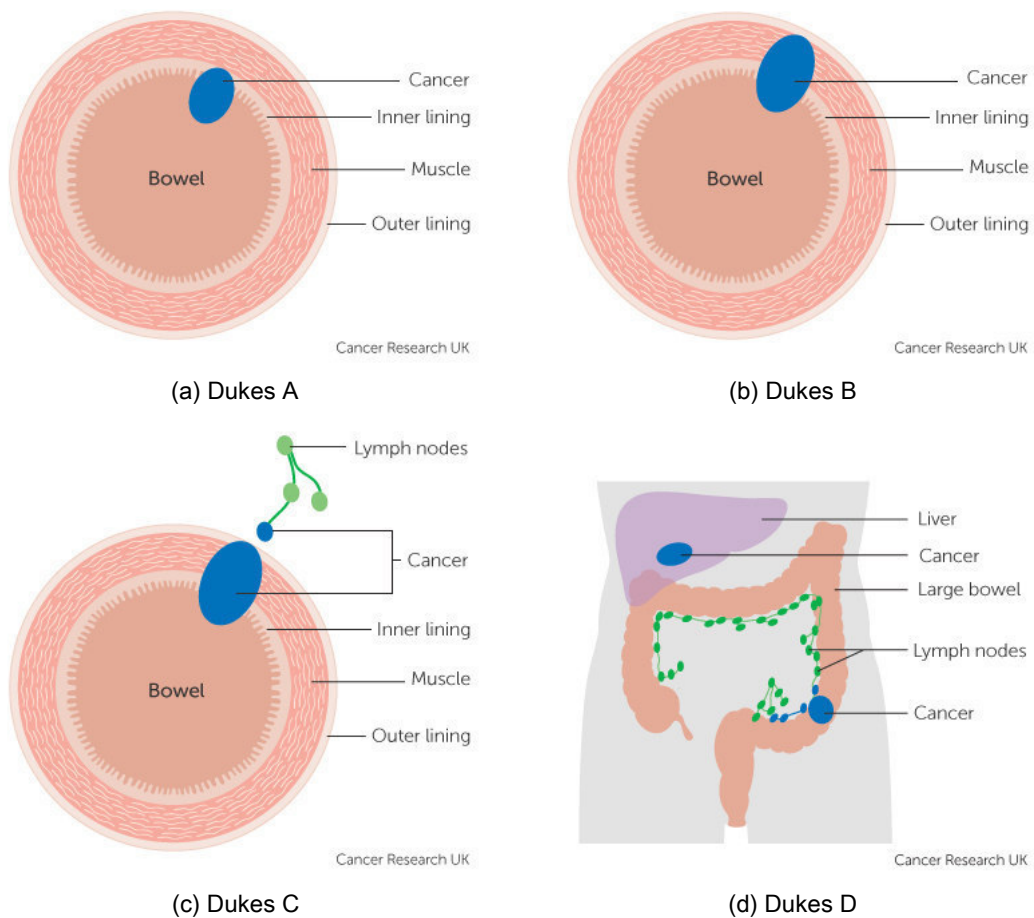


Abbildung 1.3: Staging nach Dukes

1.7.3 Infiltrationstyp nach Jass

J. R. Jass entwickelte ebenfalls eine Methode, um Patienten mit Kolorektalem Karzinom prognostischen Kategorien zuzuordnen. Es gibt vier verschiedene, unabhängige Parame-

ter, aus denen für jeden Patienten ein Score berechnet wird, so dass er einer der vier Gruppen zugeteilt werden kann (Abb. 1.4). Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der krankheitsfreien Überlebenszeit signifikant [6].

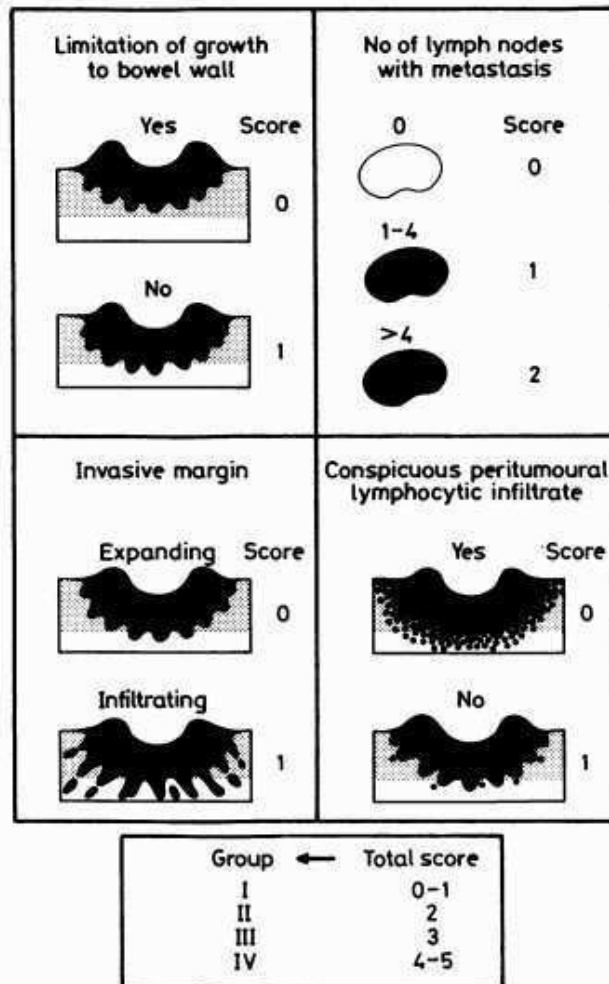


Abbildung 1.4: Staging System nach Jass [6]

1.7.4 Zusatzdiagnostik

Mikrosatelliten-Instabilität entsteht durch Längenveränderung kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen als Folge defekter DNA-Reparaturproteine. Durch Ausfall des Reparatursystems häufen sich in der neu replizierten DNA nach und nach Mutationen an, die die Tumorentstehung begünstigen oder verursachen. Beim kolorektalen Karzinom be-

wirkt eine hochgradige Mikrosatelliten-Instabilität eine bessere Prognose trotz Resistenz gegen die adjuvante Therapie mit 5-Fluorouracil. Häufig besteht eine Assoziation der Mikrosatelliten-Instabilität mit dem Lynch-Syndrom und kommt bei 15 bis 20% aller kolorektalen Karzinome vor.

Zusammenfassend sind die Aufgaben der Pathologen die Erstellung der endgültigen Diagnose, die Bestimmung des lokalen und systemischen Krankheitsstadiums und die Durchführung von zusätzlichen molekularbiologischen Untersuchungen zum Beispiel auf Mikrosatelliteninstabilität oder KRAS- und BRAF-Mutationen.

1.8 Prognose

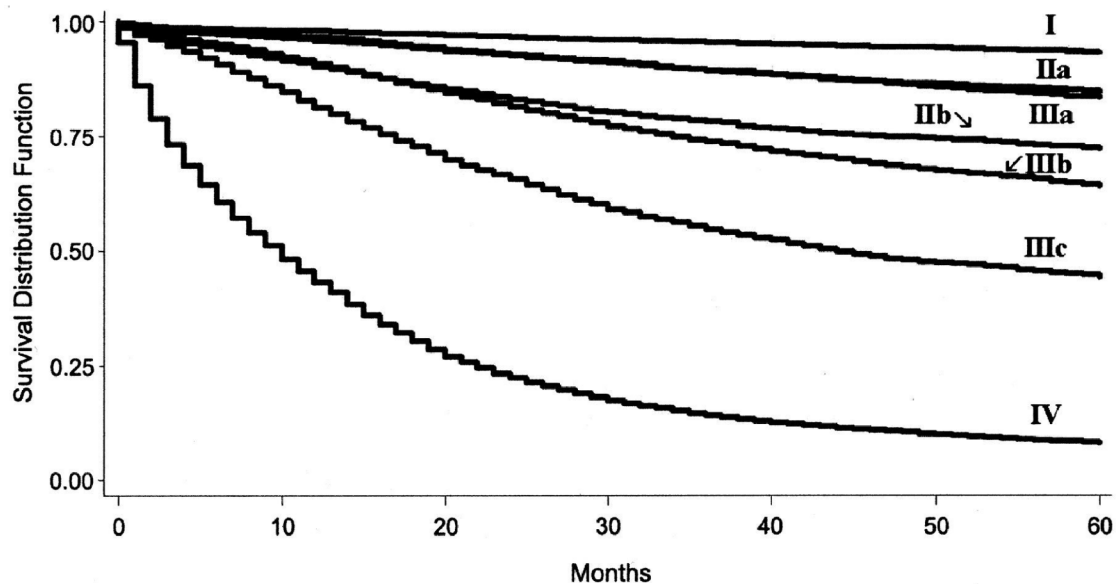
1.8.1 Überlebensraten in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Wie bei den meisten malignen Neoplasien ist die Heilungswahrscheinlichkeit und damit die Überlebensrate auch bei Darmkrebs stark vom Zeitpunkt der Entdeckung und dem Tumorstadium abhängig. Nach wie vor ist das TNM-System das wichtigste Instrument zur Prognoseabschätzung. Einen Überblick verschafft die Grafik aus dem Journal of the National Cancer Institute (Abb. 1.5).

Des weiteren ist man daran interessiert, Patienten, die allein durch die Operation geheilt werden können, von denen zu selektieren, die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. So kann man Nebenwirkungen vermeiden und Ressourcen sparen. Bislang sind nur bestimmte Risikofaktoren etabliert, die helfen sollen, Patienten mit ungünstiger Prognose, besonders im Stadium 2, herauszufiltern (Stadium 2 mit Risikofaktoren: T4, zu wenig untersuchte Lymphknoten, Notfalloperation (Ileus, Perforation) [8]). Die QUASAR-Studie [24] zeigt, dass diese Patienten von einer adjuvanten Chemotherapie einen Überlebensvorteil davontragen (Verbesserung circa 7%) [25].

1.8.2 Tumor Budding

Als Tumor Budding werden isolierte Zellen und Zellverbände bis maximal vier Krebszellen bezeichnet, das Ausmaß sollte in einem repräsentativen Schnitt, in HE-Färbung, in einem Mikroskopierfeld mit der Größe von $0,785 \text{ mm}^2$ und an der invasiven Front des Tumors bestimmt werden. Hochgradiges Tumor Budding verkürzt die Überlebenszeit bei Patienten im Stadium II und ist assoziiert mit Lymphknotenmetastasen bei pT1 Tumoren. Bei kolorektalen Karzinomen kann es zu intramuralem Budding kommen, was ebenfalls zu verstärktem Auftreten von Lymphknotenmetastasen führt. Tumor Budding sollte immer im Zusammenhang mit anderen klinisch-pathologischen Parametern in einem in-



Stage	0 mo		30 mo			60 mo		
	Survival, %	No.	Survival, %	No.	<i>P</i>	Survival, %	No.	<i>P</i>
I	100	14500	96.1	8,581	—	93.2	4514	—
IIa	100	28535	91.0	2,105	<.001	84.7	8494	<.001
IIb	100	5826	80.2	3,060	<.001*	72.2	1611	<.001*
IIIa	100	1989	91.4	1,120	NS†	83.4	551	NS†
IIIb	100	15946	77.3	7,786	<.001‡	64.1	3579	<.001‡
IIIc	100	8600	59.1	3,039	<.001	44.3	1250	<.001
IV	100	20802	17.3	1,832	<.001	8.1	432	<.001

Abbildung 1.5: Five-year survival by the American Joint Committee on Cancer sixth edition system stages I–IV. *P* value determined by the log-rank test refers to the corresponding stage and the stage in the row above, unless otherwise indicated. All statistical tests were two-sided. * = IIIa versus IIb; † = IIa versus IIIa; ‡ = IIb versus IIIb; NS = not statistically significant. [26]

terdisziplinärem Setting betrachtet werden, um eine bestmögliche Prognoseabschätzung und Therapieplanung zu gewährleisten. Dabei entspricht Tumor Budding nicht dem Differenzierungsgrad, sowohl high-grade- als auch low-grade-Tumore können hochgradiges Tumor Budding aufweisen [27]. Den Vorgang des Phänotypwechsels bezeichnet man auch als Epithelial-mesenchymale Transition und geht mit einem Verlust der Polarisierung der Zelle einher. Nach Hideki Ueno et al. [28] ist die Fünfjahresüberlebensrate fast doppelt so hoch bei der Patientengruppe mit geringgradigem im Vergleich zu der Gruppe mit hochgradigem Tumor Budding.

1.8.3 Lymphknoten

Ein wichtiger Parameter zu Prognoseabschätzung ist die Anzahl der befallenen Lymphknoten. Zum Teil sind sie zwar im TNM-System erfasst, insbesondere ist jedoch die Anzahl der untersuchten Lymphknoten wichtig. Mindestens gefordert sind aktuell 12 Lymphknoten, je mehr man untersucht, am besten mehr als 20, desto besser ist die Prognose. Sind alle Lymphknoten tumorfrei, sind die Heilungschancen für den Patienten deutlich besser. Interessanterweise hat der Patient auch dann eine bessere Prognose, wenn viele Lymphknoten untersucht wurden, unabhängig davon, ob sie tumorpositiv oder -negativ sind [29]. Um die Ausbeute an Lymphknoten zu verbessern, haben sich die Fettaufhellungstechniken und die intraarterielle Ex-Vivo-Injektion von Methylenblau in das Resektionspräparat bewährt [30]. Nach Märkl B. et al. sind Lymphknoten, die größer als 5 mm im Durchschnitt sind, günstig für die Prognose des Patienten, da sie für eine Aktivierung des Immunsystems sprechen [31].

1.8.4 Plasminogenaktivatorsystem

Im Plasminogenaktivatorsystem enthalten sind unter anderem Plasminogen bzw. Plasmin, Plasminogenaktivatoren vom Urokinasetyp (uPA) und vom Gewebetyp (tPA), Plasminogenaktivatorinhibitoren (PAI-1, PAI-2) und dem Urokinasetyp-Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPA-R). Bei vielen Prozessen im Körper spielt das Plasminogenaktivatorsystem eine wichtige Rolle, unter anderem bei der Blutgerinnung bzw. der Fibrinolyse, der Wundheilung und eben auch im Rahmen der Proteolyse beider Invasion und Metastasierung maligner Tumoren. Hier spielen besonders die Proteasen PAI-1 und uPA eine Rolle.

Urokinaseplasminogenaktivator (uPA)

Ein entscheidender Schritt bei der Metastasierung ist das Durchbrechen der Basalmembran und das Abbauen der umgebenden extrazellulären Matrix. Die dafür benötigten Proteasen werden in Tumorzellen sowie auch in gesunden Zellen gebildet. Besonders uPA scheint hier besonders wichtig zu sein. Im Körper werden zwei verschiedenen Arten von Plasminogenaktivatoren gebildet, Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA). Beide wandeln inaktives Plasminogen in aktives Plasmin um, wobei tPA hauptsächlich bei der Gerinnung eine Rolle spielt, wohingegen uPA bei dem Abbau extrazellulärer Matrix involviert ist [32]. uPA ist eine Serinprotease, wiegt 55 kDa und wird von verschiedenen Zellen als einkettiges Proenzym (Pro-uPA) mit geringer intrinsischer Aktivität sezerniert. Pro-uPA besteht aus einer aminoterminalen wachsumsfaktorähnlichen Domäne, einer Kringle-Domäne und der Serinprotease im Zentrum. Gespalten wird Pro-uPA durch Plasmin [33], Gerinnungsfaktor XIIa, Kallikrein [34], Cathepsin B und L. Das aktive uPA kann in freier Form oder am uPA-R gebunden Plasminogen in Plasmin umwandeln und damit aktivieren. Plasmin ist unter anderem in der Lage, Fibrin und Proteine der Extrazellulärmatrix abzubauen. Die Bindung von uPA an den uPA-R steigert die Effektivität der Protease und verhindert die Hemmung von gebundenem Plasmin durch seine Inhibitoren Alpha-2-Antiplasmin und Alpha-2-Makroglobulin. Dadurch verstärkt sich der Abbau von Extrazellulärmatrix an der Zelloberfläche der Tumorzelle und verleiht ihr die Fähigkeit zur Invasion und damit zur Metastasierung. Inaktiviert wird uPA von dem von ihm aktivierten Plasmin, also ein negativer Feedback-Mechanismus [32].

Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Das Glykoprotein PAI-1 ist ebenfalls eine Serinprotease und wiegt 50 kDa. Endothelzellen, Granulozyten, Thrombozyten und bestimmte Tumorzellen bilden PAI-1 und daher ist es im Plasma nachweisbar [35]. PAI-1 inhibiert uPA durch Bildung eines stabilen Komplexes mit uPA und verhindert dadurch den Abbau der Extrazellulärmatrix [36], außerdem ist es bei Signaltransduktion, Zelladhäsion und Zellmigration beteiligt [32]. PAI-1 inaktiviert neben uPA auch tPA und verhindert die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin. Aktiviertes PAI-1 wird von dem extrazellulären Matrix- und Adhäsionsprotein Vitronektin stabilisiert. Des Weiteren wird die Bindung von Vitronektin an Zelloberflächenintegrine und an den uPA-Rezeptor blockiert. Die Bindung von PAI-1 an uPA am oberflächengebundenen uPA-Rezeptor führt zur Internalisierung des Komplexes, was Signaltransduktionsmechanismen und Zellproliferation auslöst. Nach Interna-

lisierung gelangt der uPA-R wieder an die Oberfläche und nimmt dort seine Aktivität wieder auf. Das komplexe Zusammenspiel des Plasminogenaktivatorsystems ermöglicht der Tumorzelle die Anheftung und Loslösung von der Extrazellulärmatrix und damit die Migration und durch die Auflösung der Extrazellulärmatrix die Invasion und Metastasierung [35] [32] [37] [38].

1.8.5 Weitere Prognosefaktoren

Weitere klinisch-pathologische Prognosefaktoren sind die oben beschriebene Mikrosatelliteninstabilität, Perforation und Obstruktion, Infiltration benachbarter Strukturen, lymphovaskuläre, venöse und perineurale Infiltration sowie ein histologisch festgestellter schlechter Differenzierungsgrad (G3 und G4) und der Invasionstyp nach Jass [6].

2 Material und Methoden

2.1 Zielsetzung

Bisher sind die Abschätzung der Prognose sowie die Art der Therapie des Kolorektalen Karzinoms hauptsächlich vom TNM-Stadium abhängig gemacht worden. Patienten, die an einem Tumor im Stadium III leiden, profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie (FOLFOX- oder XELOX-Schema), die aus diesem Grund auch bereits etabliert ist. Der Benefit bei Patienten im Stadium II hingegen ist recht klein, so dass hier bei Karzinomen ohne nachgewiesenen Lymphknotenbefall meistens keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt wird [39]. Trotzdem zeigen circa 20 % eine Progression der Erkrankung [40]. Das Problem besteht darin, dass immer noch zu viele Patienten durch das TNM-System nur unzureichend klassifiziert werden. Wie bereits vorher beschrieben möchte man die Patienten mit einem aggressiv und invasiv wachsenden Tumor der möglicherweise heilenden oder zumindest lebensverlängernden Chemotherapie zuführen, wohingegen man diejenigen mit guter Prognose von den relevanten Belastungen durch eine Chemotherapie verschonen möchte. Deshalb ist es unbedingt notwendig, neue, prognostisch relevante Faktoren zu identifizieren und diese zu etablieren. Bei dem Versuch, die Art des Wachstums und des Fortschreitens des Tumors aufzuklären, ist die Interaktion des Karzinoms mit seiner Umgebung in den Fokus einiger Forscher gerückt. Ein Teil dieser Interaktion findet durch das Plasmin/Plasminogen-System statt. In den verschiedensten Arten von Karzinomen geht die verstärkte Expression von uPA und PAI-1 mit einer schlechteren Prognose einher [41]. Am besten ist das Plasminogenaktivatorsystem bei Brustkrebspatientinnen untersucht. Hier wird die Höhe der uPA- und PAI-1-Werte im Gewebe mithilfe eines ELISA-Tests (enzyme-linked immunosorbent assay) bereits von der American Society of Oncology (ASCO) empfohlen [42]. Diverse andere Studien konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Höhe der uPA- und PAI-1-Werte im Gewebe mit dem Wiederauftreten eines R0-resezierten Tumors und damit einen Vorteil einer Chemotherapie finden [43]. Bei dem Kolorektalen Karzinom kann die Entwicklung der Migrationsfähigkeit von Tumorzellen zum Teil durch das Vorhandensein von Tumor Budding erkannt werden. Wie bereits beschrieben wird Tumor Budding durch das Auftreten von weniger

als fünf zusammenhängenden Zellen, welche getrennt von dem Haupttumor an dessen invasiven Front auftreten, definiert. Ausgeprägtes Tumor Budding ist ungünstig für die Prognose des Kolorektalen Karzinoms [44] [45]. Es kann postuliert werden, dass Tumor Budding durch eine hohe Aktivität der Proteasen gefördert wird. Um den prognostischen Wert von uPA und PAI-1 bei Darmkrebspatienten zu untersuchen und den Zusammenhang dieser Werte mit dem Tumor Budding zu evaluieren, wurde eine prospektive Studie von B. Märkl et al. [46] erstellt. Diese Studie arbeitet mithilfe des optimierten Lymphknotenstagings mittels Methylenblau-assistierter Lymphknotenpräparation. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Nachbeobachtung der Patienten der vorausgegangenen Studie im Zeitraum bis Juli 2015, um das Gesamtüberleben und das Auftreten von Rezidiven im Zusammenhang mit der Höhe der uPA- und PAI-1-Werte und dem Ausmaß von Tumor Budding zu ermitteln, sowie die Erweiterung des Studienkollektivs um weitere 70 Personen, um die bereits erhobenen Daten von 2010 zu bestätigen und die ermittelten Schwellenwerte der ELISA-Bestimmung von uPA/PAI-1 im Tumorgewebe von Kolon- und Rektumkarzinomen prospektiv zu evaluieren.

2.2 Studienaufbau

2.2.1 Patientenkollektive

Zwischen August 2007 und September 2008 wurden 58 Patienten mit insgesamt 60 krankhaften Gewebeveränderungen prospektiv rekrutiert, die Patienten willigten dabei nach ausführlicher Aufklärung schriftlich in die Teilnahme an der Studie ein. Dieses Kollektiv wird im Folgenden als Test-Set bezeichnet. Das Studienprotokoll wurde der Landesärztekammer Bayern vorgelegt und anerkannt. In die Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, die an einem bekannten oder vermuteten Kolon- oder Rektumkarzinom litten und deshalb elektiv chirurgisch versorgt wurden. Ausgeschlossen wurden alle Patienten mit Kolorektalem Karzinom, die im Rahmen einer Notfalloperation versorgt wurden. Alle Patienten sind im Tumorregister Augsburg registriert, von dort wurde auch ein Teil der Folgedaten bezogen.

Die 68 Patienten des Validierungs-Sets wurden zwischen April und November 2015 rekrutiert. Wie bereits bei der ersten Studie sind die Einschlusskriterien ein bekanntes oder vermutetes Kolorektales Karzinom mit elektiver Resektion. Notfalloperation sowie Operationen mit nicht mehr kurativer Zielsetzung sind Ausschlusskriterien. Die Studie wurde durch das Internal Review Board des Augsburger Zentralklinikums auf Basis der Empfehlung des Ethikkomitees der Landesärztekammer Bayern in Bezug auf die voraus-

gehende Studie genehmigt. Die Nummer des Ethikantrags der Studie von 2010 bei der BLÄK lautet 08015, die Nummer des IRB-Antrags lautet 2014-07.

2.2.2 Follow-up

Das Follow-up des Test-Sets wurde hauptsächlich mithilfe des klinikinternen Programms Orbis und mithilfe des Tumorregisters Augsburg durchgeführt. Bei den meisten Patienten konnte der Krankheitsverlauf mithilfe aktueller Arztbriefe nachvollzogen werden. Dabei handelte es sich sowohl um Nachsorgeuntersuchungen als auch um von der Tumorerkrankung komplett unabhängige Klinikaufenthalte. Diejenigen, zu denen wir keine aktuellen Informationen finden konnten, haben wir entweder angerufen und persönlich nachgefragt oder den Hausarzt angeschrieben, um so die benötigten Daten zu erhalten. Patienten, die bereits an dem Tumor verstorben waren, sind im Tumorregister Augsburg registriert. Letztendlich konnten wir 55 Patienten lange genug beobachten und davon erfüllten 47 die Kriterien, um in die Studie eingeschlossen zu werden.

2.2.3 Probenvorbereitung

Sofort nach der chirurgischen Resektion der Karzinome wurden die Proben frisch und unfixiert in das Institut für Pathologie gebracht. Von einem ausgewiesenen Arzt wurde unmittelbar nach dem Eintreffen das Präparat entlang der freien Taenie eröffnet, die Schleimhaut ausgespült und ein Tumorgewebezyylinder von annähernd einem Kubikzentimeter aus der invasiven Wachstumszone des Tumors mit einer frischen Skalpellklinge entnommen. Dabei wurde auf eine möglichst geringe Verletzung des Präparats geachtet, die Zeit zwischen Resektion und Probenentnahme betrug maximal 30 Minuten. In dreizehn Fällen wurde zusätzlich eine Gewebeprobe der gesunden Kolonmukosa aus der Nachbarschaft des fernen Resektionsrandes gewonnen. Das Vorhandensein von Tumorgewebe wurde durch die histologische Auswertung eines Gefrierschnitts gesichert. Unmittelbar nachdem die frischen Gewebeproben eingetroffen waren, wurden sie in einem Gefrierschrank bei minus 40 Grad Celsius eingelagert, maximal jedoch zehn Tage bis zur Analyse mittels ELISA-Test. Im Anschluss wurde in das Gewebe Methylenblau injiziert, wie in der Arbeit von Maerkl et al. beschrieben [47], um die Präparation der Lymphknoten zu erleichtern. Zum Schluss wurde das Präparat auf Kork aufgespannt und über Nacht in 10%iger gepufferter Formalinlösung fixiert. Am Folgetag erfolgte die übliche makroskopische Beurteilung und Präparation mit Einbettung von drei, wenn möglich vier Tumorböcken sowie die Böcke aus den Absetzungsrandern und aller Lymphknoten.

2.2.4 Histologie

Die histopathologische Beurteilung erfolgte durch zwei erfahrene Fachärzte der Pathologie und beinhaltet folgende Merkmale: Das Ausmaß der Tiefeninfiltration, den histologischen Differenzierungsgrad, die Blut- und Lymphgefäßinvasion sowie die Beurteilung der Resektionsränder. Um die Auffindbarkeit des Tumor Buddings zu verbessern, wurden die repräsentativen Schnitte des Tumors mithilfe des Panzytokeratinmarkers KL1 gefärbt. Näheres zur Immunhistochemie steht weiter unten im Abschnitt Tumor Budding- und Entzündungsscores.

2.2.5 Labor Assays

Für die Bestimmung der uPA- und PAI-1-Werte im malignen Gewebe wurde in der Studie von 2010 [46] ein kommerziell erhältlicher ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (uPA/PAI-1-Test (REF 899) von American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland genutzt. Bei den neuen Proben wurde ein ELISA-Test von Sekisui Diagnostics, Stanford, CA angewendet, hierbei handelt es sich um den gleichen Test, American Diagnostica ist in der Zwischenzeit in Sekisui Diagnostics übergegangen. Dieser Test ist bisher nur für die Nutzung bei Brustkrebs zertifiziert. Der Test wurde, wie vom Hersteller in der beiliegenden Anleitung empfohlen, durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden die gefrorenen Gewebeproben mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät (Ultra Turrax, Jahnke & Kunkel, Staufen, Deutschland) unter ständiger Kühlung mechanisch zerkleinert. Darauf folgend wurden mit dem 4 bis 8 Grad Celsius warmen Tri-Puffer, angereichert mit der nicht-ionischen Detergenz Triton X-100, das Zytoplasma der Tumorzellen zusammen mit den Proteinen der Zellmembran und der Zellorganellen extrahiert. Die daraus entstandene Suspension wurde mit 23.000 g für 60 Minuten zentrifugiert, um die flüssigen Anteile vom Zellschrott zu trennen. Die absolute Proteinkonzentration der Zytosolfraktion wurde mithilfe des Pierce BCA Protein Kits (Prod. Nr.: 23227, Pierce Biotechnology, Rockford) gemessen. Am ersten Tag wurde in Lösung gebrachter Gewebeextrakt zu den uPA- und PAI-1-Antikörper besetzten Mikrotitervertiefungen gegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden in einer 4 Grad Celsius warmen, geschlossenen, feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Am Tag zwei wurden die Detektionsantikörper in die Mikrotitervertiefungen pipettiert. Nach Inkubation wurden die Enzymkonjugate ebenfalls dazugegeben und erneut inkubiert. Nach der 20-minütigen Substratinkubation wurde die Reaktion mit 0,5 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption der Lösung mit einem Fotometer bei 450 nm gemessen. Die Höhe der uPA- und PAI-1-Werte werden in Nanogramm pro Milligramm (ng/mg) Tumorprotein angegeben. Um passende Grenzwerte auszuwählen, wurden zwei

verschiedene Annahmen verfolgt. Bei der ersten Annahme wurde eine positive Korrelation zwischen aggressivem Verlauf und den uPA- und PAI-1-Werten vermutet. Die zweite war, dass ungefähr 35 % der Patienten mit Kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten fünf Jahre sterben. In Folge dessen wurde entschieden, dass die Grenzwerte zwischen den unteren zwei Dritteln und dem oberen Drittel der Spannweite liegen sollten. Die Analyse der Daten brachte als Ergebnis, dass die Werte $\geq 4\text{ng/mg}$ für uPA und $\geq 40\text{ng/mg}$ für PAI-1 liegen sollten. Um Spezifität und Sensitivität der Grenzen zu überprüfen, wurde eine ROC(receiver operating characteristics)-Kurvenanalyse durchgeführt.

2.2.6 Tumor Budding, Immunhistochemie und Entzündungsscores

Tumor Budding wird in der vorliegenden Arbeit als das Auftreten von bis zu vier zusammenhängenden Tumorzellen an der invasiven Front des Tumors definiert. Als Vorlage diente die Publikation von Ueno et al. [44]. Das Auftreten von mehr als neun solcher Foki innerhalb eines Mikroskopierfeldes bei 20-facher Vergrößerung wurde ursprünglich als hochgradiges Tumor Budding klassifiziert. Für die Befundung der Schnitte wurde in der vorliegenden Studie ein Mikroskop mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung, sowie ein Okular mit der Feldnummer 25 genutzt. Dementsprechend konnte eine Fläche von $1,3\text{mm}^2$ eingesehen werden, so dass der ursprünglich angegebene Wert von 9 Foki pro $0,385\text{mm}^2$ auf > 30 Foki pro $1,3\text{mm}^2$ angepasst werden musste. Um sicherzustellen, dass auch einzelne sowie kleinere Ansammlungen von Tumorzellen entdeckt werden, wurden jeweils die für den Tumor repräsentativen Schnitte immunhistochemisch gefärbt um Cytokeratin nachzuweisen. Sämtliche Reaktionen wurden mit dem Ventana-Benchmark-Ultra-System durchgeführt. Die Cell Conditioning Solution (CC1) der Firma Ventana - Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) wurde für die Vorbehandlung der Schnitte verwendet. Der diagnostische Antikörper KL1 (Maus, monoklonal, 1:100) wurde von Medac, Wedel, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die Immunreaktion wurde entwickelt, indem ein gekennzeichnetes Streptavidin-Biotin-System genutzt wurde (DAKO Real Detection System). Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unabhängig voneinander durch zwei erfahrene Pathologen (Prof.Dr. Bruno Märkl und Dr. Tina Schaller). Alle diskrepanten Fälle wurden am Diskussionsmikroskop reevaluiert und eine Konsensusdiagnose gestellt. Chronische und akute peritumorale Inflammation wurde als Reaktion mit hauptsächlich lymphozytärer oder granulozytärer Infiltration definiert. Es wurde ein semiquantitatives, dreistufiges System veranschlagt: Keine oder milde Entzündung mit entweder keinen oder verstreuten Entzündungszellen (1), Moderate Entzündung mit ausgeprägter Reaktion (2) und starke Entzündung mit dichter Akkumulation von Lymphozyten oder

eine abszessähnliche Entzündung (3).

2.2.7 Statistik

Zum Vergleich zwischen den Spiegeln von uPA und PAI-1 im gesunden und im kranken Gewebe sowie um Unterschiede zwischen den Spiegeln nach Dichotomisierung gemäß herkömmlichen histopathologischen Eigenschaften festzustellen, wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test genutzt. Die Korrelation zwischen numerischen Werten von uPA, PAI-1 und Tumor Budding wurden mittels dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt. Der Zusammenhang zwischen den dichotomisierten Werten (z.B. Grading oder Proteasen über bzw. unter dem Grenzwert) und bereits aufgetretenen Metastasen wurde mit dem Fisher-Exact-Test oder dem Chi-Quadrat-Test bestimmt, je nach Häufigkeit der untersuchten Ereignisse. Für die Berechnung und Darstellung von Überlebensdaten nutzten wir Kaplan-Meyer-Kurven, für die Analyse von Unterschieden den Log-Rank-Test.

Abschließend wurde eine multivariable Analyse mittels der umgekehrten stufenweisen logistischen Regression durchgeführt, um unabhängige, prädiktive Faktoren eines metastasierten Stadiums zu identifizieren. Das Cohens Kappa Maß wurde berechnet, um die Interrater-Reliabilität bei der Beurteilung des Tumor Buddings einzuschätzen. Die gesamten Daten wurden mit der SigmaPlot 13.0-Software (Systat Software Inc., Richmond CA) bearbeitet. Das Signifikanzniveau wurde mit $< 0,05$ festgelegt. Alle Mittelwerte werden mit \pm einer Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Test-Set: Patienten und Follow-up

Die Studie beinhaltet 55 Fälle mit Kolorektalem Karzinom. Davon erfüllten 47 die Kriterien der Survival Analyse. Die grundlegenden klinisch-pathologischen Daten wurden schon weiter oben beschrieben und sind noch einmal in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Klinisch-pathologische Daten des Test-Sets

	Maligne (n = 55)	Nicht-Maligne (n = 4)
Mittleres Alter \pm SD	71 \pm 13	68 \pm 8
Geschlecht (m : f)	0.57 : 1	0.33 : 1
rechtes Kolon	19	3
linkes Kolon	36	1
pT 1/2	16	/
pT 3/4	39	/
Low/moderate Grade	39	/
High Grade	16	/
LK positiv	21	/
Venöse Invasion	6	/
Fernmetastasen	7	/
Mittlere LK-Anzahl \pm SD	33 \pm 18	19 \pm 6
SD = Standardabweichung, LK = Lymphknoten		

Der mediane Beobachtungszeitraum für das Follow-Up betrug 75 und 80 Monate (95%-CI: 76.9 – 83.1) (Abb.: 3.1).

3.2 Test-Set: Krankheitsspezifisches Überleben (CSS)

Das Krankheitsspezifische Überleben unterschied sich nicht zwischen Fällen mit niedrigen und Fällen mit hohen uPA-Spiegeln mit einer mittleren Überlebenszeit von 80 Monaten (95%-KI: 70 – 91) beziehungsweise 76 Monaten (95%-KI: 59 – 94) ($P = 0.735$) (Abb.: 3.2).

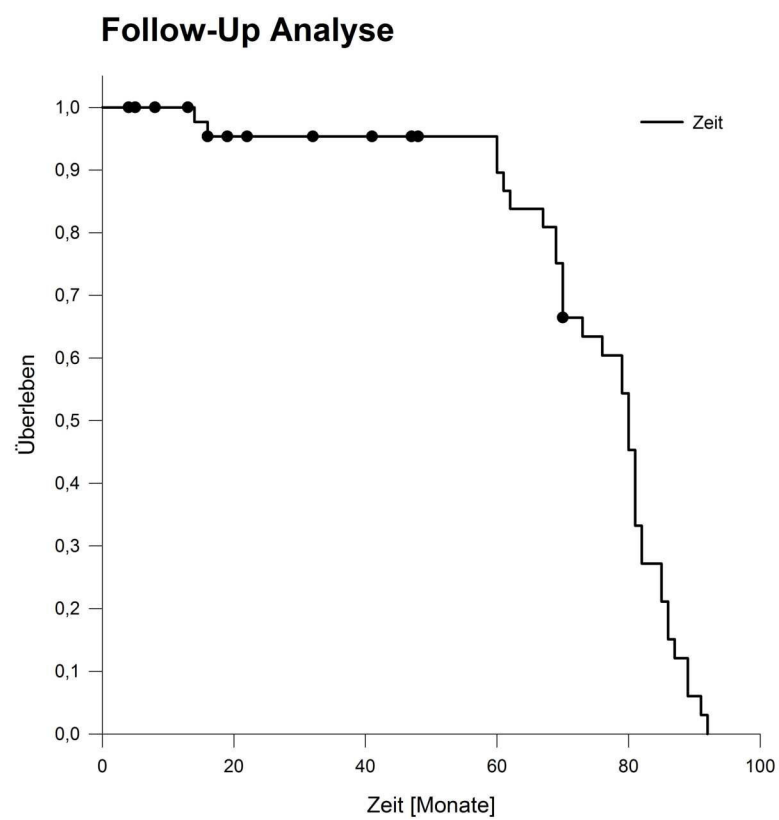


Abbildung 3.1: Follow-up-Analyse [48]

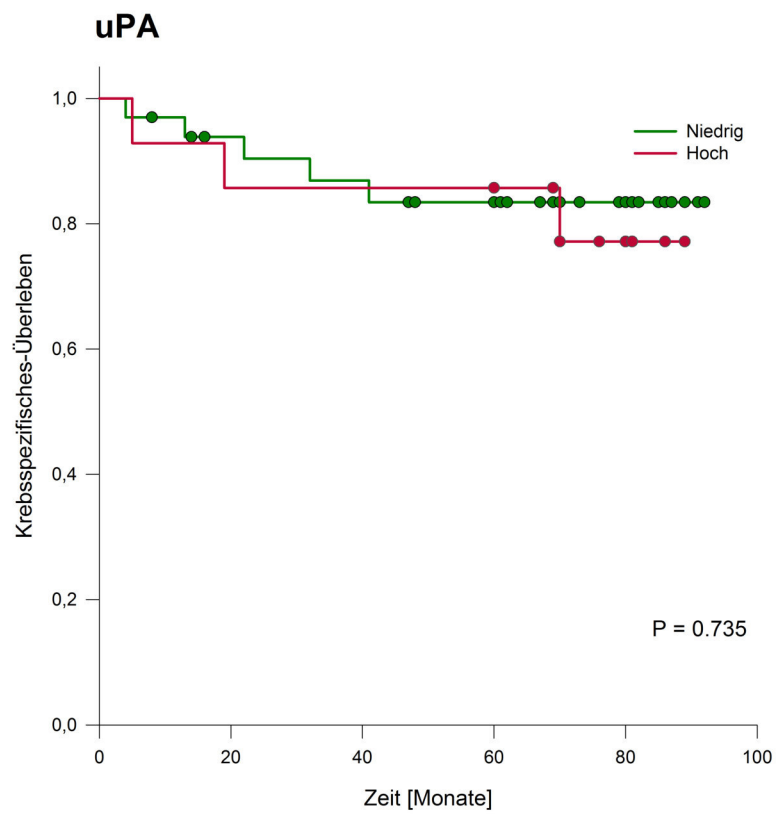


Abbildung 3.2: uPA Krebspezifisches Überleben

Jedoch fand sich ein klarer Trend für einen Zusammenhang bezüglich des Überlebens bei PAI-1. Fälle mit hohen PAI-1-Spiegeln zeigten ein mittleres Überleben von 68 Monaten (95%-KI: 47 – 89) im Vergleich mit Fällen mit niedrigen PAI-1-Spiegeln mit einer mittleren Überlebenszeit von 83 Monaten (95%-KI: 74 – 93) ($P = 0.091$) (Abb.: 3.3).

Hochgradiges Tumor Budding ging ebenfalls mit einer verminderten Überlebenszeit einher, mit einer mittleren Überlebenszeit von 71 Monaten (95%-KI: 53 – 89) im Vergleich zu 83 Monaten (95%-KI: 73 – 93) bei schwach ausgeprägtem oder nicht vorhandenem Budding ($P = 0.187$). Obwohl dieser Unterschied nicht signifikant ist, zeigt die Kaplan-Meier-Kurve einen Trend für die Gruppe mit niedrigem oder nicht vorhandenem Tumor Budding. Durch die Kombination der beiden Parameter Tumor Budding und PAI-1 zeigte die Analyse einen signifikanten Unterschied im krebsspezifischen Überleben zwischen den Probanden mit keinem oder einem vorhandenen Merkmal und den Probanden mit beiden Merkmalen. Im Endeffekt überlebten diejenigen mit maximal einem positiven Merkmal durchschnittlich 83 Monate (95%-KI: 74 – 91), wohingegen diejenigen mit zwei positiven Merkmalen nur 60 Monate (95%-KI: 29 – 91) überlebten ($P = 0.021$). Die Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Mit Hilfe einer Multivariaten Analyse wurden die Prognosefaktoren N-Stadium, V-Stadium, PAI-1, Tumor Budding und die oben beschriebene Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur das N-Stadium einen unabhängigen prognostischen Wert hat. Die Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 verfehlte das Signifikanzniveau zum Einschluss in das Modell mit $P = 0.057$ allerdings nur knapp.

3.3 Validierungs-Set: Patienten und Korrelation zwischen uPA, PAI-1 und Tumor Budding

Das Validierungs-Set beinhaltet 68 Fälle mit kolorektalen Karzinomen. Die klinisch-pathologischen Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Die durchschnittlichen Spiegel für uPA waren $4.0 \pm 2.2 \text{ ng/mg}$, die Werte für PAI-1 $38.1 \pm 33.7 \text{ ng/mg}$. Beide Parameter zeigten eine starke Korrelation zueinander ($R = 0.709$; $P < 0.001$) (Abb. 3.5).

Hingegen zeigte sich bei dieser Testung keine signifikante Korrelation zwischen Tumor Budding und uPA beziehungsweise PAI-1 ($R = 0.08$ und $R = 0.218$) (Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

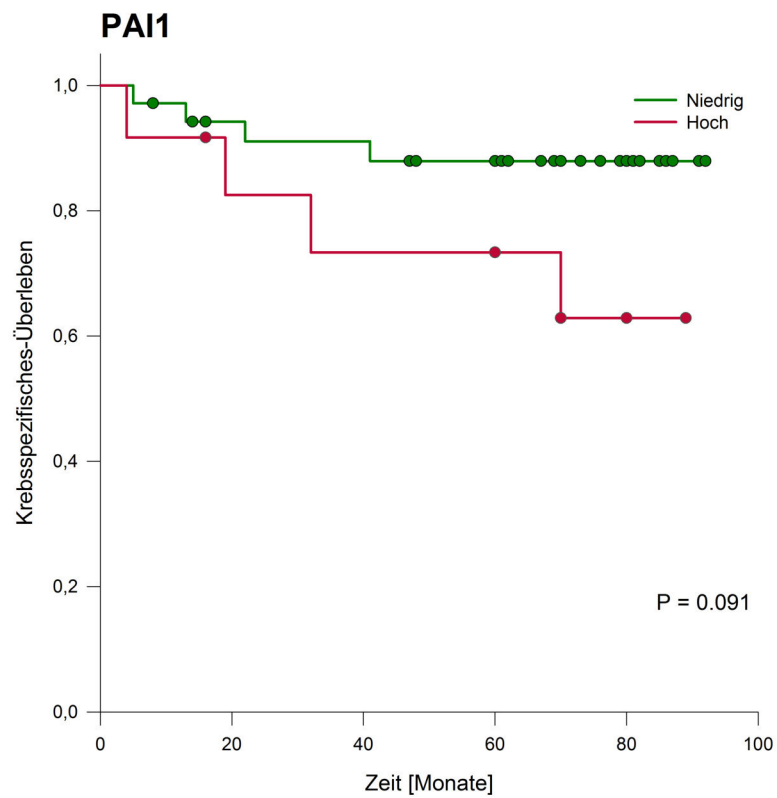


Abbildung 3.3: PAI-1 Krebspezifisches Überleben

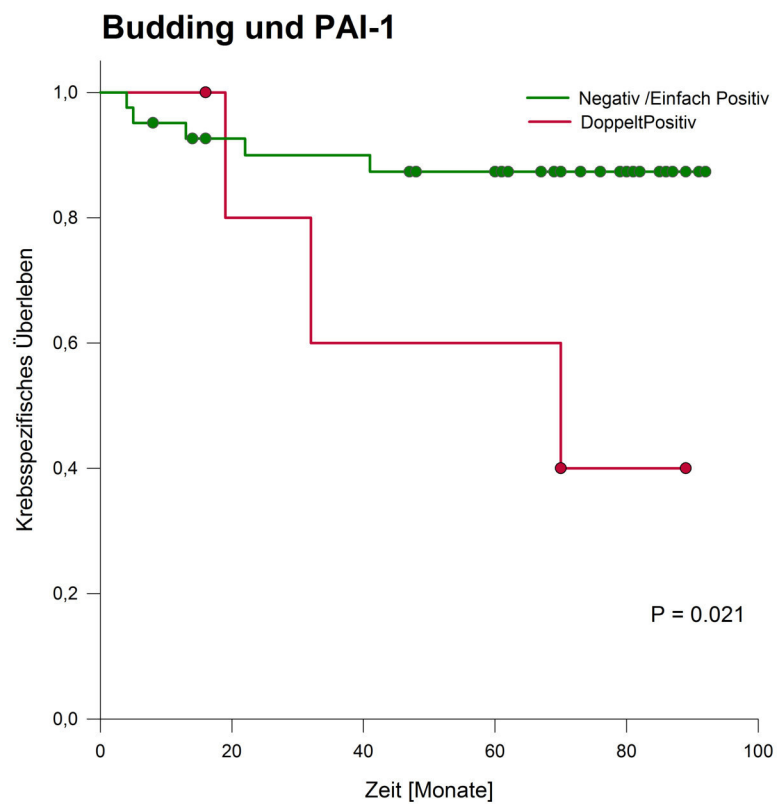


Abbildung 3.4: Budding und PAI-1

3 Ergebnisse

Tabelle 3.2: Klinisch-pathologische Daten des Validierungs-Sets

	Gesamt- kollek- tiv	uPA niedrig	uPA hoch	P-Wert	PAI-1 niedrig	PAI-1 hoch	P-Wert	Tumor Bud- ding niedrig n = 51	Tumor Bud- ding hoch n = 17	P-Wert
Mittleres Alter ± SD	n = 68 68 ± 11	n = 40 68 ± 10	n = 28 67 ± 12	1.0	n = 44 68 ± 11	n = 24 67 ± 12	0.753	69 ± 11	64 ± 11	0.091
Geschlecht m : f	1 : 0.9	1 : 0.74	1 : 1.15	0.514	1 : 0.7	1 : 1.14	0.262	1 : 1.2	1 : 0.3	0.05
rechtes Kolon	32(47%)	17(43%)	15(54%)		21(48%)	11(46%)		26(51%)	6(35%)	
linkes Kolon	18(26%)	11(28%)	7(25%)		9(20%)	9(38%)		16(31%)	2(12%)	
totales Kolon	3(4%)	1(3%)	2(7%)	0.462*	1(2%)	2(8%)	0.103*	1(2%)	6(12%)	0.029*
Rektum	15(22%)	11(28%)	4(14%)	0.319**	13(30%)	2(8%)	0.087**	8(16%)	7(41%)	0.043**
pT 1/2	16(24%)	13(33%)	3(11%)		16(36%)	0(0%)		14(27%)	2(12%)	
pT 3/4	52(76%)	27(68%)	25(89%)	0.073	28(64%)	24(100%)	0.002	37(73%)	15(88%)	0.322
low	53(78%)	36(90%)	17(61%)		39(89%)	14(58%)		41(80%)	12(71%)	
Grade high	15(22%)	4(10%)	11(39%)	0.01	5(11%)	10(42%)	0.01	10(20%)	5(29%)	0.501
Grade LK po- sitiv	38(56%)	21(53%)	17(61%)	0.404	22(50%)	16(67%)	0.286	25(49%)	13(76%)	0.091
Venöse Invasi- on	11(16%)	6(15%)	5(18%)	0.319	6(14%)	5(21%)	0.500	5(10%)	6(35%)	0.022
Fern- meta- stasen	13(19%)	5(13%)	8(29%)	0.124	6(14%)	7(29%)	0.195	5(10%)	8(47%)	0.002
Mittlere LK- Anzahl ± SD	43 ± 17	44 ± 20	42 ± 12	0.837	42 ± 19	45 ± 13	0.068	43 ± 18	42 ± 16	0.949
Neo- adju- vante Thera- pie	7(47%)* 4(36%)		3(75%)	0.282***	6(46%)	1(50%)	1.000***	3(38%)	4(57%)	0.619***

SD = Standardabweichung, LK = Lymphknoten, *Berechnung beinhaltet alle Lokalisationen (rechts, links, total, Rektum), **Rektum- vs. nicht-Rektumkarzinome, ***Basis: Anzahl an Rektumkarzinomen

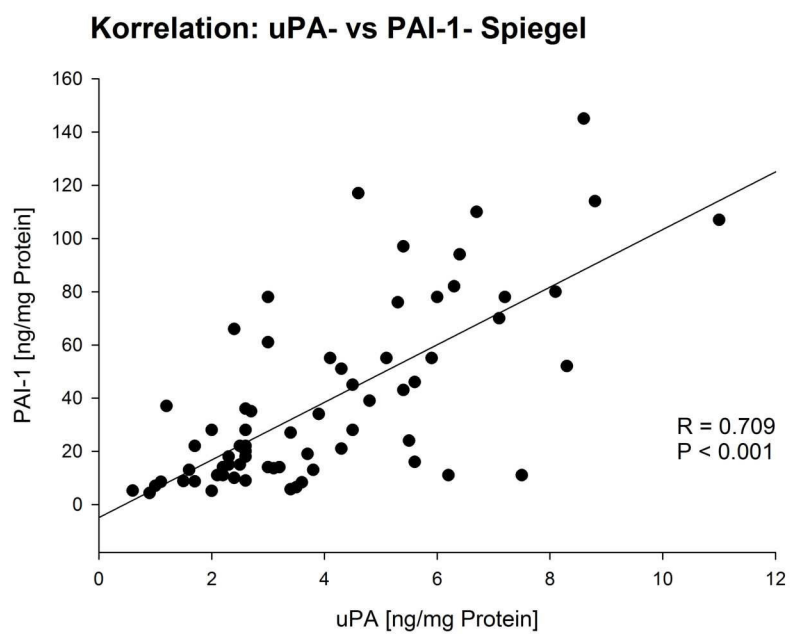


Abbildung 3.5: Korrelation uPA- vs PAI-1-Spiegel

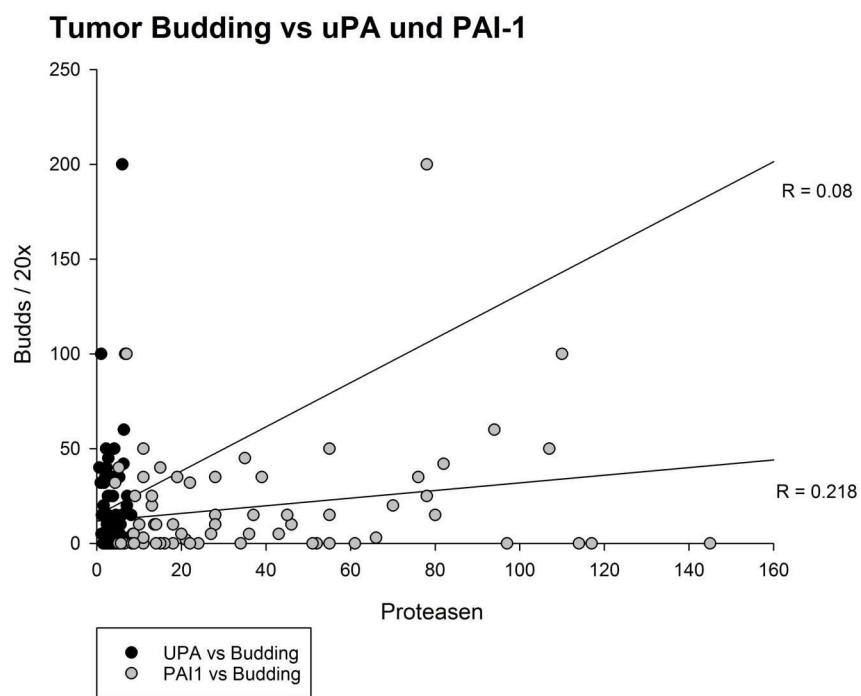


Abbildung 3.6: Tumor Budding vs uPA und PAI-1 a

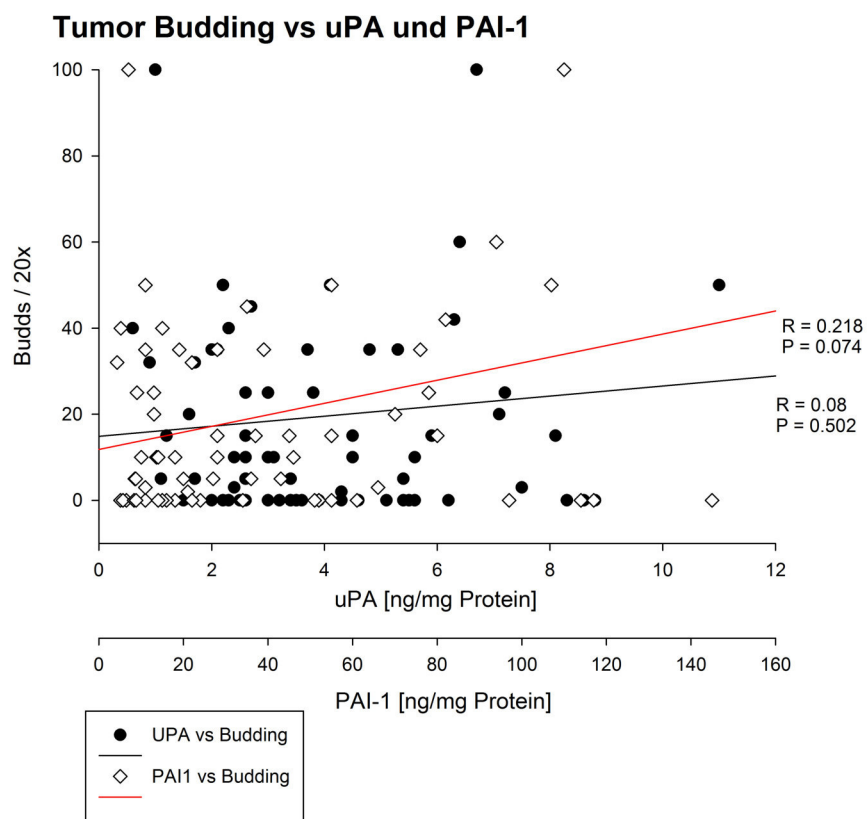


Abbildung 3.7: Tumor Budding vs uPA und PAI-1 b

3.4 Validierungs-Set: Proteasen-Level und Tumor Budding entsprechend anderer histopathologischer Faktoren

Bei dem Vergleich der Fälle mit Gefäßinvasion mit den Fällen ohne war weder uPA noch PAI-1 mit dem Auftreten von Gefäßeinbrüchen assoziiert (Abb. 3.8 und Abb. 3.9).

Mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen war uPA ebenfalls nicht assoziiert (Abb. 3.10). Bei PAI-1 hingegen zeigte sich bei dieser Untergruppe ein signifikanter Unterschied mit gemittelt 35.5ng/mgP rotein bei den Lymphknoten-Positiven zu 16.5ng/mgP rotein bei den Lymphknoten-Negativen ($P = 0.043$) (Abb. 3.11).

Die uPA-Spiegel im Tumorgewebe steigen mit dem pT-Stadium, so dass sich die höchsten Werte mit über 10 ng uPA /mg Protein bei pT4-Karzinomen finden ($P = 0.007$; Abb.3.12). pT1-Tumore fallen in dieser Arbeit durch eine größere Streuung auf. Bei PAI-1 ist das Ergebnis noch deutlicher, hier steigt die Konzentration proportional zum pT-Stadium, ebenfalls mit den höchsten Werten bei pT4-Karzinomen. ($P < 0.001$; Abb. 3.13) Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Untersuchung der Proteasenspiegelh Abhängigkeit des Gradings ($P < 0.001$; Abb. 3.14 und $P = 0.007$; Abb. 3.15).

Des Weiteren wurde eine nicht signifikante Tendenz zu höheren PAI-1-Spiegeln bei Patienten mit metastasiertem Karzinom gefunden ($P = 0.153$; Abb. 3.16). uPA hingegen zeigte keinen Zusammenhang (Abb. 3.17).

Innerhalb der ersten Bewertung des Test-Sets wurden die Grenzwerte für uPA und PAI-1 festgelegt und dem entsprechend wurden die klinisch-pathologischen Daten eingeordnet. Zusammen mit den Daten des Tumor Buddings sind sie in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Vergleich der Ergebnisse: Test-Set vs. Validierungsset

	uPA			PAI-1			Tumor budding	
	Test-Set Mittelwerte	Val.-Set Mittelwerte	Val.-Set cut off	Test-Set Mittelwerte	Val.-Set Mittelwerte	Val.-Set cut off	Test-Set Mittelwerte	Val.-Set cut off
Grading	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	N
T-Stadium	N	Y	T	N	Y	Y	N	N
N-Stadium	N	N	N	N	Y	N	Y	T
V-Stadium	N	N	N	Y	T	N	N	Y
M-Stadium	Y*	T	T	Y*	T	Y	Y*	Y

Y = Statistisch prognostisch; N = Statistisch nicht prognostisch; T = Trend in Richtung prognostischer Relevanz; grüner Hintergrund = Übereinstimmung zwischen Test- und Validierungs-Set; roter Hintergrund = keine Übereinstimmung zwischen Test- und Validierungs-Set; *Evaluation in Bezug auf die cut-off Stratifizierung

Hier zeigte sich eine eindeutige Tendenz zu mehr lokal fortgeschrittenen Tumoren (68% vs. 89%; $P = 0.07$) und einer signifikant höheren Rate an gering differenzierten Tumoren (10% vs. 39%; $P 0.01$) in der Gruppe mit hohen uPA-Spiegeln. Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei den Patienten mit hohen PAI-1-Spiegeln, sowohl im Zusammenhang mit lo-

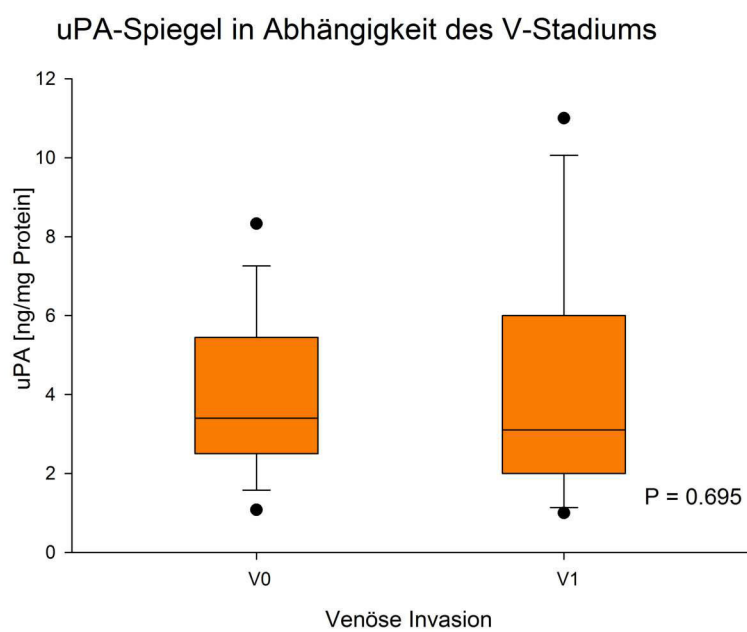


Abbildung 3.8: uPA-Spiegel in Abhängigkeit des V-Stadiums

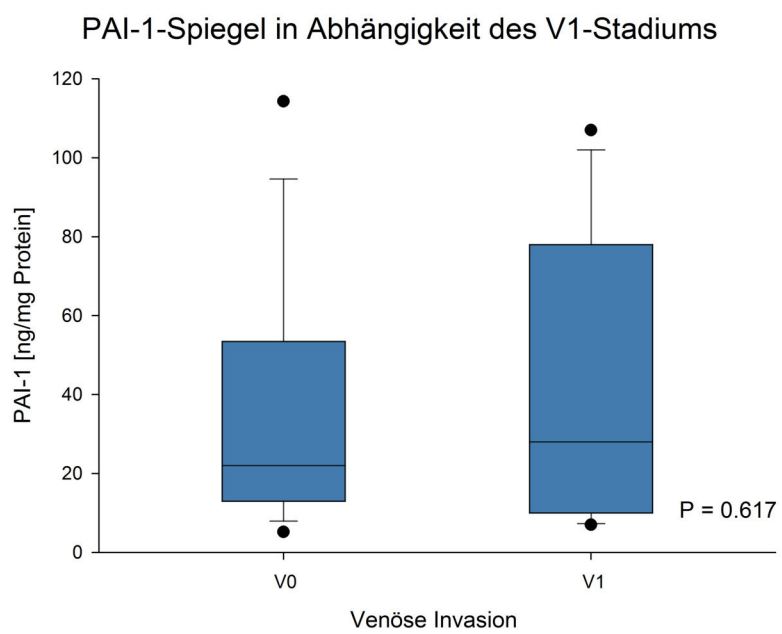


Abbildung 3.9: PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des V1-Stadiums

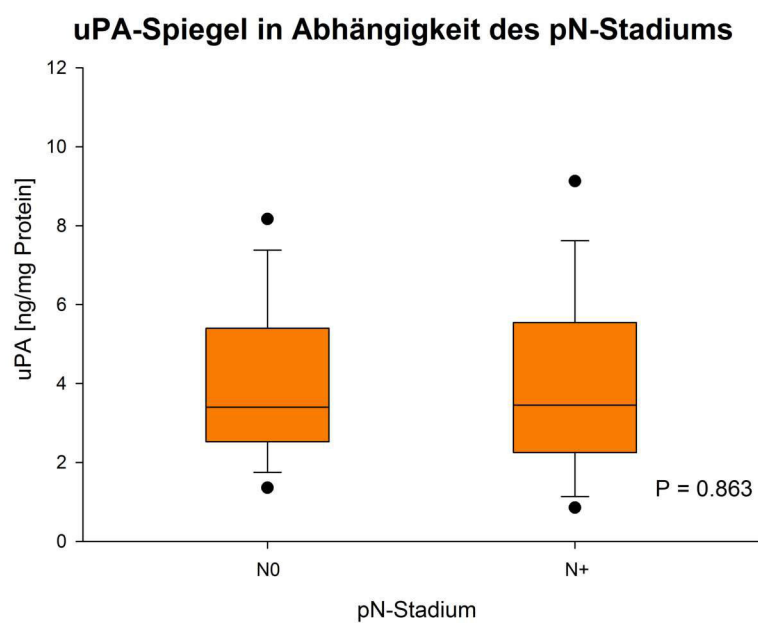


Abbildung 3.10: uPA-Spiegel in Abhängigkeit des pN-Stadiums

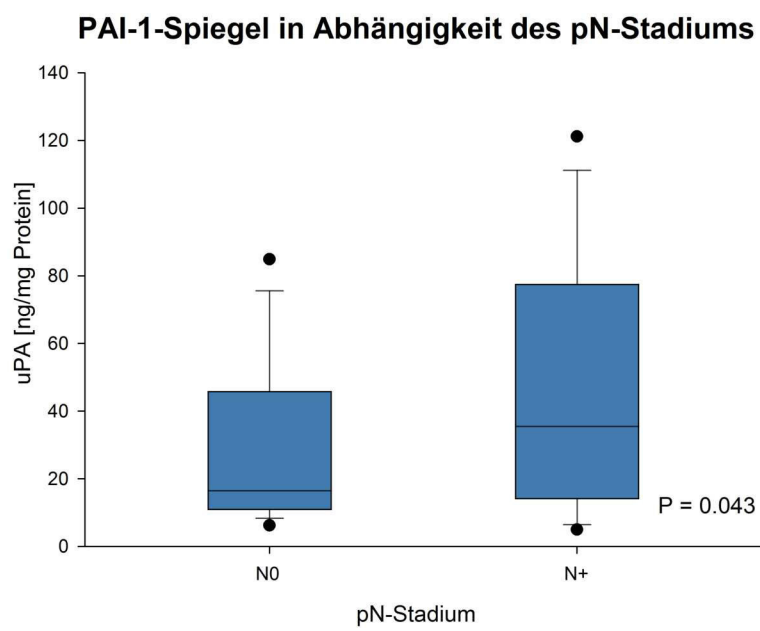


Abbildung 3.11: PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des pN-Stadiums

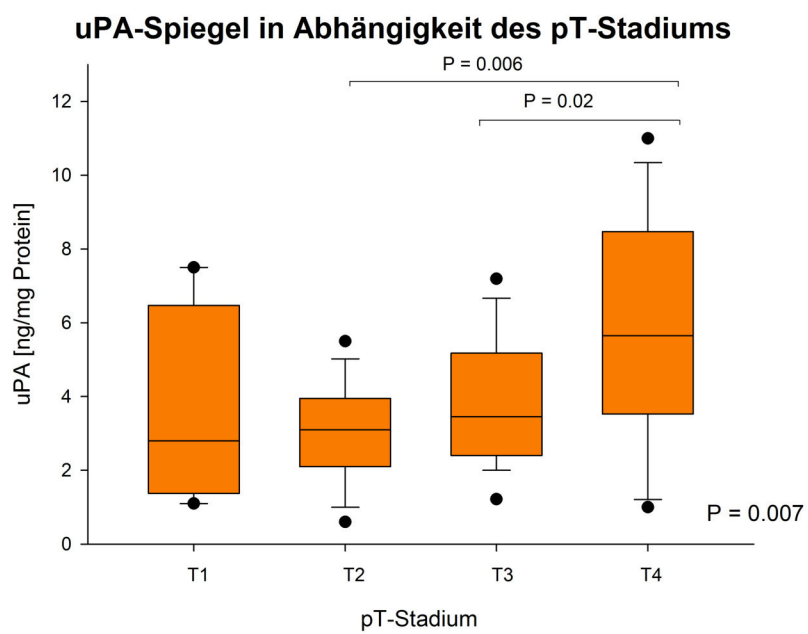


Abbildung 3.12: uPA-Spiegel in Abhängigkeit des pT-Stadiums

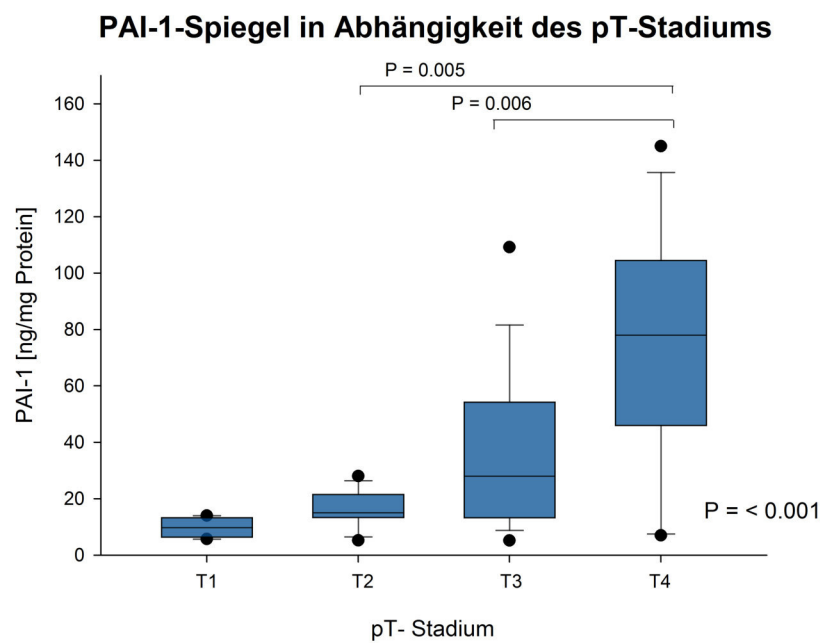


Abbildung 3.13: PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des pT-Stadiums

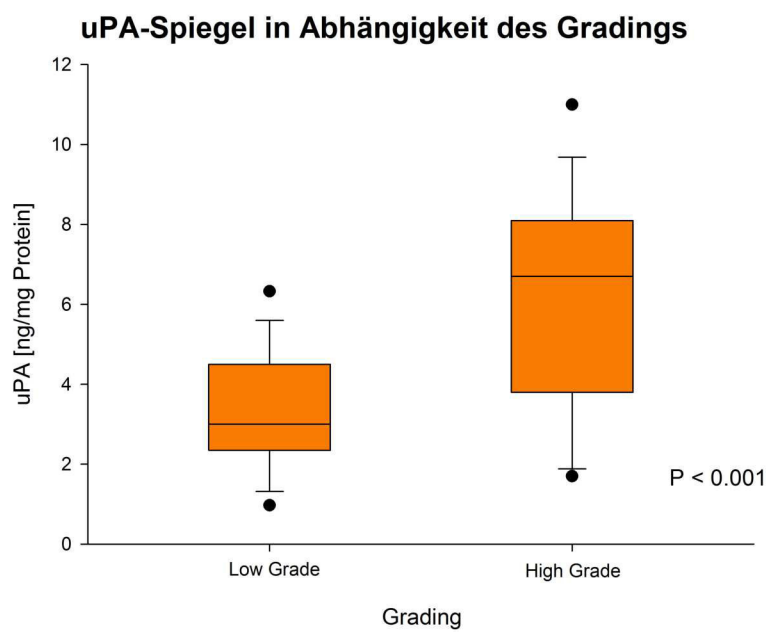


Abbildung 3.14: uPA-Spiegel in Abhängigkeit des Gratings

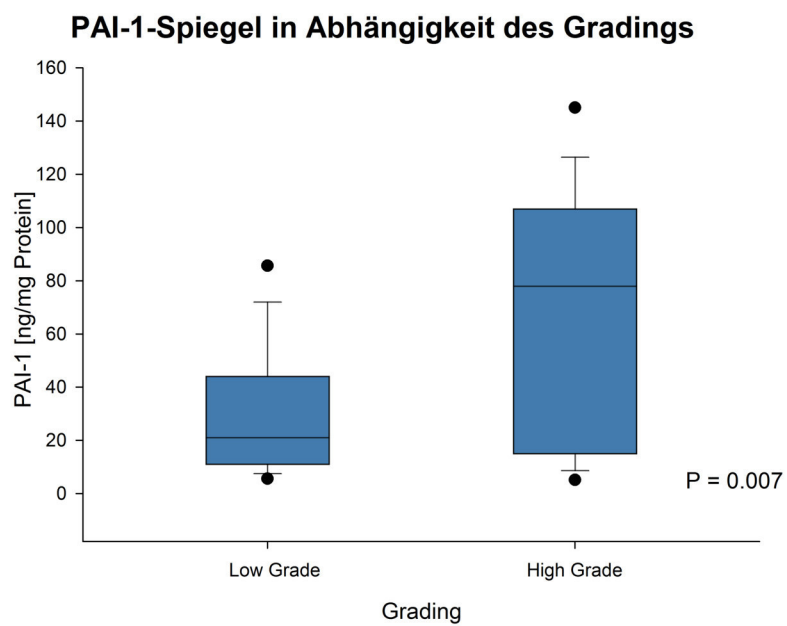


Abbildung 3.15: PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des Gratings

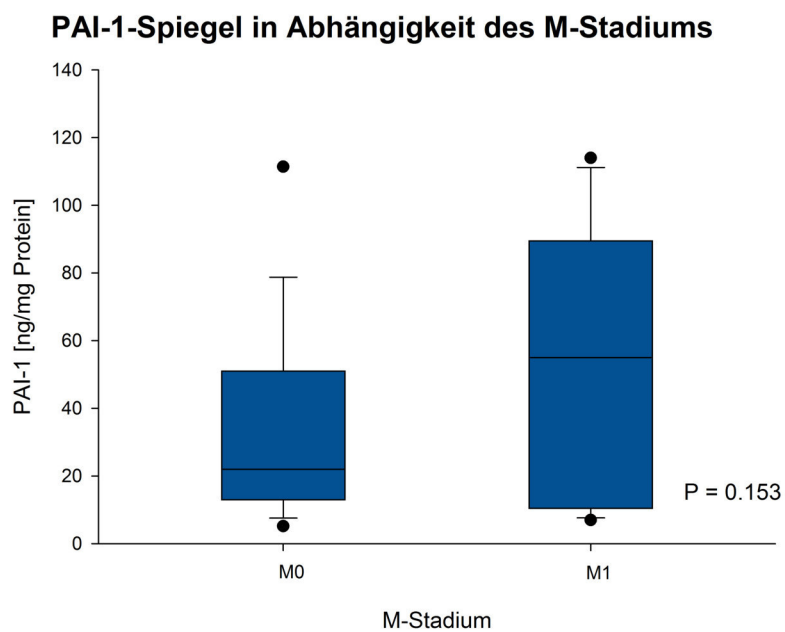


Abbildung 3.16: PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des M-Stadiums

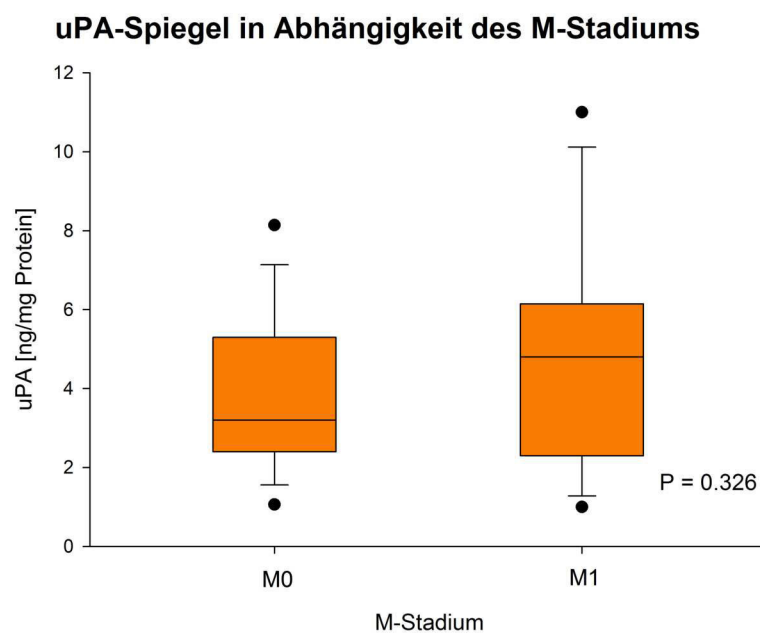


Abbildung 3.17: uPA-Spiegel in Abhängigkeit des M-Stadiums

kal fortgeschrittenen Tumoren (63% vs. 100%; $P = 0.002$), als auch mit den hochgradigen Tumoren (50% vs. 67%; $P = 0.01$).

Bei hochgradigem Tumor Budding ist ein klarer Trend bezüglich einem höheren Prozentsatz von Männern ($P = 0.05$) und einem höheren Prozentsatz von Lymphknotenmetastasen (50% vs. 76%; $P = 0.091$) zu erkennen. Bei linksseitig lokalisierten Karzinomen (49% vs. 65%; $P = 0.029$), venöser Invasion (10% vs. 65%; $P = 0.022$) und Erkrankten mit Metastasen (10% vs 47%; $P = 0.002$) tritt hochgradiges Tumor Budding signifikant häufiger auf.

3.5 Gepoolte Daten

Zur Berechnung des Risikos für das Auftreten von Fernmetastasen in Abhängigkeit der Proteasen-Spiegel, des Tumor Buddings und weiterer Parameter wurden die Datensätze gepoolt. Es wurde die Abhängigkeit der Fernmetastasen von dem pT-Stadium, dem pN-Stadium, dem V-Stadium, dem PAI-1-Spiegel, dem uPA-Spiegel, dem Tumor Budding und von der Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 berechnet (Abb. 3.18).

Dabei konnten für die Parameter pT-Stadium, pN-Stadium, V-Stadium, PAI-1-Spiegel, Tumor Budding und der Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 signifikante, für die Prognose von Fernmetastasen wertvolle Effekte festgestellt werden. Die jeweils korrespondierenden Odds-Ratios sind für das pT-Stadium inf., für das pN-Stadium 30.8, für das V-Stadium 21.3, für den PAI-1-Spiegel 4.1, für das Tumor Budding 6.7 und für die Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 13.5. Lediglich der uPA-Spiegel verfehlte die Signifikanz knapp mit $P = 0.051$ und einer Odds-Ratio von 3.5. Die multivariate Analyse deckte die Faktoren pN-Stadium, V-Stadium und die Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 als unabhängige Prognoseparameter für das Auftreten von Fernmetastasen auf.

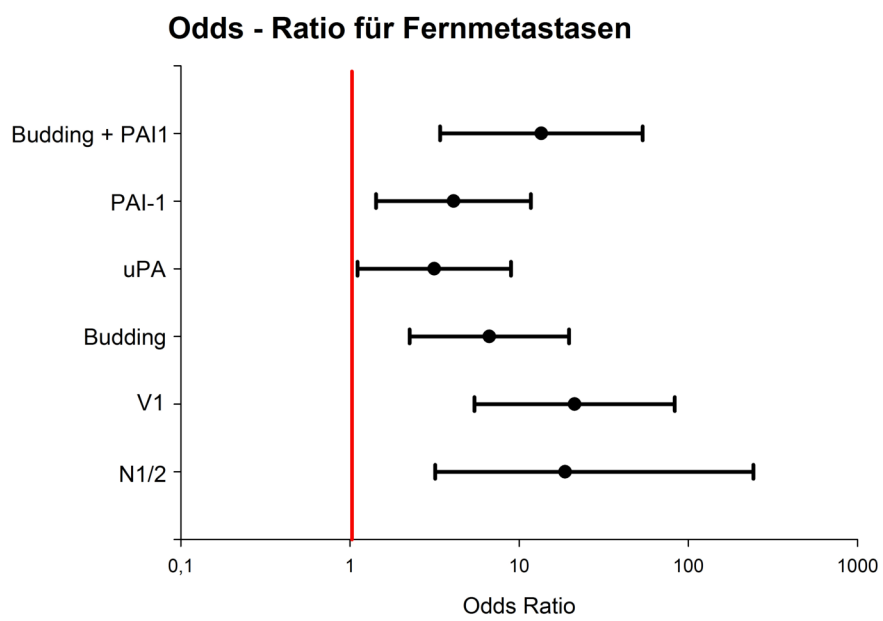


Abbildung 3.18: Odds-Ratio für Fernmetastasen

4 Diskussion

Zum einen beschäftigten wir uns in dieser Arbeit mit der Nachbeobachtung von 47 Patienten mit Kolonkarzinomen, die 2007/08 operiert wurden und in die Studie von Märkl et al. [46] einbezogen waren, um die Rolle von uPA, PAI-1 und Tumor Budding bei Kolonkarzinomen zu untersuchen. Zum anderen untersuchten wir weitere 68 Patienten mit kolorektalen Karzinomen auf den Zusammenhang von uPA, PAI-1 und Tumor Budding mit aggressivem Verhalten der Tumore, um die Ergebnisse der ersten Studie zu überprüfen.

Die Relevanz von Biomarkern in der Diagnostik und Therapie von kolorektalen Karzinomen zeigt sich auch durch die Bestrebung, das Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) zu bilden. Das CRCSC konnte sich nach der Analyse von sechs verschiedenen unabhängigen Klassifikationssystemen aufgrund gemeinsamer Parameter aufier Consensus Molecular Subtypes (CMS 1 (MSI Immune), CMS 2 (Canonical), CMS 3 (Metabolic), CMS 4 (Mesenchymal)) einigen [49]. Guinney et al. hält das CMS-System aktuell für das stabilste Klassifikationssystem bei kolorektalen Karzinomen, da es verschiedenste molekulare Marker wie MSI, KRAS, BRAF, APC-Mutationen und viele weitere metabolische, immunologische und Signaturmerkmale vereint [49]. In diesem Sinn können uPA, PAI-1 und Tumor Budding einen Beitrag zu präziseren Klassifikationssystemen beitragen.

Von den 55 Patienten, die an der Studie von 2010 [46] teilgenommen haben, konnten 47 lange genug beobachtet werden, um in diese Arbeit einbezogen zu werden. Zu den restlichen 7 Patienten konnte leider kein Kontakt hergestellt werden, so dass wir keine Daten über deren Erkrankung und einer eventuellen Progression gewinnen konnten. Im Median konnten wir unsere Patienten 80 Monate lang beobachten. Nach sechs Jahren rezidivfreien Überlebens ist selbst bei höhergradigen Tumoren die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass der Patient auch langfristig tumorfrei bleibt. Das entspricht auch der aktuellen Leitlinie Kolonkarzinom [8], in der die 5-jährige Koloskopie vor allem zur Erkennung von Zweittumoren unabhängig des Erstereignisses empfohlen wird. Bei der Analyse der Überlebensraten des ersten Kollektivs stellten wir bei den Patienten mit hohen PAI-1-Konzentrationen und hochgradigem Tumor Budding einen nicht signifikanten Trend hin

zu einem schlechteren Krankheitsverlauf fest. Die Kombination aus Tumor Budding und PAI-1 ist prognostisch signifikant hinsichtlich des krebsspezifischen Überlebens. Diese Tatsache unterstützt unsere These, dass durch die Interaktion beider Faktoren die Tumormprogression sowie die Ausbreitung einzelner Tumorzellen im Körper gefördert wird. Bis auf die Arbeit von Märkl et al. [46] konnten wir bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Arbeiten finden, die sich mit der Interaktion von PAI-1 und Tumor Budding befassen, so dass dieses Thema einen interessanten Bereich für zukünftige Forschung darstellt. Bei Tumor Budding lässt sich ein Verlust von E-Cadherin feststellen, einem Calcium-abhängigen transmembranen Adhäsionsprotein, dass neben seiner Aufgabe als Zell-Zellverbindung im Komplex mit Beta-Catenin auch an dem Wnt-Signalweg beteiligt ist. Durch die fehlende Adhäsion sowie den mesenchymalen Phänotyp der Zellen findet eine Ablösung von dem Haupttumor statt, wodurch die Metastasierungsneigung bei Tumor Budding erklärt wird [50], [51], [52], [53], [54]. Andere Autoren haben vergleichbare Zusammenhänge zwischen Tumor Budding und anderen Faktoren des Plasminogen-Systems beschrieben, so berichtete Sanchez-Tillo et al. erst kürzlich, dass das Protein ZEB1 uPA und PAI-1 in unterschiedliche Richtungen reguliert. Es induziert uPA und inhibiert PAI-1. ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) unterdrückt die T-Lymphozyten-spezifische IL2-abhängige Genexpression und kann verstärkt in dedifferenzierten Zellen an der invasiven Front des Tumors nachgewiesen werden [55]. Die Kombination einer uPA-Überexpression mit dem Verlust von E-Cadherin und APAF-1 in Tumorzellen ist laut Minoo et al. mit einem aggressiven Phänotyp und einem infiltrativen Wachstumsmuster verbunden [56]. Hiendelmeyer et al. fand heraus, dass die höchsten uPA-Spiegel an der invasiven Front des Tumors zu finden sind, dies beruht auf der Hochregulation der Protease durch Beta-Catenin [57]. Bei der Untersuchung der Patientengruppe von 2010 fiel uns eine starke Korrelation zwischen uPA, PAI-1 und Tumor Budding auf. Trotzdem zeigten die Ergebnisse bei den Probanden der Validierungsstudie nur eine marginale Signifikanz bei schwacher Korrelation zwischen PAI-1 und Tumor Budding. Ermittelt wurden die mittleren PAI-1- sowie uPA-Spiegel in den Fällen mit hochgradigem Tumor Budding. Bei der Auswertung der Ergebnisse der Studie von 2010 fiel uns ein Zusammenhang zwischen den Spiegeln von uPA und PAI-1 im Tumorgewebe und histopathologischen Merkmalen auf, welche ein aggressives Verhalten des Tumors anzeigen. Unter den aggressiven histopathologischen Merkmalen verstehen wir hohes Grading, Lymph- und Blutgefäßinbrüche, Perineuralscheideninfiltrate, eine große Anzahl an Mitosen sowie ein hohes pT-Stadium (pT4). In der durchgeführten Validierungsstudie konnten wir die Funktion der Proteasen uPA und PAI-1 als negative prognostische Marker beim kolorektalen Karzinom bestätigen. Dies gilt für den Vergleich der Mittelwerte ebenso wie für

die Stratifizierung anhand vorher festgelegter Cut-Off-Werte. Trotz alledem muss genauso darüber berichtet werden, dass die Kombination aus den verschiedenen Faktoren, die untereinander einen Zusammenhang aufwiesen, nicht identisch mit den Daten der ersten Studie waren (Tabelle 3). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies zumindestens zum Teil an der relativ geringen Fallzahl liegt, die zusätzlich auch noch alle vier Tumorstadien beinhaltet. Daraus resultiert eine klare Einschränkung der Ergebnisse. Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus den zwei nicht optimal ausbalancierten Studien. Der Vergleich der beiden zeigt eine höhere Anzahl an rechtsseitig lokalisierten Karzinomen, eine größere Anzahl an Lymphknotenmetastasen, mehr Fälle mit Gefäßinvasion und mehr Fernmetastasen bei der Validierungsstudie. All das zusammen könnte zu der Varianz der Ergebnisse geführt haben. Trotz dieser Einschränkungen zeigen alle signifikanten Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen den Proteasen und einem aggressiven Verhalten des Tumors. Diese Aggressivität äußert sich in der schlechteren Prognose für die Patienten, was im Schnitt zu einer verkürzten Lebenszeit führt. Insbesondere gilt dieser Zusammenhang bei PAI-1 und Tumor Budding. Nachdem wir die Daten beider Studien zusammengefasst haben, konnten wir mittels Multivariable Analyse das pN-Stadium, das V-Stadium, Tumor Budding und PAI-1 als unabhängige prognostische Parameter für das Auftreten von Fernmetastasen identifizieren. Die prognostische Rolle von PAI-1 in Kolorektalen Karzinomen wurde schon durch einige Arbeitsgruppen untersucht und die große Mehrheit dieser Studien kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass hohe PAI-1-Spiegel mit einer schlechten Prognose einhergehen [46]. Ein Überblick über die aktuell publizierten Studien ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

In einer groß angelegten Metaanalyse untersuchte Wang et al. den Einfluss des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus, dabei konnten sie eine Assoziation hin zu einem höheren Krebsrisiko zeigen. Insbesondere unter Kaukasiern und bei Menschen mit einem 4G-Allel zeigte sich durch die erhöhten PAI-1-Spiegel ein erhöhtes Risiko nicht nur für kolorektale Karzinome, sondern auch für Endometriumkarzinome [65]. Iacovello et al. fand heraus, dass erhöhte PAI-1-Level einen Risikofaktor für die Entstehung von Darm- und Brustkrebs sowie für das Erleiden eines akuten Koronarsyndroms oder eines ischämischen Schlaganfalls darstellt [63]. Einen experimentellen Ansatz verfolgte Hogan et al., der zeigen konnte, dass PAI-1 ein wichtiger Mediator bei der Interaktion zwischen mesenchymalen Stammzellen und Kolonkarzinomzellen darstellt. Er hebt dabei besonders die funktionelle Auswirkung von PAI-1, sekretiert von mesenchymalen Stammzellen, auf die Kolonkarzinomzellen hervor [61]. Neben der Fragestellung, ob PAI-1 als Ziel in der Tumorthherapie dienen kann, stellte Chen et al. in seiner Arbeit fest, dass die Plasma-PAI-1-Spiegel bei Lebermetastasen erhöht waren und dass die Suppression von PAI-1 zu einem beeinträch-

Tabelle 4.1: Bisher veröffentlichte Studien zur prognostischen Rolle von uPA und PAI-1 bei kolorektalen Karzinomen

Referenzen	Jahr	n	Proben	Proteasen	Methoden	Ergebnisse
Mutoh et al. [58]	2008	25	Maus experimentell	PAI-1 und PAI-1-Inhibitoren SK 116 und 215	ELISA, RT-PCR, Polypformationsgewebe	PAI-1-Blocker unterdrücken Polypformationen
Minoo et al. [56]	2009	975	kolorektal	uPA, uPAR	IHC-Microarray	nur uPA ist unabhängig prognostisch
Yamada et al. [59]	2010	100	kolorektal	PAI-1	ELISA-Plasma	Prognostisch für postoperative Rezidive
Kushlinski et al. [60]	2013	166	kolorektal	uPA, PAI-1, tPA	ELISA-Plasma	PAI-1 ist in der univariaten Analyse prognostisch
Hogran et al. [61]	2013		Kolonkarzinom und mesenchymale Stammzellen	PAI-1	Zellkulturen	PAI-1 wird von mesenchymalen Stammzellen sezerniert
Kim et al. [62]	2013	3136	kolorektal	PAI-1	ELISA-Plasma	kein unabhängiger Zusammenhang zwischen uPA und Polypformationen; univariat schwach signifikant
Iacoviello et al. [63]	2013	850	kolorektal	PAI-1	ELISA-Plasma	Risikofaktor für kolorektale Karzinome
Sanchez-Tillo et al. [55]	2013		kolorektal		Zellkulturen	ZEB1 reguliert uPA und PAI-1 und fördert Invasivität
Chen et al. [64]	2015	108	kolorektal	PAI-1	ELISA-Plasma, Zellkulturen	Unterdrückung von PAI-1 verlangsamt die Progression des KRK

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; RT-PCR = Reverse-transcription polymerase chain reaction; IHC = Immunohistochemie; KRK = kolorektales Karzinom

tigten Tumorwachstum führt [64]. Bei dem Vergleich von Tumor Budding und PAI-1 mit uPA zeigte die Analyse der Test- und der Validierungsgruppe, dass uPA einen deutlich geringeren Einfluss auf die Prognose besitzt als die beiden anderen. Kushlinski et al. beschreibt ebenfalls einen signifikanten negativen Einfluss von hohen PAI-1-Spiegeln auf das Gesamtüberleben. Er beobachtete seine Patienten 5 beziehungsweise 10 Jahre. Bei uPA hingegen konnte auch bei ihm kein signifikanter Unterschied gefunden werden [60]. Trotz alledem steht das im Widerspruch mit einigen anderen Studien, die eine starke Korrelation zwischen uPA und aggressivem Tumorwachstum sowie verkürztem Überleben zeigen konnten [56], [66], [67], [68], [69], [70], [71]. Die meisten dieser Studien wurden mithilfe der Immunhistochemie durchgeführt, was eine technische Erklärung für diesen Unterschied darstellen könnte. Dagegen steht, dass Herszenyiet al. wie wir mit einem ELISA-Test arbeitete und dabei neben PAI-1 auch für uPA signifikant höhere Werte bei Patienten mit schlechtem Outcome feststellte [72]. Auch Ganesh et al. nutzte einen ELISA-Test für die Forschung und konnte für PAI-1 und uPA einen negativen Einfluss auf die Invasivität, die Metastasierungsrate und das Gesamtüberleben feststellen [67]. Der Hauptunterschied zwischen deren Studien und unserer ist, dass sie einen anderen ELISA-Test nutzten. Es erscheint dennoch unwahrscheinlich, dass dadurch der große Unterschied erklärt werden kann. Es bleibt daher leider unklar, warum wir die Ergebnisse dieser Autoren nicht reproduzieren konnten.

Tumor Budding gilt heutzutage als ein vielversprechender und stabiler Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom und rückt somit immer weiter in den Fokus der Wissenschaft. Tumor Budding ist mit einem ungünstigen Outcome bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen vergesellschaftet. Bei malignen Polypen weisen die entdeckten Zellcluster auf eine lymphogene Metastasierung hin, so dass eine chirurgische Intervention notwendig wird. Des Weiteren ist Tumor Budding gerade bei Patienten mit einem Tumor im Stadium II wegweisend für eine schlechte Prognose, so dass hier Patienten selektiert werden, die von einer adjuvanten oder im präoperativen Setting von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitieren könnten [73]. Die prognostische Relevanz von Tumor Budding im gesamten Gastrointestinaltrakt ist bereits durch eine große Anzahl an Studien untersucht worden. So lösen sich mit der Zeit auch einige Probleme. Bis vor kurzem fehlte eine allgemeingültige Definition von Tumor Budding, diese wurde jedoch durch die International Tumor Budding Consensus Conference 2016 erarbeitet und hält aktuell Einzug in die Leitlinien [27]. Davor litten einigen Studien unter einer schlechten Interrater-Reliabilität. [74] Es bleibt zu hoffen, dass sich hier in Zukunft eine Verbesserung zeigt. Puppa et al. untersuchte die Interrater-Reliabilität, indem er histologische Schnitte von einem internationalen Team von Pathologen mithilfe der virtuellen Mikroskopie untersuchen ließ. Dabei

konnte er eine nur mäßige Übereinstimmung finden. Durch die immunhistochemische Färbung von Cytokeratin konnte die Auffindbarkeit der Tumorzellen verbessert werden, nicht jedoch die Interrater-Reliabilität [75]. Auch in unserer Arbeit erzielten wir nur eine mittelmäßige Übereinstimmung zwischen den beurteilenden Pathologen. Der Kappa-Wert liegt bei 0,48. Es ist erstaunlich, dass trotz der Einschränkungen Tumor Budding schon etliche Male sein Potenzial als stabiler Prognoseparameter zeigen konnte. Beaton et al. und Bosch et al. untersuchten verschiedene Eigenschaften von pT1-Tumoren, um herauszufinden, wer ein besonders hohes Risiko für Lymphknotenmetastasen besitzt. Da diese Patienten eine chirurgische Behandlung benötigen und engmaschiger überwacht werden müssen. Fehlendes Tumor Budding senkte bei beiden Studien das Metastasierungsrisiko signifikant [76], [77]. Die Europäische Leitlinie zur Qualitätssicherung bei kolorektalen Karzinomen, die Europäische Konsensus Konferenz Kolon und Rektum und die Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum haben bereits die Empfehlung ausgesprochen, kolorektale Karzinome auf Tumor Budding zu untersuchen [78], [79], [80]. Auch in unserer Studie konnten wir einen Zusammenhang zwischen hochgradigem Tumor Budding und anderen die Prognose verschlechternden Faktoren finden.

Die Tatsache, dass wir bei der Untersuchung von PAI-1 in Kombination mit Tumor Budding mittels Uni- und Multivariable Analyse herausgefunden haben, dass beide einen negativen Einfluss auf die Prognose der Patienten mit kolorektalen Karzinomen besitzen, unterstützt die These, dass die Auflösung der bindegewebigen Aufhängung des Tumors die Migration von einzelnen Tumorzellen fördert und so zu frühzeitigen Lymphknoten- sowie Fernmetastasen beiträgt. Es besteht also sehr wahrscheinlich ein synergistischer Effekt. Nachdem bereits jetzt PAI-1-Inhibitoren verfügbar sind, sollte in zukünftigen Arbeiten der Frage nachgegangen werden, ob PAI-1 als Ziel in der Krebstherapie dienen kann [81].

Die Indikation zur neoadjuvanten Radiochemotherapie bei Rektumkarzinomen wird bisher mittels MRT gestellt. Hier gilt das Unterschreiten der Grenze von 1 mm des Tumors zu der mesorektalen Faszia oder die Ausbreitung unter den Levatoransatz als Indikation. Nicht immer ist eine MRT-Diagnostik möglich, in diesem Fall wird die Indikation mit Hilfe der klinischen Untersuchung, der Endosonographie und eventuell der Computertomographie gestellt [82]. Bei T4 Tumoren und T1 bis T3 Tumoren, die Nodal positiv sind, ist die neoadjuvante Radiochemotherapie indiziert. Bei T1, N0 und T2, N0 Tumoren bringt sie keinen Vorteil. Problematisch sind T3, N0 Tumore, hier wird der Benefit der Radiochemotherapie kontrovers diskutiert. Hier wäre die Etablierung weiterer Prognosefaktoren zusätzlich zu dem T- und N-Stadium wichtig, um das optimale Vorgehen zu planen. Durch die Beurteilung von PAI-1 zusammen mit Tumor Budding ließe sich even-

tuell eine bessere Aussage bezüglich des Metastasierungs- und Lokalrezidivrisikos treffen. Im Hinblick auf das Klassifikationssystem des CRCSC wäre es interessant, inwieweit PAI-1 und Tumor Budding hinsichtlich des Krankheitsverlaufs mit deren Einteilung korreliert und dementsprechend einen Beitrag zu einer präziseren Einteilung leisten kann. Durch die inzwischen große Anzahl molekularer, histologischer und genetischer Merkmale, anhand derer sich das kolorektale Karzinom einteilen lässt, wird die zukünftige Forschung ihren Schwerpunkt noch mehr darauf legen müssen, wie die einzelnen Merkmale sich gegenseitig beeinflussen und ob sie miteinander korrelieren, um zuverlässige und stabile Klassifikationssysteme zu entwickeln. Das stellt die Voraussetzung dafür dar, dass die Tumorthherapie stärker personalisiert wird und sich eine möglichst genaue Prognose abschätzen lässt.

Literaturverzeichnis

- [1] Wolfgang Piper. *Innere Medizin*. Springer, 2012.
- [2] G. Herold. *Innere Medizin*. Dr. med. Gerd Herold, 2015.
- [3] J. Keller. *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme Verlagsgruppe, 2013.
- [4] Amboss <https://amboss.miamed.de/library>.
- [5] G. B. Baretton. Serratierte Laesionen im Kolorektum. *Viszeralmedizin*, 2011.
- [6] J.R. Jass. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 2007.
- [7] M Vieth. (K)Eine Verwirrung um serratierte Kolonpolypen. *J Gastroenterol Hepatol Erkr*, 2010.
- [8] *Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Version 1.1 - August 2014, AWMF-Registernummer: 021/007OL, Langversion*.
- [9] L Bonanni. A comparison of diagnostic imaging modalities for colorectal liver metastases. *European Journal of Surgical Oncology*, 2014.
- [10] Bethany Shinkins. Carcinoembryonic antigen monitoring to detect recurrence of colorectal cancer: How should we interpret the test results? *Clinical Chemistry*, 2014.
- [11] Doris Henne-Bruns. *Duale Reihe Chirurgie*. Thieme Verlagsgruppe, 2012.
- [12] S Yamamoto. Oncologic outcome of laparoscopic versus open surgery for advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 2001.
- [13] Y Guo. XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Cancer Invest.*, 2016.

- [14] E. Van Cutsem. Open-label phase iii trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2007.
- [15] TJ Price. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.*, 2014.
- [16] Amado RG, Wolf M, Peeters M. Wild-type kras is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2008.
- [17] F Pietrantonio. Predictive role of braf mmutation in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2015.
- [18] R Sauer. Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis*, 2003.
- [19] RS Stubbs. Selective internal radiation therapy (SIRT): a new modality for treating patients with colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*, 2004.
- [20] Stefan Coerper. *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Analkarzinom*. Suedwestdeutsches Tumorzentrum Comprehensive Cancer Center Tuebingen, Universitaetsklinikum Tuebingen, 2009.
- [21] RC Haggitt. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*, Aug;89(2):328-36., 1985.
- [22] Y Ishiguro. Lifting versus non-lifting sign for prediction of depth of invasion of early colorectal cancer. *Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy*, 2013.
- [23] Cancer Research UK <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/bowel-cancer/treatment/dukes-stages-of-bowel-cancer#dukes>.
- [24] Quasar Collaborative Group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*, 2007.
- [25] Anke Reinacher-Schick. Adjuvante Therapie des Kolonkarzinoms. *Onkologie*, 2010.
- [26] *Journal of the National Cancer Institute*, <http://jnci.oxfordjournals.org/content/96/19/1420/F2.expansion.html>.

- [27] A Lugli. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the international tumor budding consensus conference (itbcc) 2016*Mod Pathol*, 2017.
- [28] Hideki Ueno. A new prognostic staging system for rectal cancer*Annals of surgery*, 2004.
- [29] TE Le Voyer. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: A secondary survey of intergroup trial.*Clin Oncol*, 2003.
- [30] DW Borowski. Intra-arterial methylene blue injection into ex vivo colorectal cancer specimens improves lymph node staging accuracy:a randomized controlled trial. *Colorectal Dis.*, 2014.
- [31] Bruno Maerkl. The clinical significance of lymph node size in colon cancer*Modern Pathology*, 2012.
- [32] PA Andreasen. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*, 1997.
- [33] K Dano. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer*Adv Cancer Res.*, 1985.
- [34] A Ichinose. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem*, 1986.
- [35] M Schmitt. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost.*, 1997.
- [36] K Shirasuna. Extracelularmatrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells:participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation. *Cancer Research*, 1993.
- [37] MV Cubellis. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO Journal*, 1990.
- [38] S Stefansson.The serpin pai-1 inhibits cell migration by blo cking integrin alpha v beta 3 binding to vitronectin. *Nature*, 1996.
- [39] DA Wirtzfeld. Concordance with clinical practice guidelines for adjuvant chemotherapy in patients with stage 1-3 colon cancer: experience in 2 canadian provinces. *Can J Surg*, 2009.

- [40] JB O Connell. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.*, 2004.
- [41] MJ Duffy. The urokinase plasminogen activator system: Role in malignancy. *Curr Pharm Des*, 2004.
- [42] L Harris. American Society of Clinical Oncology. 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2007.
- [43] M Look. Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients. *Thromb Haemost.*, 2003.
- [44] H Ueno. Tumour budding as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002.
- [45] M Tanaka. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 2003.
- [46] B Maerkl. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer. *J Surg Oncol.*, 2010.
- [47] B Maerkl. Methylene blue-assisted lymph node dissection in colon specimens: A prospective, randomized study. *American Journal of Clinical Pathology.*, 2008.
- [48] E Wenzl. Results of a rigorous follow-up system in colorectal cancer. *Int J Colorectal*, 1988.
- [49] J Guinney. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.*, 2015.
- [50] F Prall. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*, 2007.
- [51] F Prall. Phenotypes of invasion in sporadic colorectal carcinomas related to aberrations of the adenomatous polyposis coli (apc) gene. *Histopathology*, 2007.
- [52] JR Jass. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 2003.
- [53] J Garcia-Solano. Immunohistochemical expression profile of beta-catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5gamma2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. *Human Pathology*, 2012.

- [54] T Brabletz. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*, 2005.
- [55] E Sanchez-Tillo. ZEB1 promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1. *Clinical Cancer Research*, 2013.
- [56] P Minoo. Urokinase-type plasminogen activator is a marker of aggressive phenotype and an independent prognostic factor in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *Hum Pathol*, 2009.
- [57] E Hiendlmeyer. Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumor. *Cancer Research*, 2004.
- [58] M Mutoh. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) blockers suppress intestinal polyp formation in Min mice. *Carcinogenesis*, 2008.
- [59] Y Yamada. Plasma concentrations of VCAM-1 and PAI-1: a predictive biomarker for post-operative recurrence in colorectal cancer. *Cancer Science*, 2010.
- [60] NE Kushlinskii. Prognostic role of tumor-associated proteases in colorectal cancer. *Bull Exp Biol Med*, 2013.
- [61] NM Hogan. Impact of mesenchymal stem cell secreted pai-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2013.
- [62] ER Kim. Association between plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 and colorectal neoplasms. *Gut Liver*, 2013.
- [63] L Iacoviello. Type 1 plasminogen activator inhibitor as a common risk factor for cancer and ischaemic vascular disease: the EPICOR study. *BMJ Open*, 2013.
- [64] H. Chen, H. Peng. Silencing of plasminogen activator inhibitor-1 suppresses colorectal cancer progression and liver metastasis. *Surgery*, 2015.
- [65] S Wang. PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from meta-analysis. *PloS one*, 2013.
- [66] T Fujii. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 as a prognostic factor in human colorectal carcinomas. *Hepato-Gastroenterology*, 1999.

- [67] S Ganesh. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Research*, 1994.
- [68] HE Mulcahy. Urokinase-type plasminogen activator and outcome in dukes b colorectal cancer. *Lancet*, 1994.
- [69] T Sato. Association of immunohistochemical detection of urokinase-type plasminogen activator with metastasis and prognosis in colorectal cancer. *Oncology*, 1995.
- [70] DQ Seetoo. Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 2003.
- [71] JL Yang. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets. *Int J Cancer*, 2000.
- [72] L Herszenyi. The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer*, 1999.
- [73] VH Koelzer. Tumor budding in colorectal cancer - ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*, 2016.
- [74] B Maerkl. Prognostic significance of tumor budding in gastrointestinal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011.
- [75] G Puppa. Diagnostic reproducibility of tumor budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology*, 2012.
- [76] C Beaton. Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 2013.
- [77] SL Bosch. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*, 2013.
- [78] M Vieth. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. first edition - annotations of colorectal lesions. *Endoscopy*, 2012.
- [79] T Watanabe. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*, 2012.
- [80] CJ van der Velde. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon and rectum. *Eur J Cancer*, 2014.

- [81] VR Placencio. Small molecule inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 elicit anti-tumorigenic and anti-angiogenic activity. *PLoS One*, 2015.
- [82] T Junginger. Neoadjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms *Onkodin*, 2004.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz [2]	6
1.2	Die unterschiedlichen Karzinogenesewege des KRK modifiziert nach Jass [67]	
1.3	Staging nach Dukes	19
1.4	Staging System nach Jass [6]	20
1.5	Five-year survival by the American Joint Committee on Cancer sixth edition system stages I–IV. P value determined by the log-rank test refers to the corresponding stage and the stage in the row above, unless otherwise indicated. All statistical tests were two-sided. * = IIIa versus IIb; † = IIa versus IIIa; ‡ = IIb versus IIIb; NS = not statistically significant. [26]	22
3.1	Follow-up-Analyse [48]	33
3.2	uPA Krebsspezifisches Überleben	34
3.3	PAI-1 Krebsspezifisches Überleben.	36
3.4	Budding und PAI-1	37
3.5	Korrelation uPA- vs PAI-1-Spiegel	39
3.6	Tumor Budding vs uPA und PAI-1 a	40
3.7	Tumor Budding vs uPA und PAI-1 b	41
3.8	uPA-Spiegel in Abhängigkeit des V-Stadiums	43
3.9	PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des V1-Stadiums	44
3.10	uPA-Spiegel in Abhängigkeit des pN-Stadiums	45
3.11	PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des pN-Stadiums	46
3.12	uPA-Spiegel in Abhängigkeit des pT-Stadiums	47
3.13	PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des pT-Stadiums	48
3.14	uPA-Spiegel in Abhängigkeit des Gradings	49
3.15	PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des Gradings	50
3.16	PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit des M-Stadiums	51
3.17	uPA-Spiegel in Abhängigkeit des M-Stadiums	52
3.18	Odds-Ratio für Fernmetastasen	54

Tabellenverzeichnis

1.1	Risikogruppen für kolorektale Karzinome [3]	5
1.2	Häufigkeit und Entartungsrisiko kolorektaler Polypen [7]	8
1.3	TNM-Klassifikation (UICC, 2017) [2]	16
1.4	Stadiengruppierung (UICC, 2017) [2]	17
1.5	Haggitt-Level [21]	18
3.1	Klinisch-pathologische Daten des Test-Sets	32
3.2	Klinisch-pathologische Daten des Validierungs-Sets	38
3.3	Vergleich der Ergebnisse: Test-Set vs. Validierungsset.. . . .	42
4.1	Bisher veröffentlichte Studien zur prognostischen Rolle von uPA und PAI-1 bei kolorektalen Karzinomen	58

5 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Sekisui Diagnostics in Stanford und von der Hermann-Egger-Stiftung unterstützt. Herzlichen Dank an Anna-Maria Bubolz, Katharina Endhardt und Ines Lichtmannegger für das Sammeln der frischen Gewebeproben für die uPA- und PAI-1-Analyse. Des weiteren möchte ich Monika Hallabrin und Kathrin Ferstl-Blahetekt für ihre hervorragende technische Assistenz danken. Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Bruno Märkl für seinen außergewöhnlichen Einsatz für diese Arbeit sowie die beste Betreuung, die man sich als Doktorand wünschen kann.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Franz, Simon

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Tumor Budding, uPA und PAI-1 im Kolorektalen
Karzinom: Update und Validierung einer prospektiven
Studie.**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 20.03.2020

Ort, Datum

Simon Franz

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand