

1 Einleitung

1.1 Definition des kolorektalen Karzinoms

Als Kolonkarzinome gelten Tumore, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der linea dentata entfernt ist. Da anatomisch keine scharfe Grenze am Übergang vom Rektum zum Sigma besteht und die Höhe der peritonealen Umschlagfalte individuell variiert, ist für die Definition des Rektumkarzinoms entscheidend, dass der untere Tumorrand weniger als 16 cm zur linea dentata misst (1). Ein Karzinom wird auch dann noch als Rektumkarzinom bezeichnet, wenn die Tumormainmasse zwar im Sigma lokalisiert ist, der Unterrand aber in das Rektum hineinreicht.

1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist in Europa die zweithäufigste Krebserkrankung und damit eine der führenden Ursachen krebsbedingter Morbidität und Mortalität. Die Wahrscheinlichkeit in den westlichen Industrienationen, im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt für Männer und Frauen mit durchschnittlichem Risiko etwa 5-6 % während das Risiko an einem solchen Tumor zu versterben bei etwa 2,5-3 % liegt (2, 3). Die relative 5-Jahresüberlebensrate beträgt in Deutschland nach Schätzungen des Robert Koch Instituts für Männer ca. 52 % und für Frauen 55 %. Insgesamt sterben jährlich laut dem statistischen Bundesamt in der Bundesrepublik Deutschland etwa 30.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom.

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms scheint sich, nach jahrelangem Anstieg seit Anfang der 90er Jahre auf hohem Niveau zu stabilisieren (4). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer auf über 32.000, für Frauen auf etwa 34.000 geschätzt, womit Deutschland unter den Ländern der Europäischen Union an erster Stelle steht (5).

International variieren die Neuerkrankungsraten erheblich. Hochentwickelte Industrienationen, wie Nordamerika, Australien, Neuseeland und Westeuropa zeigen erheblich höhere Inzidenzraten als Afrika, Asien und Lateinamerika (6). Für die geographische Verteilung der Inzidenzraten werden insbesondere die Ernährungsgewohnheiten (fettreich, ballaststoffarm) und der Lebensstil (Bewegungsarmut)

verantwortlich gemacht (7). Diese Annahme wird durch Studien gestützt, die zeigen, dass das Neuerkrankungsrisiko kolorektaler Karzinome bei Immigranten nach 20 Jahren Aufenthalt in den USA das Niveau der dort geborenen weißen Bevölkerung erreicht (8-10).

Der Altersgipfel für das Auftreten kolorektaler Karzinome liegt zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr, wobei Männer im Mittel mit 68 und Frauen mit 73 Jahren- also vergleichsweise spät erkranken. Nur etwa 5 % der kolorektalen Karzinome treten vor dem 40. Lebensjahr auf und sind zumeist erblich bedingt (5).

1.3 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

1.3.1 Exogene Risikofaktoren

Eine kalorienreiche sowie ballaststoffarme Kost mit hohen Anteilen an tierischen Proteinen und Fetten, insbesondere aus rotem Fleisch stammend, scheint die Karzinomentstehung zu begünstigen (7, 11-13).

Als weitere Risikofaktoren gelten ein erhöhtes Körpergewicht, vor allem Adipositas vom androgenen Typ mit einem erhöhten Taillen-Hüftumfang-Quotienten, sowie geringe körperliche Aktivität (14, 15) und sitzende Tätigkeiten (16).

Der verstärkte Verzehr von ballaststoffreichen Gemüse- und Obstsorten sowie die Einnahme von Folsäure, Vitaminen (A, C, E) und Mineralstoffen (Selen) mit antioxidativer Wirkung, scheint dagegen einen schützenden Effekt aufzuweisen (17, 18). Dieser ist jedoch ebenso wie die protektive Wirkung von Calcium und Vitamin D umstritten (18-20).

1.3.2 Endogene Risikofaktoren

Vor allem beim frühzeitigen Auftreten kolorektaler Karzinome, das heißt vor dem 40. Lebensjahr, spielen genetische Prädispositionen eine entscheidende Rolle, was sich zumeist auch in einer erhöhten familiären Belastung widerspiegelt. Zu den häufigsten erblichen Prädispositionen zählt das familiäre adenomatöse Polyposis Syndrom (FAP) und das erbliche nichtpolypöse kolorektale Karzinomsyndrom (HNPCC). Beiden hereditären kolorektalen Karzinomsyndromen liegt ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde.

Das HNPCC Syndrom ist für ca. 2-7 % aller kolorektalen Karzinome verantwortlich (21). Die überwiegende Mehrzahl der Mutationen ist auf dem hMSH2-Gen (Chromosom 2p) und

auf dem hMLH1-Gen (Chromosom 3p) lokalisiert. Die Mutation dieser sogenannten „Mismatch-repair“-Gene führt dabei zur Hemmung notwendiger DNA-Reparaturmechanismen. Die daraus resultierenden Replikationsfehler lassen sich als Mikrosatelliteninstabilität, das heißt Verkürzungen oder Verlängerungen repetitiver DNA-Basensequenzen, im Tumor nachweisen (22). HNPCC treten meist zwischen den 40. und 50. Lebensjahr auf und sind in 70 % der Fälle im rechtsseitigen Kolon gelegen. Je nach klinischer Manifestation unterscheidet man das Lynch I-Syndrom, bei dem familiär ausschließlich kolorektale Karzinome auftreten, und das Lynch II-Syndrom, bei dem auch andere Organe betroffen sind (23, 24).

Die FAP verursacht hingegen nur etwa 1 % aller kolorektalen Karzinome. Die molekulare Grundlage sind Mutationen im APC-Gen auf Chromosom 5q21. Das APC-Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, da es β -Catenin bindet und die Apoptose steuert. Da die Nukleotidsequenz dieses Tumorsuppressorgens seit 1991 bekannt ist, ist der direkte Mutationsnachweis möglich. Bei der APC treten meist bereits in der Pubertät hunderte bis tausende kolorektale Polypen auf, die unbehandelt durchschnittlich im 4. Lebensjahrzehnt über die Adenom-Karzinom-Sequenz zur Entwicklung eines Kolonkarzinoms führen (25).

Erbliche Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die juvenile Polyposis Coli, das Turcot-Syndrom, das Muir-Torre-Syndrom und das Cronkhite-Canada Syndrom scheinen zwar auch für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu prädisponieren, sind jedoch aufgrund ihres seltenen Auftretens von untergeordneter Bedeutung.

Da gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz Adenome prinzipiell als präkanzeröse Läsionen anzusehen sind (26), zählen auch einzelne oder multipel auftretende Adenome ohne entsprechende genetische Disposition, zu den Risikofaktoren. Dabei ist das maligne Potential des Adenoms abhängig von der Größe, dem Dysplasiegrad und dem Wachstumstyp (tubulär, villös, tubulovillös). Villöse Adenome, die größer sind als 2 cm, weisen die größte Entartungstendenz auf.

Des Weiteren werden die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zu den endogenen Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms gezählt (27).

1.3.3 Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist ein über Jahre bis Jahrzehnte andauerndes komplexes Geschehen, an dem eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren beteiligt sind. Zu den endogenen Faktoren zählen erbliche Syndrome, präkanzeröse Läsionen sowie das familiär gehäufte Auftreten kolorektaler Karzinome, während Umwelt- und Ernährungseinflüsse exogene Faktoren darstellen. Etwa 90 % der kolorektalen Karzinome sind sogenannte sporadische Karzinome, bei deren Entstehung die Ernährung eine wesentliche Rolle spielt, die restlichen 10 % entstehen primär auf der Basis vererbbarer genetischer Defekte (28).

Auf molekularbiologischer Ebene entstehen maligne Tumore durch Mutationen verschiedener Gene, die zelluläre Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung steuern. Grundsätzlich lassen sich jene Gene in zwei Gruppen einteilen: Onkogene (Proto-Onkogene) und Tumorsuppressorgene (Anti-Onkogene).

Onkogene entstehen durch Mutation von Proto-Onkogenen, deren Genprodukte das Zellwachstum beeinflussen. Mutationen führen zu einer abnorm gesteigerten Zellproliferation und dem autonomen Wachstum der Zelle. Da der eben beschriebenen Effekt bereits durch Mutation eines der beiden Allele eintritt, handelt es sich um einen dominanten Wirkungsmechanismus. Eines der bekanntesten Onkogene ist das K-ras-Gen.

Genprodukte von Tumorsuppressorgenen schützen die Zelle vor maligner Entartung, indem sie in genetisch veränderten Zellen die Apoptose einleiten und somit negativ regulierend auf die Zellproliferation wirken. Zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen kommt es erst durch die Mutation bzw. Verlust beider Allele, weshalb auch von einem rezessiven Wirkungsmechanismus gesprochen wird. Die für die Genese des Kolonkarzinoms wichtigsten Tumorsuppressorgene sind das p53- Gen, das DCC-Gen (deleted in colorectal cancer), das MCC-Gen (mutated in colorectal cancer) und das APC-Gen.

Histologisch gesehen bilden Dysplasien des Kolorektums die Vorläuferläsionen kolorektaler Karzinome (29). Dysplasien sind neoplastische Epithelproliferation, die nicht die Submukosa infiltrieren und durch zelluläre Atypien, Ausreifungsstörungen sowie Veränderungen der Zellarchitektur auffallen. Mehr als 95 % aller Dysplasien im Kolon und Rektum treten in Adenomen auf, die daher auch als „*focus of dysplasia*“ bezeichnet werden und für die Karzinogenese von entscheidender Bedeutung sind (30). Neben den Adenomen, die eine

makroskopisch sichtbare Vorwölbung der Darmschleimhaut hervorrufen, existieren auch solche, die im Schleimhautniveau liegen („*flat adenomas*“) (31). Die stufenweise Entwicklung kolorektaler Karzinome aus Adenomen wird auch als Adenom-Karzinom Sequenz bezeichnet. Fearon und Vogelstein zeigten, dass die verschiedenen Entwicklungsstadien vom Adenom zum kolorektalen Karzinom mit bestimmten Onko- und Tumorsuppressorgenveränderungen korrelieren (26). Eine Übersicht hierzu liefert Abbildung 1.

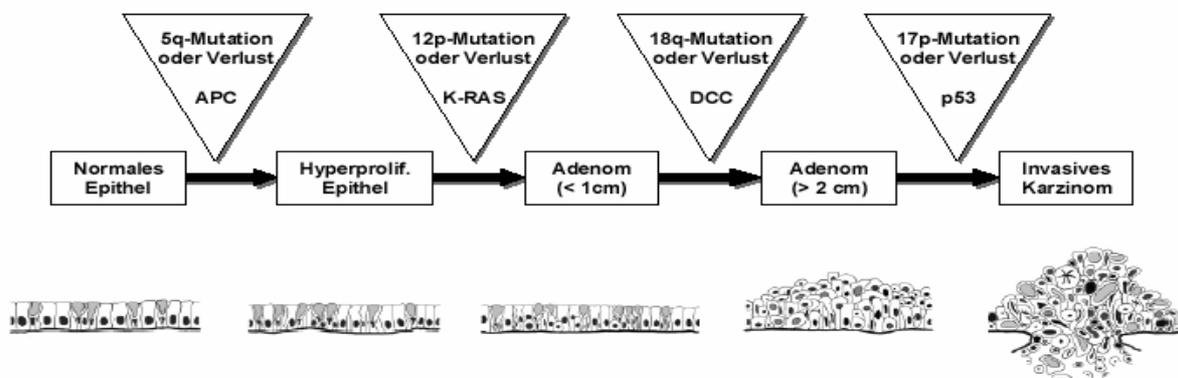


Abbildung 1 Genetisches Modell der kolorektalen Karzinogenese nach Fearon et al.

Der Übergang von normalem Kolonepithel in ein hyperproliferatives Epithel geht mit einem Funktionsverlust des APC-Gens einher. Mutationen im Onkogen K-ras finden sich beim Übergang des hyperproliferativen Epithels in kleine Adenome und der Verlust des DCC-Gens kennzeichnet den Übergang in fortgeschrittene, große Adenome mit ausgeprägten Dysplasien. Der Verlust der Funktion des p53- Genproduktes bedeutet meist den Übergang in ein Karzinom. Die Zahl der genetischen Alterationen in den Tumorzellen nimmt somit im Verlauf der Karzinogenese stetig zu, dabei ist zeitliche Abfolge der genetischen Veränderungen weniger entscheidend als vielmehr deren Akkumulation.

1.4 Morphologie und Klassifikation

1.4.1 Wachstumstypen und Lokalisation

Makroskopisch erscheinen kolorektale Karzinome als polypös wuchernde, ulzerierende oder diffus-infiltrativ in die Darmwand wachsende Tumore. Eine Übersicht über die lokalisationsabhängigen Inzidenzraten der kolorektalen Karzinome ist Abbildung 2 zu entnehmen.

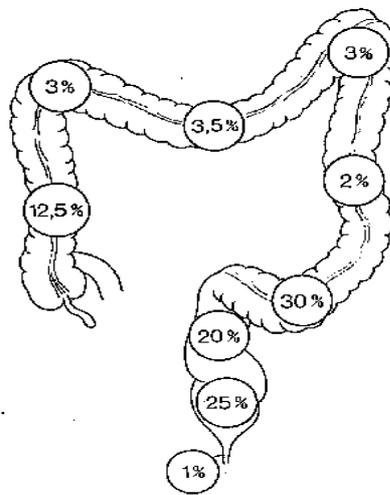


Abbildung 2 Lokalisationsabhängige Inzidenzraten kolorektaler Karzinome
(<http://www.medizin.fu-berlin.de/chi/studium/vorlesung/kolonca/folie6.html>)

Aus dieser geht hervor, dass knapp 50 % aller kolorektalen Karzinome im Rektum lokalisiert sind. Mehrfachkarzinome finden sich in 2 – 3 % aller kolorektalen Karzinome. Anhand histopathologischer Eigenschaften lassen sich kolorektale Karzinome für prognostische und therapeutische Zwecke genauer beschreiben und klassifizieren.

1.4.2 Histopathologische Tumortypisierung

Die allgemein verbindliche WHO-Klassifikation vom Jahr 2000, die gleichermaßen für Kolon- und Rektumkarzinome gilt, unterscheidet folgende Karzinomtypen: Adenokarzinom, muzinöses Karzinom (Gallertkarzinom), Siegelringzellkarzinom, medulläres Karzinom, adeno-squamöses Karzinom, kleinzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom und undifferenziertes Karzinom (2).

Dabei ist innerhalb eines Tumors das nebeneinander Auftreten unterschiedlicher Entitäten möglich. Adenokarzinome liegen mit über 90 % am häufigsten vor, gefolgt mit deutlichem Abstand von muzinösen Karzinomen, während die anderen Karzinomtypen sehr selten sind.

1.4.3 Histopathologische Differenzierungstypen (Grading)

Die WHO unterscheidet beim kolorektalen Karzinom nach der histologischen Ähnlichkeit des Karzinoms zum Ausgangsgewebe drei Differenzierungsgrade: hoch, mittel und niedrig differenzierte Tumore.

Die UICC (Union International Contre le Cancer) bezeichnet den Differenzierungszustand kolorektaler Karzinome analog zur WHO: hoch differenziert (G1), mäßig differenziert (G2), niedrig differenziert (G3), wobei der von der UICC zusätzlich vorgesehene Differenzierungsgrad G4 dem eigenen histologischen Tumortyp des undifferenzierten Karzinoms in der WHO-Nomenklatur entspricht.

Sind innerhalb eines Tumors unterschiedliche Differenzierungsgrade entwickelt, so sind die Areale mit der geringsten Differenzierung für die Bewertung maßgeblich. Im Allgemeinen zeigen niedrig differenzierte Karzinome ein aggressiveres Wachstumsverhalten und eine höhere Progressionsneigung.

1.4.4 Tumorstadieneinteilung (TNM/ UICC/ Dukes)

Nach der UICC (Union International Contre le Cancer) werden kolorektale Karzinome entsprechend ihrer Tumorausbreitung klassifiziert. Das Einteilungsprinzip basiert gemäß dem von Pierre Denoix, einem französischen Chirurg, entwickelten TNM Systems (32) auf folgenden Tumoreigenschaften mit prognostischer Relevanz: Infiltrationstiefe der Darmwand bzw. Befall angrenzender Strukturen (T), Anzahl der befallenen Lymphknoten (N), Auftreten von Fernmetastasen (M). Das genaue Ausmaß der Tumorausbreitung wird durch Indizes dieser Komponenten angegeben (siehe Tabelle 1).

Primärtumor	
Tx/ pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0/ pT0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis/ pTis	Carcinoma in situ: Tumorzellen intraepithelial oder intramukös, jedoch keine Tumorausbreitung durch die Muskularis mukosa
T1/ pT1	Tumor erstreckt sich in die Submukosa
T2/ pT2	Tumor erstreckt sich in die Muskularis mukosae
T3/ pT3	Tumor infiltriert die Subserosa oder in das nicht-peritonealisierte perikolische bzw. perirektale Gewebe
T4/ pT4	Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Gewebe (T4a) oder das viszerale Peritoneum (T4b)
regionäre Lymphknoten	
Nx/ pNx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0/ pN0	keine Lymphknotenmetastasen
N1/ pN1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2/ pN2	Metastasen in vier oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen	
Mx/ pMx	Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0/ pM0	keine Fernmetastasen
M1/ pM1	Fernmetastasen vorhanden, dazu zählen auch nicht regionäre Lymphknotenmetastasen

Tabelle 1 pTNM-Stadien beim kolorektalen Karzinom nach dem 5. überarbeiteten Staging-Protokoll der UICC von 1997 (33)

Aus den T-, N- und M-Kategorien werden von der UICC vier Tumorstadien abgeleitet, die für die Therapie und Prognose der Patienten von entscheidender Bedeutung sind (siehe Tabelle 2). Auch die Klassifikation kolorektaler Karzinome nach Dukes, die dieser 1932 für das Rektumkarzinom erarbeitet hat, findet bis heute in modifizierter Form Verwendung und ist Tabelle 2 zu entnehmen.

UICC-Stadium	TNM-Stadium			Dukes-Stadium
Stadium 0	Tis	N0	M0	Stadium 0
Stadium I	T1	N0	M0	Stadium A
	T2	N0	M0	
Stadium II	T3	N0	M0	Stadium B
	T4	N0	M0	
Stadium III	jedes T	N1	M0	Stadium C
	jedes T	N2	M0	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	Stadium D

Tabelle 2 Stadieneinteilung nach UICC und Dukes

Prätherapeutisch wird mittels bildgebender Verfahren (z.B.: Endoskopie, Sonographie, MRT, CT) sowie klinischer Untersuchungsbefunde die Klassifizierung der Tumorausbreitung im TNM-System als Basis für die Therapieplanung vorgenommen, wobei die klinisch bestimmte Tumordinfiltrationstiefe und der Lymphknotenbefall mit dem Präfix „c“ (cTNM) gekennzeichnet wird. Postoperativ erfolgt die pathohistologische Beurteilung des Operationspräparates (pTNM).

Zusätzlich gibt die Residualklassifikation der UICC Auskunft über das Vorhandensein oder Fehlen von nachweisbarem Resttumor nach erfolgter Therapie. Voraussetzung dafür ist die sorgfältige histopathologische Untersuchung der Resektionsränder des Tumorpräparates. Das Fehlen von nachweisbarem Resttumor wird als R-0-Resektion beschrieben, während die R-1-Resektion einen mikroskopisch und R-2-Resektion einen makroskopisch erfassbaren Residualtumor kennzeichnet (28). Nach den Leitlinien der UICC gelten sowohl ein lokoregionärer Tumorrest als auch nicht resezierbare Fernmetastasen als Residualtumor (34, 35). Anhand dieser Residualklassifikation lassen sich primär palliative Eingriffe (R-1, R-2-Resektion) von potenziell kurativen (R-0-Resektion) unterscheiden, was vor allem in Hinsicht auf die Prognose von entscheidender Bedeutung ist.

1.5 Metastasierung

1.5.1 Metastasierung aus klassisch anatomischer Sicht

Das kolorektale Karzinom metastasiert am häufigsten lymphogen. Die Lymphabflusswege entsprechen denen der arteriellen Versorgung und führen demnach entlang den Ästen der A. mesenterica superior, bestehend aus den Aa. ileocolica, colica dextra und colica media, sowie den Ästen der A. mesenterica inferior, nämlich der A. colica sinistra, den Aa. sigmoidales und der A. rectalis superior. Bei tiefsitzenden Rektumkarzinomen ist die lymphogene Metastasierung entlang der Aa. rectales inferiores zu den Iliaca interna-Gefäßen möglich. Nur bei sehr tiefem Tumorsitz und Infiltration in die Levatorebene oder bei proximal blockiertem Lymphabfluss erfolgt die Metastasierung nach distal und inguinal wie beim Analkarzinom. Im Allgemeinen finden sich Lymphknotenmetastasen nicht weiter als 2-3 cm distal vom Tumorunterrand entfernt. Die hämatogene Metastasierung, die, wie man bislang annimmt, den venösen Abflüssen von Kolon und Rektum folgt, führt vor allem zu folgenden Organmetastasen in absteigender Häufigkeit: Leber-, Lungen-, Skelett-, Nebennieren-, und Gehirnmastasen. Bei fortgeschrittenem Tumor besteht gelegentlich auch eine peritoneale Tumoraussaat. Unter Mikrometastasen versteht man immunhistochemisch in Blut, Lymphe oder Knochenmarksaspiraten nachweisbare einzelne disseminierte oder zu kleinen Gruppen formierte Tumorzellen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind ca. 40 % der kolorektalen Karzinome auf die Darmwand begrenzt und noch nicht metastasiert. Lymphknotenmetastasen

liegen bei ca. einem Drittel der Fälle vor, während bei ca. 20 % aller Rektumkarzinome und ca. 30 % der Kolonkarzinome bereits eine Fernmetastasierung erfolgt ist (36).

1.5.2 Metastasierung aus molekularbiologischer Sicht

Die komplexe metastatische Kaskade beginnt mit der Loslösung von Karzinomzellen aus dem Tumorzellverband durch den Verlust von Zell-Zell-Adhäsionen (37-39), weshalb sich im Tumor häufig eine gegenüber dem Normalgewebe herabgesetzte Expression von Adhäsionsmolekülen zeigt. Die aus der vermehrten Expression tumorassoziierter Proteasen und Protease-Inhibitor-Systemen (40, 41) resultierende gesteigerte proteolytische Aktivität befähigt die Tumorzellen die umgebenen Matrixkomponenten zu lysieren und Basalmembranen zu durchbrechen. Auf diese Weise gelangen Tumorzellen in das Blut- und Lymphgefäßsystem. Eine systemische Streuung von Tumorzellen konnte bereits in frühen Tumorstadien nachgewiesen werden (42). Proteolytische und adhäsive Prozesse werden erneut für die Festsetzung der Tumorzelle im Zielorgan benötigt. Für die Metastasenbildung im Zielorgan spielen wiederum angiogenetische Faktoren und Wachstumsfaktoren sowie ihre Rezeptoren (43, 44) eine bedeutende Rolle. Für die häufig gesteigerte Proliferationsaktivität sind Onkogene und Tumorsuppressorgene von besonderem Interesse.

1.6 Therapie

Die chirurgisch-onkologische Therapie ist bislang das einzige potenziell kurative Behandlungsverfahren des kolorektalen Karzinoms. Das operative Vorgehen umfasst dabei die Resektion des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand im Gesunden und die En-bloc-Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes, wozu die möglichst zentrale, radikuläre Ligatur der versorgenden Gefäße erforderlich ist. Das Ausmaß der Darmresektion wird weitgehend durch die zentrale Gefäßunterbindung, das heißt durch den Umfang der Devaskularisation, bestimmt. Nach dem internationalen Dokumentationssystem für das kolorektale Karzinom von 1991 wird dieses onkologische Operationsverfahren auch als radikale Resektion bezeichnet (1).

Für das Kolonkarzinom resultieren je nach Lokalisation des Primärtumors aufgrund der erforderlichen Gefäßligaturen folgende Standardresektionen: Hemikolektomie rechts, Kolon-

Transversum-Resektion, Hemikolektomie links, Sigmaresektion. Der durch die Gefäßunterbindung bestimmte Resektionsumfang gewährleistet beim Kolonkarzinom stets die Einhaltung der onkologisch begründeten Sicherheitsabstände von 3 cm am frischen, nicht ausgespannten Resektat. Beim Sigmakarzinom ist derzeit noch umstritten, ob die Hemikolektomie links oder die Sigmaresektion vorzuziehen ist.

Beim Rektumkarzinom besteht ein wesentlicher Aspekt für die chirurgisch-onkologische Therapie in der En-bloc-Entfernung des Mesorektums, da Rektumkarzinome typischerweise schon frühzeitig extramurale Satellitenmetastasen im Mesorektum bilden (45, 46). Das Ausmaß des erforderlichen Sicherheitsabstandes und das der En-bloc-Entfernung des Mesorektums richtet sich nach der Lokalisation des Rektumkarzinoms. Bei Sitz des Karzinoms im oberen Rektumdrittel wird ein Sicherheitsabstand von 3 cm am frischen, nicht ausgespannten Resektat und die partielle En-bloc-Entfernung des Mesorektums durchgeführt, wohingegen der Sitz des Karzinoms in den unteren zwei Rektumdritteln einen Sicherheitsabstand von 1-2 cm sowie die totale En-bloc-Entfernung des Mesorektums erfordert, die erstmals von Heald et al. als totale mesorektale Exzision (TME) beschrieben wurde (45, 46). Für das Rektumkarzinom bieten sich je nach Tumorlokalisierung und -größe folgende Operationsverfahren an: die tiefe anteriore oder intersphinkteräre Rektumresektion und die abdomino-perineale Rektumexstirpation. Nach Möglichkeit wird das kontinenserhaltende Verfahren, die tiefe anteriore Rektumresektion, bevorzugt. Eine lokale chirurgische Tumorexzision in kurativer Absicht ist bei sogenannten „*low-risk-Rektumkarzinomen*“ (pT1, G1-2, M0) vertretbar, wobei das Karzinom durch einen transanal chirurgischen oder einen endoskopisch mikrochirurgischen Eingriff im Gesunden entfernt wird.

Die Indikation zur subtotalen Kolektomie beim kolorektalen Karzinom besteht unter folgenden Bedingungen: Karzinomlokalisierung an der Grenze zweier Lymphabflussgebiete, Vorliegen synchroner Karzinome oder Adenome, FAP, HNPCC, Karzinome bei Colitis ulcerosa und akuter Obstruktion. Bei Befall von Nachbarorganen sind erweiterte Operationen möglich, bei denen der tumortragende Darmabschnitt En-bloc mit den infiltrierten Nachbarorganen entfernt wird. Auch R-0-resezierbare Metastasen in Leber und Lunge sollten chirurgisch entfernt werden.

Palliative Behandlungsmaßnahmen kommen bei nicht kurablen Tumorleiden oder anderweitig eingeschränkter Lebenserwartung zum Einsatz. Das Ziel solcher Maßnahmen ist

primär der Erhalt bzw. das Erreichen einer zufriedenstellenden Lebensqualität. Neben der chirurgischen Palliativbehandlung, bei der die Radikalität des operativen Vorgehens eingeschränkt ist, stehen endoskopische, strahlen- und chemotherapeutische sowie medikamentöse und interventionell radiologische Maßnahmen zur Verfügung.

Zusätzlich zu den operativen Therapiestrategien bieten sich zur Behandlung kolorektaler Karzinome insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien neoadjuvante und adjuvante Behandlungsverfahren an. So wird beim Rektumkarzinom zur Senkung der Lokalrezidivrate im Stadium UICC II und III eine adjuvante Radiochemotherapie empfohlen. Als Maßnahme zur Tumorverkleinerung („*down-sizing*“) bei lokal fortgeschrittenen (T3-4, N0, M0 bzw. T1-4, N1, M0) oder primär nicht kontinenserhaltend operablen Rektumkarzinomen empfiehlt sich ebenfalls eine vor der Operation durchgeführte neoadjuvante Radiochemotherapie (47). Beim Kolonkarzinom hingegen wird eine adjuvante Chemotherapie im UICC III Stadium durchgeführt (48, 49). Für Kolonkarzinom im UICC-Stadium II wird außerhalb von Studien keine adjuvante Chemotherapie empfohlen, da ein Überlebensvorteil noch nicht gesichert werden konnte. Eine neoadjuvante Therapie beim Kolonkarzinom ist bisher nicht etabliert.

1.7 Prognose

1.7.1 Histopathologische Prognosefaktoren

Da die meisten Tumorrezidive innerhalb von fünf Jahren nach operativer Resektion auftreten, lässt sich anhand der 5-Jahres-Überlebensrate eine Aussage über die Prognose der Patienten treffen. Für die meisten soliden Tumoren, so auch für das kolorektale Karzinom, ist die anatomische Ausbreitung des Tumors der weitaus wichtigste prognostische Faktor. Dabei ist die anatomische Ausbreitung des Tumors vor der Therapie von jener nach Primärtherapie zu unterscheiden. Die erstere wird im TNM-System erfasst, der Tumorstatus nach Primärtherapie in der Residual-(R-)Klassifikation (siehe Abschnitt 1.4.4).

Der wichtigste prognostische Faktor für den Patienten ist die R-Klassifikation. Das Erreichen akzeptabler Langzeitergebnisse (5-Jahres-Überlebensrate zwischen 69,6 und 75,8 %) ist nur bei Patienten erreichbar, die residualtumorfrei (R-0) sind, wohingegen die Prognose R-1- und R-2-resezierter Patienten äußerst ungünstig ist (5-Jahres-Überlebensrate zwischen 4,3 und 10,7 %) (50).

Der Krankheitsverlauf bei Patienten mit Residualtumor (R-1- und R-2-Resektion) wie auch jener ohne Tumorresektion wird in erster Linie durch das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen sowie von der Lokalisation des Residualtumors bestimmt. Die medianen Überlebenszeiten betragen bei ausschließlich lokoregionärem Residualtumor 17,4, bei Fernmetastasen 9,8 und beim gleichzeitigen Auftreten beider Residualtumorformen 6,7 Monate (35). Bei R-0-resezierten Patienten stellt das TNM abhängige UICC Stadium des Primärtumors den entscheidenden prognostischen Faktor dar (siehe Tabelle 3).

UICC-/ TNM-Stadium	5-Jahres-Überlebensraten (%)
Stadium 0, I (Tis, T1; N0; M0)	>90
Stadium I (T2; N0; M0)	80-85
Stadium II (T3, T4; N0; M0)	70-75
Stadium III (T2; N1-3; M0)	70-75
Stadium III (T3; N1-3; M0)	50-65
Stadium III (T4; N1-3; M0)	24-45
Stadium IV (M1)	<3

Tabelle 3 UICC-Stadium abhängige Prognose kolorektaler Karzinome (51)

Allerdings wird die zur Zeit gebräuchliche Beurteilung der Prognose anhand des UICC Stadiums nicht ausreichend den individuell variierenden Krankheitsverläufen gerecht. Zur Präzisierung der Prognose wurden weitere UICC Stadium-unabhängige histopathologische Prognosefaktoren beschrieben: der histologische Differenzierungsgrad, Veneneinbrüche, Lymphgefäß- und Perineuralscheideninvasion, die histologische Beschaffenheit des Tumorrandes und das Ausmaß der peritumorösen lymphozytären Infiltration (51-55).

Zu den wahrscheinlichen prognostischen Tumor-, Patienten- und Behandlungs-assoziierten Kriterien zählen des weiteren: die Lokalisation des Primärtumors, das Auftreten einer Obstruktion/ Tumorperforation, das Geschlecht des Patienten, die Technik der Tumormobilisation, die intraoperative Tumorzell dissemination, der Chirurg und die Erfahrung der behandelnden Klinik (50).

1.7.2 Molekularbiologische Prognosefaktoren

Neben den etablierten histopathologischen prognostischen Faktoren wurden in Studien eine Reihe molekularbiologischer Parameter beschrieben, deren prognostische Relevanz möglich bis wahrscheinlich ist, aber in unabhängigen Studien noch bestätigt werden muss.

Unter den molekularbiologischen Parametern fand bisher lediglich der CEA-Serum-Spiegel als prognostischer Faktor Anerkennung (50, 52, 53), der nach Empfehlungen des American Joint Committee von 2000 (52) das etablierte auf den TNM Kategorien basierende Stadieneinteilungssystem für das kolorektale Karzinom ergänzen soll.

Die potenziellen molekularbiologischen Prognosefaktoren umfassen Onkogene, Tumorsuppressorgene, Angiogenese-, Adhäsions-, Apoptosefaktoren, Proteasen, Proteaseinhibitoren sowie die entsprechenden Rezeptoren. Eine exemplarische Übersicht hierzu liefert Tabelle 4.

Marker Klassen	prognostische Marker
Onkogene/ Protoonkogene	Ras, Erb-B2 (Her-2/neu), epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factors (z.B. TGF- α , TGF- β 1)
Tumorsuppressorgene	p53/ 17p LOH, DCC/ 18q LOH, 5q allelic loss, MSI, DNA Hypermethylation, p27, p21, nm23
Angiogenesefaktoren	vascular endothelial growth factor (VEGF)
Adhäsionsfaktoren	Cell adhesion molecules (z.B. ICAM-1), CD44v6
Apoptosefaktoren	Bcl-2, Superoxid Dismutase, Glutathion S-Transferase π
Proteasen, Proteaseinhibitoren	Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA), PA-Inhibitor (PAI), uPA-Rezeptor (uPA-R), Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Cathepsin B
Andere	Sialyl-Le ^a , Sialyl-Le ^x , Cyclin D1, Ki-67, C-reaktives Protein (CRP)

Tabelle 4 Molekularbiologische Marker mit potenziell prognostischer Relevanz beim kolorektalen Karzinom

Eine Vielzahl von Studien befasste sich mit der Evaluation dieser und anderer molekularbiologischer prognostischer Marker. Obwohl sich für einige Gene und Genprodukte genetische Alterationen in kolorektalen Karzinomen regelmäßig nachweisen ließen, blieb ihre prognostische Relevanz aufgrund uneinheitlicher Ergebnisse, fraglich. So zeigten z.B. Studien signifikante Ergebnisse für die prognostischen Wert für K-ras Mutationen (56), während andere Studien Gegenteiliges beschrieben (57). Widersprüchliche Studien existieren auch zur prognostischen Relevanz von p53 (58, 59) sowie der „*loss-of-heterozygosity*“ (LOH) von Chromosom 18q (60, 61).

Eine mögliche Erklärung für die uneinheitlichen Ergebnisse ist die intratumoröse genetische Heterogenität, die in einer Studie von Baisse et al. für das kolorektale Karzinom beschrieben wurde (62), wie auch bereits zuvor in anderen Studien für das Prostata Karzinom (63, 64), das Mamma Karzinom (65), das Ösophagus Karzinom (66) und andere Tumorentitäten.

Die biologische Ursache für die erwähnte intratumoröse genetische Heterogenität liegt möglicherweise in der schrittweise erfolgenden Akkumulation genetischer Veränderungen im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese. Dabei bedeutet jede zusätzliche Mutation in einer Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den restlichen Zellen, die folglich durch die Proliferations-kompetentere Zelle überwuchert werden.

1.8 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion dient der Entnahme von morphologisch definierten Zellen bzw. Zellverbänden aus inhomogenen Geweben. Dabei stehen bei der Mikrodissektion die Zellen bis zu ihrer Entnahme unter dem natürlichen Einfluss benachbarter Bindegewebszellen, so dass die Genexpression, im Gegensatz zur Erzeugung homogener Zellpools aus Zelllinien, unter weitgehend natürlichen Bedingungen untersucht werden kann (67).

Im Rahmen von Genexpressionsanalysen gewann die Mikrodissektion zunehmend mehr an Bedeutung, da die genetischen Expressionsprofile von Tumorzellen durch die genetische Information anderer im Tumorgewebe enthaltener Bindegewebszellen, wie z.B. Fibroblasten, Leukozyten, Endothel- und Nervenzellen, gestört wird (68).

Anfangs kam neben den manuell und Mikromanipulator-gesteuerten Nadelmethoden (69, 70) die negative Ablation zur Anwendung, bei der unerwünschte Zellareale durch ultraviolettes Licht zerstört bzw. inaktiviert wurden und darauffolgend die erwünschten Zellverbände mechanisch isoliert werden konnten (71, 72). Später wurden Laser gestützte Mikrodissektionsverfahren entwickelt, wie die laser capture microdissection (LCM) (73, 74) und die Laser microbeam microdissection (LMM) (75), deren Vorteil gegenüber älterer Methoden in der verbesserten Präzision und Reproduzierbarkeit lag (76).

Die LCM wurde 1996 am National Cancer Institute entwickelt und fand seither in verschiedensten Genexpressionsstudien erfolgreich Anwendung. Bei der LCM wird das Zielgewebe durch ein computergesteuertes Mikroskop visualisiert, mittels Computer aided design (CAD) markiert und anschließend durch einen niedrig-energetischen infrarot Laser

vom übrigen Gewebe getrennt. Dabei verschmilzt die thermolabile Ethylvinylacetat (EVA) Membran eines Trägermediums, welches zuvor auf den gefärbten und getrockneten Kryoschnitt gesetzt wurde, interkalierend mit dem Rand des ausgeschnittenen Gewebeareals, so dass das mikrodisezierte Zielgewebe sogleich anhaftend am Trägermedium in ein Eppendorfgefäß überführt werden kann. Diese Vorgehensweise wird auch als no-touch-technology bezeichnet und wird in Abbildung 3 veranschaulicht.

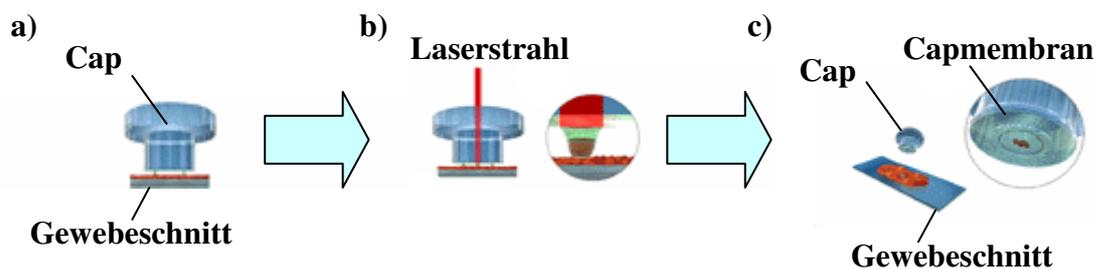


Abbildung 3 Prinzip der no-touch-technology bei der Laser gestützten Mikrodisektion: ein Cap wird auf einen Gewebeschnitt gesetzt (a), der Laser schneidet ein beliebiges Gewebeareal aus, so dass die Membran des Caps mit dem Rand des ausgeschnittenen Gewebes verschmilzt (b), bei der Abnahme des Caps bleibt das Gewebe an der Capmembran haften (c)

Da die Wellenlänge des Lasers ungefähr dem Absorptionsmaximum der EVA Membran entspricht und die lediglich 0,5 bis 5ms andauernden infraroten Laserimpulse energetisch niedrig sind, wird die meiste Energie von der EVA Membran absorbiert und die im Gewebe erzeugten Temperaturen liegen bei max. 90 °C. Nukleinsäuren und andere Makromoleküle werden somit nicht geschädigt (54) und können für Chiparrayexperimente verwendet werden (76, 77).

Die in dieser Arbeit angewandte Laser gestützte Mikrodisektion entspricht einer modifizierten Form der LCM, wobei anstelle des infrarot Lasers ein ultraviolett Laser verwendet wird.

1.9 Chiparray basierte Genexpressionsanalysen

Die Chiparray Technologie ermöglicht durch die zeiteffektive simultane Expressionsanalyse tausender Gene, das gesamte Genom auf potenzielle Onko-, bzw. Tumorsuppressorgene zu durchsuchen, um so einerseits Rückschlüsse auf die Tumorgenese ziehen zu können und

andererseits Kandidatengene beziehungsweise Biomarker zur Präzisierung der Diagnostik sowie für neue Therapieansätze zu finden.

Derzeit kommt die Chiparray Technologie vornehmlich in zwei unterschiedlichen Formen zur Anwendung: als Oligonukleotidarray-Technologie sowie als cDNA-Array-Technologie. Diese Verfahren unterscheiden sich vor allem bezüglich ihrer Herstellung und ihrer Messprinzipien. Während für die Herstellung der Oligonukleotidarrays die kurzen single-stranded DNA-Fragmente (20-60 Nukleotide lang) mit Hilfe photolithographischer Techniken direkt auf der Oberfläche des Trägermaterials synthetisiert werden (78, 79), werden die längeren cDNA-Fragmente (500-5000 Nukleotide lang) für die cDNA-Arrays in separaten Ansätzen amplifiziert und anschließend robotergesteuert auf die entsprechenden Felder der Rasteroberfläche des Chips überführt (80, 81). Gegenüber den cDNA-Arrays mit 1 bis 2kb langen Sonden haben Oligonukleotidarrays den Vorteil, dass die verhältnismäßig kurzen Sonden sequenzspezifisch aus dem Genom gezielt ausgewählt werden können und sich somit Kreuzhybridisierungen minimieren lassen (82). Die Photolithographie, die der Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidarrays dient, ist der Halbleiterindustrie entlehnt und ermöglicht bis zu 300.000 unterschiedliche Sonden auf einer Fläche von 1,28 cm x 1,28 cm in situ zu synthetisieren. Dabei werden pro Sonde auf einer Fläche von $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 10^6 bis 10^7 Kopien eines Oligonukleotids erzeugt (83). Als Trägermaterialien finden Silikon, Glas, Nylon und Nitrozellulose Verwendung, wobei sich insbesondere Glas eignet, da es gut haltbar und nicht porös ist und eine niedrige Hintergrundfluoreszenz aufweist (84). Für die Genexpressionsmessung werden Oligonukleotidarrays mit nur einer Probe hybridisiert, so dass die Höhe der Genexpression der absoluten Intensität des Fluoreszenzsignals entspricht (85). Die cDNA-Arrays hingegen werden gleichzeitig mit der Testprobe und einer Referenzprobe hybridisiert, welche durch verschiedene Farbstoffe markiert sind, damit über den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten die relative Genexpressionshöhe errechnet werden kann (81). Dennoch können mit beiden Methoden nur relative Transkriptionsniveaus und keine absoluten Mengen oder gar die Kopienzahl bestimmt und miteinander verglichen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidarrays werden von Affymetrix Inc. einsatzbereit bezogen. Die Oligonukleotidchips werden mit cRNA hybridisiert, die zuvor durch in-vitro Transkriptionen amplifiziert und mit Biotin markiert wurde. An das Biotin

wird anschließend ein Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex gebunden, der in der Lage ist, nach Anregung durch Licht zu fluoreszieren.

Für die Synthese der Oligonukleotidarrays werden für jedes Gen mit Hilfe bestimmter Algorithmen von Affymetrix Inc. Oligonukleotide bzw. Sonden mit einer Länge von 25 Basenpaaren ausgewählt. Da diese Sondenlänge jedoch keine hochspezifische Hybridisierung der Ziel-RNA zulässt, werden für jedes zu detektierende Gen verschiedene Oligonukleotide, die sich nicht überlappen, verwendet. Zudem werden zur Kontrolle der Hybridisierungsspezifität für jedes fehlerfreie Oligonukleotid (PM = *perfect match*) zusätzlich ein Oligonukleotid mit einer in der Mitte gelegenen Fehlpaarung synthetisiert (MM = *miss match*). Die Fehlpaarung an der Position 13 entspricht jeweils der komplementären Base zur perfekten Sequenz. Die „*miss match*“ Sonden ermöglichen einerseits Hintergrundsignale, wie z.B. das durch Eigenschaften des Scanners verursachte Rauschen der Signale, oder unspezifische Interaktionen, wie z.B. Kreuzhybridisierungen oder unspezifische Hybridisierungen, zu quantifizieren und zu verrechnen (85, 86). Das „*perfect match*“ und das korrespondierende „*miss match*“ Oligonukleotidfeld bilden zusammen ein Probenpaar und werden mit anderen Probenpaaren, die für das gleiche Gen spezifisch sind, zu einem Gen spezifischen Probensatz vereinigt (87) (siehe Abbildung 4).

In dieser Arbeit wird der Affymetrix Genchip HG-U133 verwendet, der mit seinen etwa 45.000 Probensätzen die simultane Expressionsanalyse von ca. 33.000 bekannten menschlichen Genen ermöglicht. Jeder SONDENSATZ dieses Chips setzt sich aus je 11 „*perfect match*“ und 11 „*miss match*“ Sonden zusammen. Die Sequenzen, auf denen die Sonden beruhen, entstammen der „UniGene Database“ und werden zusätzlich mit Daten aus zwei weiteren, öffentlich zugänglichen Datenbanken ergänzt („Washington University EST Trace Repository“ und „University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Database“).

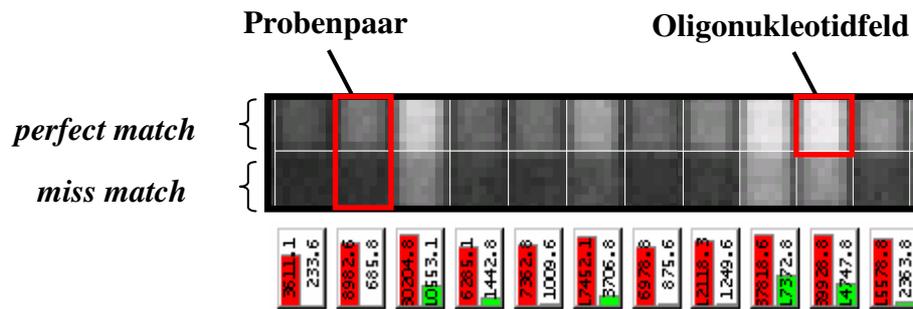


Abbildung 4 Gescanntes Bild eines Affymetrix Probenatzes mit den 11 fehlerfreien („*perfect match*“) und den 11 fehlerhaften („*miss match*“) Oligonukleotidfeldern. Die Balkendiagramme und die dazugehörigen Werte geben die gescannten Fluoreszenzintensitäten in rot für „*perfect match*“ und in grün für „*miss match*“ wider.

Bislang sind unter Anwendung der Chiparray Technologie für verschiedene Tumorentitäten differenziell exprimierte Gene identifiziert worden: Kolorektales Karzinom (88-93), Pankreaskarzinom (94, 95), Bronchialkarzinom (96), Ösophaguskarzinom (97), Mammakarzinom (98), Prostatakarzinom (99) und andere.

Darüber hinaus ließen sich mit Hilfe der Chiparray Technologie tumorphänotyp- sowie tumorstadienspezifische genetische Expressionsprofile identifizieren, die Tumore über die etablierten histopathologischen Merkmale hinausgehend in prognostisch und therapeutisch relevante molekularbiologische Subgruppen einteilten und somit zur Optimierung von Prognostik und Therapie beitragen könnten. Molekularbiologische Signaturen mit einer klinisch relevanten gruppeneinteilenden Potenz sind bereits für verschiedene Tumorentitäten beschrieben worden. So entwickelten Golub et al. ein Klassifizierungsverfahren, welches basierend auf Chiparray generierten Expressionsdaten Leukämien in akute myeloische und akute lymphatische Leukämien einteilte (82) und Alizadeh et al. erarbeiteten eine Signatur zur prognoserelevanten Subklassifikation von B-Zell Lymphomen (100). Van de Vijver et al., Perou et al. und Sorlie et al. beschrieben charakteristische prognoserelevante Expressionsprofile in Mammakarzinomen (101-103). Kitahara et al. vermochten anhand genetischer Expressionsprofile die Chemotherapiesensitivität von Patienten mit Ösophagus Karzinomen vorherzusagen (104). Für das kolorektales Karzinom generierten Alon et al., Lin et al., Frederiksen et al. und Notterman et al. tumorstadien-typische molekularbiologische Signaturen (91, 105-107). Des weiteren wurden klinisch relevante Klassifikation bzw. Subklassifikation für Bronchialkarzinome (108) und Blasenkarzinome (109) beschrieben.