

Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. J. R. Siewert)

**Prognostische Wertigkeit der tumorassoziierten Proteasen (uPA, uPA-R,
Kathepsin D) und ihrer Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) beim R0-resezierten**

Kolon- und Rektumkarzinom

Alexander Zimmermann

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Privatdozent Dr. O. F. H. Nekarada
 2. Univ.- Prof. Dr. J. R. Siewert

Die Dissertation wurde am 22.11.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2002 angenommen.

**In Liebe
und Dankbarkeit
für die Geduld und Unterstützung
meinen Eltern**

**Prognostische Wertigkeit der tumorassoziierten Proteasen (uPA, uPA-R,
Kathepsin D) und ihrer Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) beim R0-resezierten
Kolon- und Rektumkarzinom**

I.	Einleitung	Seite
1.1.	Epidemiologie und Klinik des Kolon- und Rektumkarzinoms	1
1.2.	Metastasierungswege	3
1.3.	Prognosefaktoren beim Kolon- und Rektumkarzinom	6
1.4.	Tumorassoziierte Proteasen und deren Inhibitoren	8
1.5.	Bedeutung der Proteasen und deren Inhibitoren bei der Tumormetastasierung	11
1.6.	Fragestellung	13
II.	Patienten , Material und Methoden	14
2.1.	Patienten	14
2.1.1.	Kolon	15
2.1.2.	Rektum	16
2.1.3.	Normale Schleimhaut	17
2.1.4.	Datendokumentation und Nachsorge	17
2.2.	Material	18
2.3.	Methode der ELISA-Messung	19
2.4.	Methoden der Statistik	20
III.	Ergebnisse	22
3.1.	Kolon	22
3.1.1.	uPA	22
3.1.2.	uPA-R	23
3.1.3.	Kathepsin D	24
3.1.4.	PAI-1	25
3.1.5.	PAI-2	26
3.1.6.	Multivariate Cox-Regressionsanalyse	27
3.1.7.	CART-Analyse	28
3.2.	Rektum	30
3.2.1.	uPA	30
3.2.2.	uPA-R	31

3.2.3. Kathepsin D	32
3.2.4. PAI-1	33
3.2.5. PAI-2	34
3.2.6. Multivariate Cox Regressionsanalyse	35
3.2.7. CART-Analyse	36
3.3. Kolorektales Gesamtkollektiv und Überleben	37
3.3.1. uPA	37
3.3.2. uPA-R	38
3.3.3. Kathepsin D	38
3.3.4. PAI-1	39
3.3.5. PAI-2	40
3.3.6. Multivariate Cox-Regressionanalyse	41
3.4. Vergleich der Verteilung der Proteasen und deren Inhibitoren	43
3.4.1. Stadium I	43
3.4.2. Stadium II	43
3.4.3. Stadium III	44
IV. Diskussion	45
V. Zusammenfassung	53
VI. Ausblick	55
VII. Literaturverzeichnis	56
VIII. Anhang	65
8.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	65
8.2. Abkürzungen	67
Danksagung	68
Lebenslauf	69

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Klinik des Kolon- und Rektumkarzinoms

Die Inzidenz der kolorektalen Karzinome in Europa stieg in den letzten 20 Jahren von 5 bis 15 pro 100 000 auf etwa 15 bis 25 an. Trotzdem war in den letzten 40 Jahren eine Abnahme der Mortalität zu beobachten. Dies lag vor allem an den intensiven Maßnahmen zur Früherkennung und der damit verbundenen Vorverlegung der Diagnose und der Behandlung von frühen Stadien. Somit ist das Kolon- und Rektumkarzinom eines der wenigen Tumoren, das trotz einer zunehmenden Inzidenz eine abnehmende Mortalität zu verzeichnen hat. Statistisch gesehen beträgt das Lebenszeitrisko, um an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, etwa 5 – 6%, während das Risiko an einem solchen Tumor zu versterben bei 2,5 – 3% liegt (Schmoll et al, 1999).

Weltweit liegt der Anteil der Kolon- und Rektumkarzinome an den gesamten malignen Tumorerkrankungen bei ca. 9%. Sie sind somit in den USA sowohl bei den Frauen der 3. häufigste Tumor nach dem Mamma- und Bronchialkarzinom, als auch bei den Männern nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom (American Cancer Society, 2001). In Deutschland stellen die Kolon- und Rektumkarzinome sogar mit 32,9 Sterbefällen bei den Männern und 40,1 Fällen bei den Frauen je 100 000 Einwohnern altersstandardisiert jeweils die zweithäufigste Todesursache dar (Tumorzentrum München, 2001).

In der Bundesrepublik Deutschland kann die jährliche Neuerkrankungsrate nur mit Hilfe des saarländischen Krebsregisters abgeschätzt werden. Dieses gibt für Männer und Frauen getrennt 30 bis 40 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr an. In verschiedenen Ländern weichen die Neuerkrankungsraten teilweise sehr stark voneinander ab. So sind die höchsten unter der weißen Bevölkerung von Kalifornien und den japanischen Einwohnern von Hawaii (54/100 000) zu finden, während sie zum Beispiel in Israel oder Gambia (1,3/100 000) am niedrigsten sind (Schmoll et al, 1999).

Die Inzidenz steigt ab dem 45. Lebensjahr steil an und erreicht um das 65. Lebensjahr ihren Häufigkeitsgipfel. Im Alter zwischen 50 und 80 Jahren werden 70% der

Diagnosen eines kolorektalen Karzinoms gestellt, wobei in letzter Zeit ein Anstieg der Inzidenz für die Altersgruppe von 35 Jahren zu verzeichnen ist.

Eine Vielzahl von Studien und Analysen zeigen die Bedeutung von Umweltfaktoren bei der Entstehung von Kolon- und Rektumkarzinomen auf. Dabei spielen die Ernährungsgewohnheiten neben familiären und hereditären Faktoren und der eigenen Prädisposition die größte Rolle (Hsing et al, 1998). So steigt das Risiko bei tierischen Fetten, bei rotem Fleisch und bei einer faser-, gemüse- und kalziumarmen Ernährung. Dazu tragen auch mangelnde körperliche Bewegung und ein erhöhter Bierkonsum bei (Giovannucci et al, 1994 und 1998). Allerdings zweifeln neuere Studien die Rolle von faserreicher Kost bei der Adenomentstehung, die oft Ausgangspunkt bei der Karzinomentwicklung sind, an (Bonithon-Kopp et al, 2000).

90% der Karzinome entstehen auf diese Art und Weise durch die Mutation einer Vielzahl von Genen in der Adenom-Karzinom-Sequenz. Die restlichen 10% der Kolon- und Rektumkarzinome entstehen durch karzinogene Einflüsse auf dem Boden einer genetischen Prädisposition (Vogelstein et al, 1988; Toribara et al, 1995). Zu diesen genetischen Alterationen zählt die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die familiäre juvenile Polyposis, das Peutz-Jehgers-, Gardner- und Turcot-Syndrom (Hamilton et al, 1995) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC-Syndrom; Peltomaki et al, 1997).

Für die Zukunft muss das Ziel sein die Inzidenz dieser Karzinome durch eine geeignete Prävention zu reduzieren.

Dabei spielt die primäre Prävention durch diätetische und medikamentöse Maßnahmen eine wichtige Rolle. Es sollten bereits erste Erkenntnisse umgesetzt werden, obwohl die endgültige Klärung erst noch in großen Studien stattfinden muss. Bis jetzt hat sich abgezeichnet, dass die Einnahme von niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (100 mg/Tag p.o. bis zum Lebensende) zu einer Risikoreduktion von ca. 40 – 50% führen soll. Der Wirkungsmechanismus ist auf die Hemmung der Cyclooxygenase-2 zurückzuführen (Giovannucci et al, 1999). Daraufhin wurden große klinische Studien initiiert, um die Wirksamkeit spezifischer Cyclooxygenase-2-Inhibitoren zur Prävention von Kolon- und Rektumkarzinome zu testen. N-Acetyl-L-cystein-Protease-Inhibitoren, Antioxidantien und Glutathion-S-Transferase-Induktoren, Folsäure (mehr als 400µl/Tag), sowie möglicherweise Buttersäure (Induktion von Apoptose) oder Folsäure (Korrektur einer gestörten DNA-Methylierung) (Levin et al, 1995) stellen

weitere Möglichkeiten zur Chemoprävention dar. Zusätzlich sollte auf eine vermehrte körperliche Bewegung geachtet werden.

Der nächste Schritt ist die sekundäre Prävention. Dabei handelt es sich um Screeningmethoden, die eine Karzinomfrüherkennung erleichtern sollen. Hier sollte primär zum Nachweis von occultem Blut der Hämooculttest eingesetzt werden. Auch eine digitale-rektale Untersuchung erweist sich als sinnvoll, da sie Prozesse bis maximal 10 cm ab ano erreichen kann. Zusätzlich müssen diagnostische und therapeutische Strategien, in Form von Rekto-Sigmoidoskopien (bei Bedarf mit einer Koloskopie kombiniert), für Risikogruppen entwickelt werden. Dazu zählen vor allem Patienten mit den oben genannten Formen der familiären Krebs syndrome.

1.2. Metastasierungswege

Kolonkarzinom

Beim Kolonkarzinom findet zuerst meist eine Metastasierung über den Lymphabfluss statt. Dabei entsprechen die Abflusswege der arteriellen Versorgung entlang der A. ileocolica, A. colica dextra, den beiden Ästen der A. colica media und dem kurzen Stamm der A. mesenterica inferior mit der A. colica sinistra und den Aa. sigmoideae. Es finden sich im allgemeinen die befallenen Lymphknoten nicht weiter als 2 – 3 cm vom Tumorrand entfernt.

Als ein Lymphknotenbefall der pN1- (1 bis 3 Lymphknoten befallen) und pN2-Kategorie (mehr als 4 Lymphknoten befallen) gilt eine Metastasierung in die parakolischen Lymphknoten. Die pN3-Kategorie wurde mit der neuen UICC-Klassifikation von 1997 abgeschafft. Befallene Lymphknoten, die über die oben genannten Hauptstämme hinausreichen, z.B. paraaortal, werden als juxtaregionäre Lymphknoten bezeichnet und gelten nach der neuen Klassifikation als Fernmetastasen (M_{1LYM}).

Die Leber ist aufgrund des venösen Abflusses über das Pfortadersystem das erste Metastasierungsorgan. Die Lunge ist der zweithäufigste Metastasierungsort. Es folgen in der Häufigkeit Skelettmetastasen und Befall von Nebenniere und Gehirn. Eine peritoneale Metastasierung kann sich im fortgeschrittenen Stadium finden.

Rektumkarzinom

Beim Rektumkarzinom findet ähnlich wie beim Kolonkarzinom zuerst meist eine Metastasierung über den Lymphabfluss statt. Dagegen führt das Rektum nur relativ wenig Lymphgefäße, so dass die Möglichkeit der Metastasierung erst mit der Invasion in die Muscularis mucosae und Submukosa beginnt. Dabei verlaufen die Lymphgefäße entlang der A. rectalis superior zur A. mesenterica inferior und über die Aa. rectales inferiores zur seitlichen Beckenwand über die Arteria iliaca interna Gefäße. Bei sehr tiefen Tumorsitz besteht aber auch die Möglichkeit ähnlich dem Analkarzinom nach distal und inguinal zu metastasieren.

Nach der UICC-Klassifikation von 1997 werden befallene Lymphknoten distal der Abzweigung der A. mesenterica inferior in das N1- oder N2-Stadium eingeteilt. Darüber hinaus reichende Lymphknoten gelten definitionsgemäß als Fernmetastasen (M_{LYM}).

Die venösen Metastasierungsorgane gleichen denen beim Kolonkarzinom, jedoch kommen Lungenmetastasen beim Rektum gehäuft vor.

TNM-Klassifikation und Stadiengruppierung des Kolon- und Rektumkarzinoms (UICC, 1997)

T Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Carcinoma in situ ¹
T2	Tumor infiltriert Submukosa
T3	Tumor infiltriert die Muscularis propria hindurch in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen ² und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

Anmerkungen:

¹Tis liegt vor, wenn Tumorzellen innerhalb der Basalmembran der Drüsen (intraepithelial), oder in der Lamina propria (intramukös) nachweisbar sind, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist.

²Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigma durch ein Zökalkarzinom.

N Regionäre Lymphknoten

- NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastasen in 1 bis 3 regionäre Lymphknoten
- N2 Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

pN0: Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von 12 oder mehr Lymphknoten

Anmerkung: Ein mehr als 3 mm großes Tumorknötchen im perirektalen oder perikolischen Bindegewebe ohne histologischen Anhalt für Reste eines Lymphknotens wird in der N-Kategorie als regionäre Lymphknotenmetastase klassifiziert. Ein Tumorknötchen bis 3 mm Größe wird in der T-Kategorie als diskontinuierliche Ausbreitung, d.h. T3, klassifiziert.

M Fernmetastasen

- MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
 - M0 Keine Fernmetastasen
 - M1 Fernmetastasen
-

Stadiengruppierung

Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium I	T1, T2	N0	M0	<i>Dukes A</i>
Stadium II	T3, T4	N0	M0	<i>Dukes B</i>
Stadium III	jedes T	N1, N2	M0	<i>Dukes C</i>
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	<i>Dukes D</i>

Anmerkung: Dukes B setzt sich zusammen aus einer Gruppe mit besserer (T3 N0 M0) und schlechterer (T4 N0 M0) Prognose, ebenso Dukes C (jedes T N1 M0 und jedes T N2 M0).

Grading

- GX Differenzierung kann nicht bestimmt werden
 - G1 Gut differenziert
 - G2 Mäßig differenziert
 - G3 Schlecht differenziert
 - G4 Undifferenziert
-

1.3. Prognosefaktoren beim Kolon- und Rektumkarzinom

Die heutigen Therapierichtlinien beim Kolon- und Rektumkarzinom richten sich vor allem nach der TNM-Klassifikation der UICC. Um die angestrebte individuelle Tumorthherapie auch tatsächlich zu erreichen, bedarf es weiterer und neuer Prognosefaktoren, die in der Lage sind, eine genauere Einteilung und Risikoabschätzung einer Tumorerkrankung zu ermöglichen. Erst dadurch kann eine unter interdisziplinären Gesichtspunkten optimale Therapiestrategie in die Wege geleitet werden.

Dass ein Prognosefaktor von der UICC auch als ein solcher akzeptiert wird, muss er mehrere Kriterien erfüllen. Für die Evaluation muss die intra-/interinstitutionelle Messvariabilität getestet werden, der neue Prognosefaktor mit etablierten korreliert werden, ein begrenztes Kollektiv univariat endpunktanalysiert werden, das Kollektiv auf mindestens 100 auswertbare Patienten erweitert werden, das Patientengut einer anderen Institution gleich statistisch analysiert werden und eine Konfirmation in einer prospektiven, möglichst multizentrischen Studie stattfinden.

Damit der Prognosefaktor dann akzeptiert wird, muss die Methode standardisiert werden, multivariat gegen etablierte Prognosefaktoren in einem zweiten Datenset einer anderen Institution mit möglichst einer anderen Meßmethode signifikant sein, eine zusätzliche prognostische Information erbringen, für einen Endpunkt und ein Patientenkollektiv definiert sein und durch eine praktikable Methode für die meisten behandelnden Institute preisgünstig und problemlos bestimmbar sein (Hermanek, 1999).

Nur wenn ein Faktor auf diese Weise evaluiert wurde, hat er die Möglichkeit, als Prognosefaktor durch die UICC akzeptiert zu werden. Zu den etablierten Faktoren zählen auf der einen Seite sogenannte konventionelle Parameter, wie zum Beispiel das TNM-System, das die anatomische Ausbreitung des Tumors kategorisch erfasst, als auch neue biologische Faktoren, die auf die biochemischen und molekularen Eigenschaften des Tumors eingehen.

Etablierte und neue Prognosefaktoren

Die TNM-Kategorien der UICC sind von größter Bedeutung bei den etablierten Faktoren. Sie beschreiben die aktuelle Tumorausdehnung in Form der

Tumorinvasionstiefe pT, des nodalen Status pN und der pM-Kategorie (Auftreten von Fernmetastasen) (Hermanek et al, 1995).

Auch das histologische Grading (Newland et al, 1994; Hermanek et al, 1995), das über den Differenzierungsgrad des Tumors Auskunft gibt, wurde von der UICC als Prognoseparameter etabliert. Allerdings konnte man sich immer noch nicht auf eine weltweit einheitliche Klassifikation einigen.

Ebenso stellt die Tumorinvasion in Blut- oder Lymphgefäße einen in zahlreichen Studien etablierten Prognosefaktor dar (Chapuis et al, 1985; Michelassi et al, 1991).

Von chirurgisch therapeutischer Seite spielt vor allem der Residualtumorstatus eine wichtige Rolle für die Prognose (Hermanek et al, 1994). In diesem Zusammenhang kommt auch der Erfahrung des Zentrums und des behandelnden Chirurgen eine wichtige unabhängige Bedeutung zu (McArdle et al, 1991; Hermanek et al, 1995).

Der einzige etablierte tumorbiologische Faktor mit einer unabhängigen prognostischen Bedeutung ist der Tumormarker CEA. Dieser Marker hat bei präoperativ erhöhten Serumwerten (cutoff-Wert: 5 ng/ml) eine signifikant schlechtere Prognose und sollte in das TNM Staging System Eingang finden (Wanebo et al, 1978; Lindmark et al, 1995).

Es gibt eine Fülle von Prognoseparametern, die in einer Vielzahl von Studien ihre Unabhängigkeit gezeigt haben und bereits teilweise in den Pathologiebericht integriert werden. Für ihre endgültigen Etablierung mangelt es nur an einer Bestätigung in einer statistisch unanfechtbaren Studie.

So ist die Mikrosatteliteninstabilität charakterisiert durch die Längenunterschiede von einfachen, repetitiven Mikrosattelitensequenzen, die im gesamten Genom vorkommen. Nachgewiesene Veränderungen in diesen DNA-Sequenzen, meist durch Mutationen von Mismatch Repair Genen verursacht, sind mit einer verbesserten Prognose korreliert (Sankila et al, 1996).

Weitere molekulare Marker des Tumorgewebes in Hinsicht auf das Überleben sind der Verlust des „Deleted In Colon Cancer“ (DCC) Gens (Shibata et al, 1996), die Mutation des k-ras Gens (Cerottini et al, 1998), erniedrigte p27 Protein Werte (Loda et al, 1997), Nachweis des Bcl-2 Gen Produktes (Ofner et al, 1995) und die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (Hamelin et al, 1994).

Dann gibt es noch Faktoren, die in ersten Studien bereits eine prognostische Tendenz zeigen konnten, aber noch in weiteren Studien untersucht werden müssen. In diese Kategorie gehören zum Beispiel CA 19 –9, CA 72 – 4, Sialosyl-Tn, Glycoprotein 72,

MUC-1 Muzin, Laminin, EGF-R, aber auch die Proteasen uPA, der Rezeptor uPA-R und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2, sowie Kathepsin D (Übersicht bei Compton et al, 2000).

1.4. Tumorinvasionsassoziierte Proteasen und deren Inhibitoren

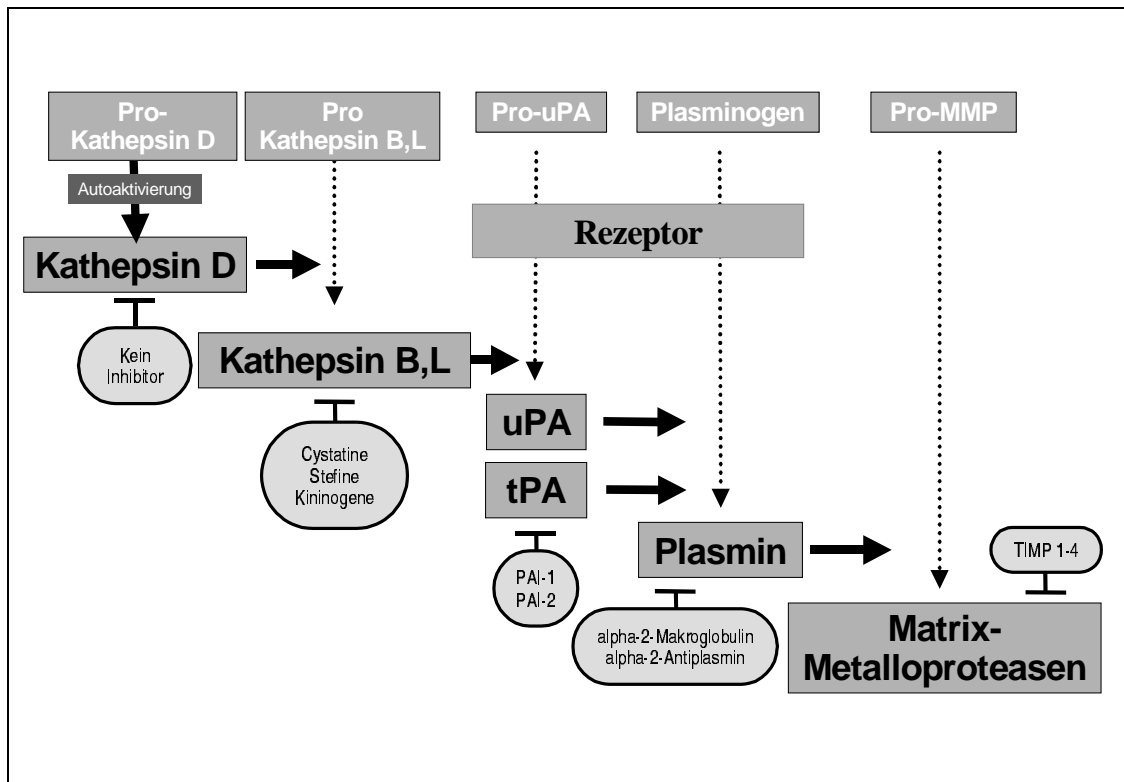


Abbildung 1: Aktivierungssequenz der tumorinvasionsassoziierten Proteasen und die physiologisch vorkommenden Inhibitoren (Nekarda, 2001).

Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA)

Die Serinprotease uPA ist das zentrale Molekül der perizellulären Proteolyse. Während viele normale Zellen uPA in physiologischer Höhe sezernieren, konnte die erhöhte Sekretion zuerst beim Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Astedt et al, 1976). Inzwischen wurden erhöhte Werte für eine Vielzahl von malignen Tumorzellen dargestellt (Übersicht bei Schmitt et al, 1997). Seine Funktion ist die Umwandlung von inaktiven Plasminogen in aktives Plasmin. Die Sekretionsform von uPA ist ein Proenzym (pro-uPA; 52 kDa), das nahezu keine eigene enzymatische Aktivität besitzt. Pro-uPA besteht aus den drei folgenden funktionell unabhängigen Einheiten:

- Die „growth-factor-like“-Domäne (GFD), ähnlich dem epidermalen growth-factor (EGF) (Appella et al, 1987).
- Die „Kringel“-Domäne, die eine Bindungsstelle enthält.
- Die Serinproteasen-Domäne, mit einer katalytischen Triade.

Dieses pro-uPA wird durch mehrere Faktoren in die aktive Form überführt. Dabei entsteht durch die Einwirkung von Kathepsin B und L, hochmolekularem Kallikrein, dem Nervenwachstumsfaktor-gamma und durch Plasmin das sogenannte hochmolekulare uPA (HMW-uPA). Eine weitere aktive Form (niedermolekulares = LMW-uPA) entsteht durch die Abspaltung des amino-terminalen Fragments (ATF) mit 36 kDa. Beide aktiven Formen von uPA können sowohl durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), als auch durch Typ 2 (PAI-2) in vivo inhibiert werden. Dabei entstehen stabile 1:1 stöchiometrische Komplexe zwischen den Inhibitoren und uPA (Andreasen et al, 1986). Diese Komplexe können internalisiert und durch Endozytose abgebaut werden (Nykjaer et al, 1992 und 1997). Da die Inhibitoren meist im Überschuss vorhanden sind, liegt uPA im physiologischen Zustand meist in der inaktiven Form vor.

Urokinase Plasminogen Aktivator-Rezeptor (uPA-R; CD 87)

UPA-R ist ein zystinreiches hochglykosyliertes Rezeptorproteinmolekül, das zuerst 1985 entdeckt wurde (Vassalli et al, 1985). Das Molekül hat ein Gewicht von 55 kDa, besteht aus zwei homologen Domänen und ist in der Zellmembran mit einem Glykosylphosphatidyl-inositol (GPI)-Anker verankert (Dano et al, 1994). Beide oben beschriebenen aktiven Formen von uPA können an diesem Rezeptor binden. Durch eine zusätzliche Anlagerung von PAI-1 entstehen sogenannte dreifach Komplexe (uPA/uPA-R/PAI-1-Komplex), die durch Endozytose aufgenommen und abgebaut werden. Der dadurch freiwerdende uPA-R wird dann erneut in die Zellmembran eingebaut. Auch gelöstes uPA-R, durch das Enzym Phospholipase C von der Zellverankerung abgetrennt, kann in vivo nachgewiesen werden (Stephens et al, 1997).

Kathepsin D

Kathepsin D ist eine Aspartat-Endopeptidase mit katalytischer Aktivität bei einem pH-Wert 2,8 – 5,0. Es kommt physiologisch in Lysosomen und Phagosomen vor. Kathepsin D kann sowohl als Proenzym (52 kDa), als auch in Form eines aktiven Enzyms (48 kDa), das in zwei weitere Untereinheiten unterteilt werden kann (34 kDa und 14 kDa), in vivo nachgewiesen werden (Schwartz, 1995; Rochefort et al, 1999). Die proteolytische Kaskade nimmt mit Kathepsin ihren Ausgang (siehe Abbildung 1).

Plasminogen Aktivator Inhibitoren Typ 1 (PAI-1) und Typ 2 (PAI-2)

PAI-1 und PAI-2 gehören zur Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) (Übersicht bei van Meijer et al, 1995).

PAI-1

PAI-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Seine Funktion ist die physiologische Inhibition von dem Plasminogen-Aktivator vom Gewebetyp (tPA). Das von einer Vielzahl von normalen Zellen sezerniertes Molekül hat aber auch eine gering inhibitorische Wirkung auf LMW- bzw. HMW-uPA und Plasmin. Sowohl im Blut als auch im perizellulären Raum bindet PAI-1 sofort an Vitronectin (Deng et al, 1995). Nur gebundenes PAI-1 ist aktiv, während freies PAI-1 sofort in die inaktive Form konvertiert (Stefansson et al, 1996).

PAI-2

PAI-2 kommt physiologisch sowohl in glykolysierter (70 kDa), als auch in nicht glykolysierter Form (48 kDa) vor. Seine Funktion ist die physiologische Inhibition von uPA. Die von Tumorzellen, aktivierten Monozyten und Trophoblastenepithel sezernierte Form ist stabil und bereits biologisch aktiv. Bindungsproteine konnten bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.

1.5. Bedeutung der Proteasen und deren Inhibitoren bei der Tumormetastasierung

Die aus mehreren Schritten bestehende metastatische Kaskade beginnt mit der Loslösung von Karzinomzellen aus dem Zellverband durch einen Verlust der Zell-Zell-Adhäsionen (Ghadimi et al, 1998; Liotta et al, 1991). Um dann in das Blut- bzw. Lymphsystem zu gelangen bedarf es einer Proteolyse und Invasion der extrazellulären Matrix. Proteolytische und adhäsive Prozesse werden erneut zur Festsetzung der Tumorzellen im Zielorgan benötigt. Für die Etablierung der Metastase spielt die Neoangiogenese eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 2).

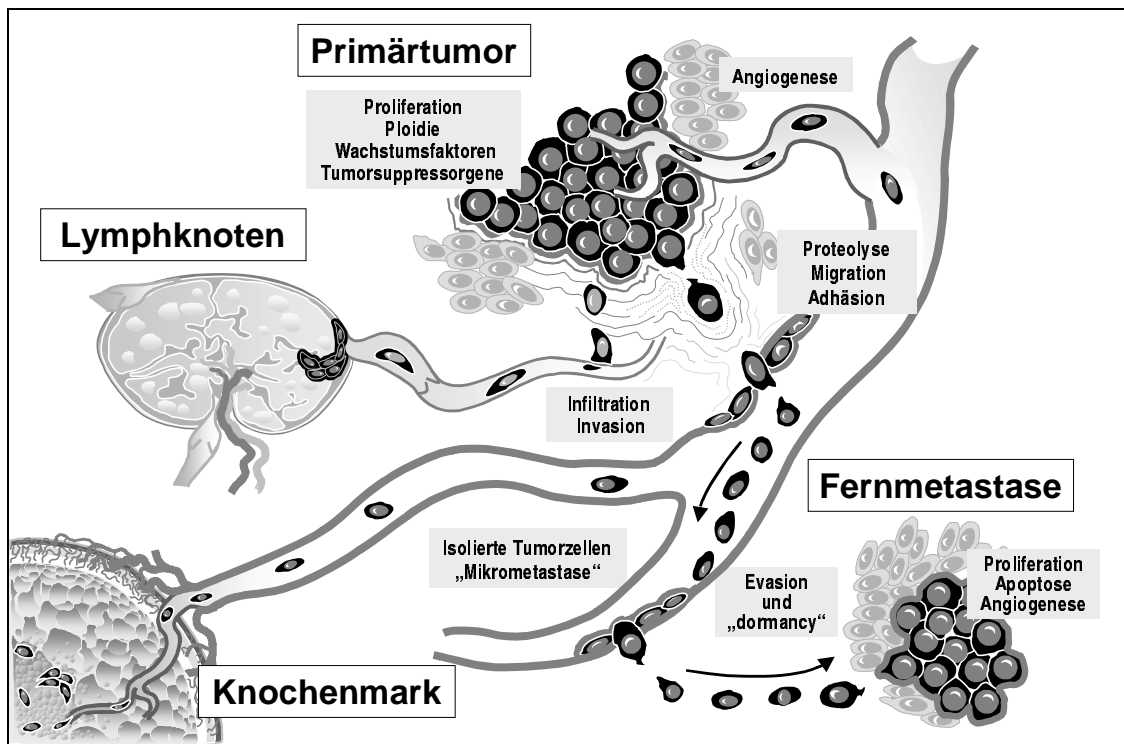


Abbildung 2: Grundprinzipien der lokalen Tumorprogression und Metastasierung im Sinne einer „minimal residualen Tumorkrankheit“ (Nekarda, 2001).

Für die Zell-Zell-Adhäsion spielt primär die Cadherin/Catenin-Komplexinteraktion neben anderen Adhäsionsmolekülen eine wichtige Rolle.

Die perizelluläre Proteolyse läuft über einen Kaskadenprozess ab (siehe Abbildung 1), in deren Zentrum die Umwandlung von rezeptorgebundenem Plasminogen in aktiviertes Plasmin steht (Schmitt et al, 1997; Reuning et al, 1998). Aber auch uPA hat eine eigene proteolytische Aktivität, die extrazelluläre Matrix abbauen kann und aktiviert eigenständig die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9. Der Grund,

dass die Proteolyse in gerichteter Weise abläuft, liegt an der an Zellen rezeptorgebundenen proteolytischen Kaskade.

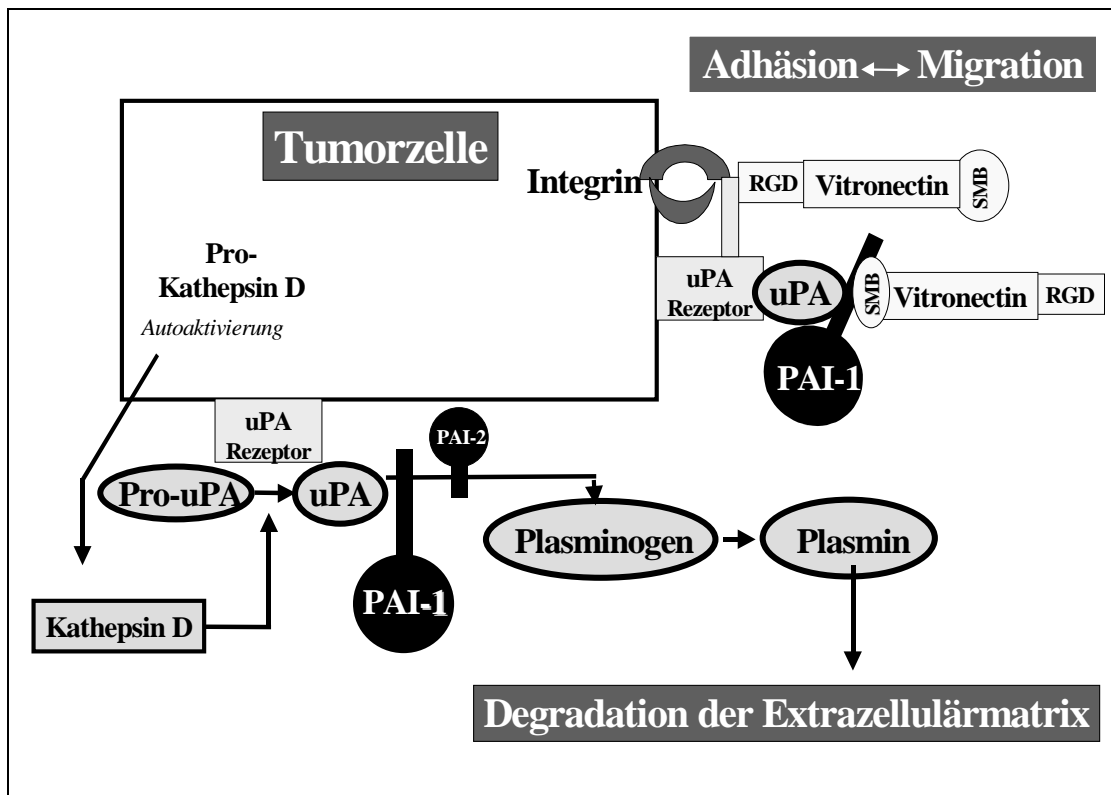


Abbildung 3: Die zwei Funktionen des Plasminogenaktivator-Komplexes:

1. Perizelluläre Degradation der Matrixstrukturen durch Proteolyse
2. Steuerung der gerichteten Migration und Adhäsion der Zelle (Nekarda, 2001)

Die Aktivierung von Plasminogen geschieht durch rezeptorgebundenes uPA und kann sowohl durch eine Bindung von PAI-1, als auch von PAI-2 verhindert werden (Ellis et al, 1990). Dabei verbleibt PAI-2 als physiologischer Inhibitor am Rezeptor bis zu seinem Abbau, während PAI-1 zusammen mit uPA und dem Rezeptor sofort endozytiert und abgebaut wird (Cubellis et al, 1990). Der Rezeptor bleibt in seiner funktionellen Form erhalten und zirkuliert zurück an die Oberfläche. Bei migrierenden Zellen kann dadurch natürlich der uPA-Rezeptor an der Oberfläche verschoben werden (Estreicher et al, 1990).

Bei der Verankerung von Tumorzellen an Matrixproteinen spielt Vitronectin eine wichtige Rolle. Dieses bindet über sogenannte Integrine an die Zelle, die Bindungsstelle ist das Tripeptid RGD. Auch befindet sich eine Somatomedin-B-Domäne (SMB) an einer anderen Stelle des Vitronectinmoleküls (Seiffert et al, 1991), die die Bindungsstelle für aktives PAI-1 darstellt. Durch eine Bindung des uPA-

Rezeptors an die Integrine kann mit dem Vitronectin ein stabiler Komplex entstehen, der wiederum eine uPA vermittelte Bindung mit dem an Vitronectin gebundenen PAI-1 eingehen kann (Wei et al, 1996). Die Loslösung der Tumorzelle vom Vitronectin und somit vom Tumorzellverband ist deshalb allein abhängig von der PAI-1-Konzentration. Eine Erhöhung führt folglich zu einer vermehrten rezeptorvermittelten Tumorzellmobilität (siehe Abbildung 3).

1.6. Fragestellung

Ziel der Arbeit ist es an einem definierten Patientengut mit einem residuumtumorfrei resezierten Kolon- oder Rektumkarzinom folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. ob die zu untersuchenden Faktoren uPA, uPA-Rezeptor, Kathepsin D und die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 im Tumorgewebe erhöht sind,
2. ob eine prognostische Korrelation zum Überleben gefunden werden kann,
3. ob im Vergleich zu anderen bereits etablierten Faktoren eine eigenständige unabhängige prognostische Bedeutung besteht,
4. ob eine Risikostratifizierung (Prognosemodell) mit Hilfe der CART-Analyse definiert werden kann,
5. ob sich signifikante Unterschiede in der Höhe der Werte von uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 im Vergleich von Kolon- und Rektumkarzinom ergeben.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Von den am Klinikum Rechts der Isar operierten Patienten mit einem Kolon- oder Rektumkarzinom wurde im Zeitraum von 3/1988 – 11/1996 von insgesamt 530 Patienten Gewebe entnommen und unserer Tumordatenbank zugeführt.

Um in das Studienkollektiv aufgenommen zu werden, mussten sie den folgenden Einschlusskriterien genügen:

1. R0 – Resektion
2. Zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen
3. Ausreichend asserviertes Tumormaterial für eine valide Bearbeitung
4. Keine neoadjuvante Therapie

Insgesamt erfüllten 305 Patienten mit Kolon- oder Rektumkarzinom (bis 15 cm ab Linea anocutanea) die oben genannten Einschlusskriterien (= Studienkollektiv).

Die Lokalisation der Karzinome verteilte sich wie in Tabelle 1 angegeben:

Lokalisation	Anzahl
Kolon- und Rektumkarzinom	n = 305 (100%)
Appendix	n = 1 (0,3%)
Coecum	n = 27 (8,9%)
Kolon ascendens	n = 29 (9,5%)
Rechte Flexur	n = 8 (2,6%)
Kolon transversum	n = 13 (4,3%)
Linke Flexur	n = 10 (3,3%)
Kolon descendens	n = 12 (3,9%)
Sigma	n = 48 (15,7%)
Rektosigmoid	n = 5 (1,6%)
Proximales Rektum	n = 38 (12,5%)
Mittleres Rektum	n = 69 (22,6%)

Distales Rektum	n = 45 (14,8%)
-----------------	----------------

Tabelle 1: Lokalisationsverteilung der Kolon- und Rektumkarzinome

Dabei handelte es sich in 280 (91,8%) Fällen um einen Primärtumor, in 5 (1,6%) Fällen um ein kolorektales Zweitkarzinom und in 20 (6,6%) Fällen weder um ein kolorektales Zweit- noch Drittkarzinom.

2.1.1. Kolon

Wie aus der oberen Tabelle zu erkennen ist, ergaben sich für das gesamte Kolon eine Kollektivzahl von 153 Patienten (50,2%).

Dabei handelte es sich um 88 (57,5% der Patienten mit Kolonkarzinom) männliche und 65 (42,5%) weibliche Patienten.

Das mediane Alter betrug 66 Jahre (35 – 90 Jahre) zum Zeitpunkt der Operation. Der Median der Nachbeobachtungszeit war 47 Monate (16 – 121 Monate). In diesem Zeitraum traten 25 Todesfälle (16,3%) innerhalb des Kolonkarzinomkollektivs auf.

Die Verteilung der Patienten nach dem Stadium und der TNM Klassifikation (UICC 1997) zeigt Tabelle 2.

Stadium (UICC 1997)	Kategorie	Studienkollektiv n = 153
Stadium I n = 27 (17,6%)	T1, N0, M0	6
	T2, N0, M0	21
Stadium II n = 72 (47,1%)	T3, N0, M0	62
	T4, N0, M0	10
Stadium III n = 54 (35,3%)	T1, N1, M0	1
	T2, N1, M0	1
	T3, N1, M0	29
	T4, N1, M0	7
	T1, N2, M0	0
	T2, N2, M0	1
	T3, N2, M0	8
	T4, N2, M0	7

Tabelle 2: Stadienverteilung der Kolonkarzinome

Analog zu den Richtlinien des Tumorzentrums München wurden Patienten mit einem Kolonkarzinom Stadium III einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt (Tumorzentrum München, 2001).

2.1.2. Rektum

Beim Rektum untersuchten wir mit 152 Patienten (49,8%) eine ähnlich hohe Fallzahl wie beim Kolon.

Die Geschlechtsverteilung teilte sich in 94 (61,8% der Patienten mit Rektumkarzinom) männliche und 58 (38,2%) weibliche Patienten auf.

Hier betrug der Altersmedian 63 Jahre (26 – 93 Jahre) und die mediane Nachbeobachtungszeit 46 Monate (6 – 109 Monate). Während dieser Zeit traten 29 Todesfälle (19,1%) ein.

Die folgende Tabelle gib auch hier Aufschluss über die Aufteilung nach Stadium und TNM Kategorie (UICC 1997) des Rektumkarzinomkollektivs:

Stadium (UICC 1997)	Kategorie	Studienkollektiv n = 152
Stadium I n = 49 (32,2%)	T1, N0, M0	12
	T2, N0, M0	37
Stadium II n = 48 (31,6%)	T3, N0, M0	43
	T4, N0, M0	5
Stadium III n = 55 (36,2%)	T1, N1, M0	1
	T2, N1, M0	11
	T3, N1, M0	23
	T4, N1, M0	6
	T1, N2, M0	1
	T2, N2, M0	6
	T3, N2, M0	6
	T4, N2, M0	1

Tabelle 3: Stadienverteilung der Rektumkarzinome

Neoadjuvant vorbehandelte Patienten wurden von dem Studienkollektiv ausgeschlossen. Adjuvant behandelte Patienten wurden aber eingeschlossen. So erfolgte bei einer histologisch gesicherten Lymphknotenbeteiligung eine adjuvante

Chemotherapie. Nicht vorbehandelte Karzinome, die in der postoperativen Histologie lokal fortgeschritten waren, erhielten eine adjuvante Radio-, Chemotherapie. Bei uT4 Karzinomen wurde außerdem eine intraoperative Bestrahlung in Betracht gezogen (Tumorzentrum München, 2001).

2.1.3. Normale Schleimhaut

Insgesamt wurde von 91 Patienten normale Schleimhaut gewonnen, um die Medianwerte der Proteasen und Inhibitoren mit dem malignen Gewebe zu vergleichen. Dazu wurde 66 mal Schleimhaut aus normalem Kolon und 25 mal aus normalem Rektum entnommen und der ELISA-Messung zugeführt.

2.1.4. Datendokumentation und Nachsorge

Die Nachsorgedaten der Patienten in dieser Studie erhielten wir durch telefonische Gespräche mit den Patienten und deren Hausärzten. Im Falle eines Rezidivs oder Todesfalles wurde der letzten Arztbrief zur Datenverifizierung herangezogen.

Alle klinischen und histopathologischen Daten wurden dann in einen strukturierten Erfassungsbogen im chirurgisch-onkologischen Labor dokumentiert und auf ihre Vollständigkeit geprüft.

Aus diesem Bogen flossen folgende Parameter in die Statistik mit ein:

Alter	Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Operation
Geschlecht	Geschlecht des Patienten: männlich-weiblich
pT – Kategorie	Nach der UICC, 1997: pT1-pT4
pN – Kategorie	Nach der UICC, 1997: pN0-pN2
Stadium	Nach der UICC, 1997: Stadium I – III
Grading	Nach der UICC, 1997: G1 – 4
Tumorlokalisation	Lokalisation im Kolon oder Rektum nach der UICC,1997
A_Censor	An Karzinomfolgen verstorben

Überlebenszeit	Anzahl der Monate bis zum Tod oder letzter Nachsorge
uPA	ELISA-Wert des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (= Urokinase)
uPA-R	ELISA-Wert des Urokinase-Rezeptors
Kathepsin D	ELISA-Wert von Kathepsin D
PAI-1	ELISA-Wert des Plasminogenaktivator Inhibitors Typ 1
PAI-2	ELISA-Wert des Plasminogenaktivator Inhibitors Typ 2

Tabelle 4: Aufstellung der verwendeten Parameter

2.2. Material

Gleich an die Resektion anschließend wurde sowohl aus dem Tumor als auch aus der normalen Schleimhaut ein mindestens 1 cm³ großes Gewebestück entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung dort gelagert.

Für die ELISA-Messung in dieser Studie benötigten wir von dem Tumorgewebe 20 – 30 Schnitte von 60 µm Dicke, die in einem gekühltem Kryo-Röhrchen asserviert wurden. Zur Beurteilung des Tumoranteils wurde zu Beginn und am Schluss der jeweiligen Serie ein 7µm dicker Schnitt hergestellt. Nach einer konventionellen Färbung mit Hämatoxylin / Eosin wurden diese Schnitte mikroskopisch kontrolliert.

Zur Weiterverarbeitung wurden die tiefgekühlten Kryostatschnitte mit dem Mikrodismembrator der Firma Braun-Melsungen (Melsungen, Deutschland) pulverisiert und in 400 µl TBS (0,02 M Tris-HCl – 0,125 M NaCl, pH 8,5) aufgenommen. Um die Extraktionsmenge zu steigern wurde dem Puffer 1% nichtionisches Detergenz Triton X-100 (SIGMA, München, Deutschland) zugesetzt. Bei 4°C wurde die Suspension zuerst über Nacht kontinuierlich gemischt und dann durch Ultrazentrifugation die Zytosol- von der Kern- bzw. Zellfragmentfraktion getrennt. Bis zur definitiven Verarbeitung wurde der Überstand in 50 µl-Aliquots aufgeteilt und erneut in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.3. Methode der ELISA-Messung

Die Extraktionswerte des Tumorgewebes und der normalen Schleimhaut wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits gemessen. Zwei Kontrollen zur Plausibilität wurden immer mitgeführt.

1. Zellkulturüberstand einer Mammakarzinomzelllinie mit hohen Proteasenwerten (Prof. Schmitt, Frauenklinik der TU München).
2. Gepoolter Laborstandard aus 6 gastrointestinalen Karzinomen.

Zur Standardisierung wurden die Extraktionswerte der biochemischen Parameter dem Gesamtprotein des Gewebes in Korrelation gesetzt.

Nachweis von uPA

uPA wurde mit dem IMUBIND uPA-ELISA-Kit der Firma *american diagnostica* (#894) gemessen. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 10 pg uPA/ml Probe. Der ELISA-Kit erkannte uPA in Form von Einzelketten, die sekretorische Vorstufe pro-uPA und Hochmolekulargewichtsformen von uPA.

Die Intraassayvarianz lag zwischen 0,5% und 12,4%, die Interassayvarianz lag bei 7,9%.

Nachweis des uPA-Rezeptors

Der uPA-Rezeptor wurde mit dem IMUBIND Total uPA-R-ELISA-Kit der Firma *american diagnostica* (#893) gemessen. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng uPA-R/ml Probe. Es wurde von dem Assay sowohl lösliches wie natives uPA-Rezeptor-Protein, als auch uPA-Rezeptor-Komplexe erkannt.

Die Intraassayvarianz lag zwischen 4,6% und 9,6%, die Interassayvarianz lag bei 7,6%.

Nachweis von Kathepsin D

Kathepsin D wurde mit dem Rapid Format Cathepsin D-ELISA-Kit der Firma *oncogene science* (# QIA 29) gemessen. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 6,25 ng Kathepsin D/ml Probe. Sowohl die inaktive Vorläuferform, als auch die aktive Form von Kathepsin D wurden durch den Test erkannt.

Die Intraassayvarianz lag zwischen 2,7% und 12,4%, die Interassayvarianz bei 4,6%.

Nachweis von PAI-1

PAI-1 wurde mit dem IMUBIND PAI-1-ELISA-Kit der Firma *american diagnostica* (#821) gemessen. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 50 µg PAI-1/ml Probe. Der Kit erkannte sowohl inaktives (latentes), als auch aktives und in Komplexen gebundenes PAI-1.

Die Intraassayvarianz lag zwischen 0,7% und 10,7%, Interassayvarianz lag bei 6,2%.

Nachweis von PAI-2

PAI-2 wurde mit dem IMUBIND PAI-2-ELISA-Kit der Firma *american diagnostica* (#823) gemessen. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 50 pg PAI-2/ml Probe. Mit dem Assay konnte sowohl niedermolekulares und hochmolekulares, als auch die frei und gebundene Form von PAI-2 erkannt werden.

Die Intraassayvarianz lag zwischen 0,2% und 10,8%, die Interassayvarianz bei 2,6%.

Bestimmung von Protein

Die Extraktionswerte der einzelnen Proteasen und Inhibitoren wurden dem Gesamtprotein des Gewebes in Korrelation gesetzt. Die Bestimmung des Proteins wurde mit dem Pierce-BCA-Proteinassay (PIERCE, Rockford, IL) durchgeführt.

Die Intraassayvarianz lag bei 4,82%.

2.4. Methoden der Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem SPSS-Software Paket (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) im Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (IMSE) der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. A. Neiß) durchgeführt.

Die durch die maximal selektionierende log-rank Statistik ermittelten cutoff-Werte wurden optimiert, um Gruppen mit hohem bzw. niedrigem Risiko in Hinsicht auf die Prognose zu differenzieren.

Gruppenbezogene Kurven für das Gesamtüberleben wurden nach Kaplan-Meier berechnet und dargestellt (Kaplan u. Meier, 1958). Mit dem log-rank Test wurden die signifikanten Unterschiede hinsichtlich der einzelnen Gruppen berechnet (Peto u. Peto, 1972).

Der Einfluss der einzelnen Variablen in Bezug auf das Gesamtüberleben wurden mit dem proportional-hazards-model von Cox sowohl uni- als auch multivariat untersucht (Cox, 1972). Mit diesem Modell wurden auch die relativen Risiken für die verschiedenen prognostischen Variablen nach der Unterscheidung in hoch und niedrig und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle bestimmt.

Unterschiede in den Medianwerten von uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 zwischen Kolonkarzinom und Rektumkarzinom in den einzelnen Stadien wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt, da keine Normalverteilung angenommen werden konnte. Mit dem gleichen Testverfahren wurde die Verteilung der einzelnen Proteasen zwischen dem normalen und malignen Gewebe verglichen.

Eine weitere Methode zur Entwicklung eines Prognosemodells stellt die CART-Analyse (Classification and Regression Tree-Analysis) dar (Breimann et al, 1984; Segal, 1988). Dabei wird das Kollektiv in jedem Analyseschritt in zwei Pfade mit maximaler Differenz hinsichtlich des Risikos unterteilt. Bei der CART-Analyse können die Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren untereinander sehr gut beurteilt werden. Das Ergebnis besteht in mehreren Subgruppen mit ungleichem Risiko.

Generell wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Kolon

3.1.1. uPA

Normalwerte und Tumorwerte

Normale Kolonschleimhaut (n = 66) hatte einen medianen uPA Gehalt von 0,40 ng/mg Protein. Die Spannweite der Werte reichte von 0,12 ng/mg bis 2,87 ng/mg Protein. Dagegen war der Median im Kolonkarzinomgewebe (n = 153) 3,46 ng/mg Protein und damit um den Faktor 8,65 erhöht. Die Werte reichten von 0,20 ng/mg bis 15,03 ng/mg Protein. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein hochsignifikantes $p < 0,001$ für den erhöhten medianen Wert im Tumorgewebe.

Prognostische Wertigkeit

Für uPA fand sich in der maximal selektierenden log-rank Statistik ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,01$) von 4,06 ng/mg Protein. Dabei konnten 93 Patienten (60,8%) mit einem niedrigeren Risiko von 60 Patienten (39,2%) mit einem erhöhten Risiko unterteilt werden. In der Gruppe mit dem Niedrigrisiko traten 10 Todesfälle (10,8%) auf, während in der anderen Gruppe 15 Patienten (25%) verstarben. In der Kaplan-Meier-Kurve zeigten sich 5-JÜLR von 72,5% und 90,4%.

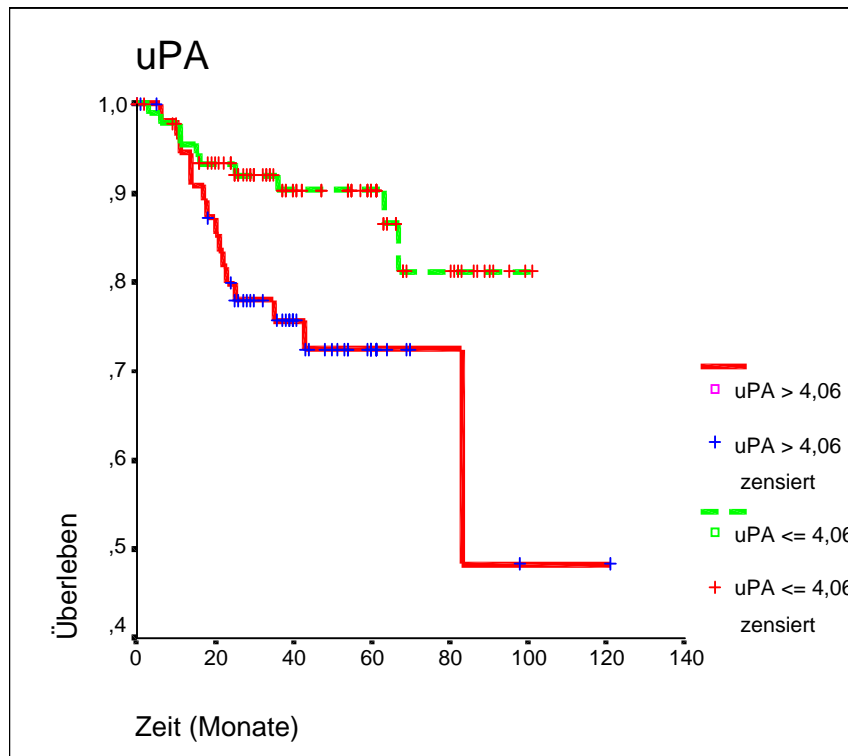


Abbildung 4: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA (p = 0,01)

3.1.2. uPA-R

Normalwerte und Tumorwerte

Die normale Kolonschleimhaut (n = 66) ergab einen medianen uPA-R Gehalt von 1,66 ng/mg Protein. Die Werte reichten von 0,26 ng/mg bis 9,33 ng/mg Protein. Die Werte in den Tumorextrakten (n = 153) reichten von 1,01 ng/mg bis 24,40 ng/mg Protein und hatten einen Median von 6,55 ng/mg Protein. Diese waren somit um den Faktor 3,95 erhöht. Auch hier ergab der Mann-Whitney-Test ein $p < 0,001$ für den erhöhten medianen Tumorwert.

Prognostische Wertigkeit

Die maximal selektierende log-rank Statistik ergab für uPA-R einen signifikanten cutoff-Wert ($p = 0,02$) von 6,57 ng/mg Protein. Es ergaben sich zwei Gruppen mit unterschiedlichem Risiko. Das Hochrisikokollektiv mit 75 Patienten (49,0%) hatte 17 Todesfälle (22,7%) zu verzeichnen, während in dem Niedrigrisikokollektiv mit 78 Patienten (51,0%) 8 Todesfälle (10,3%) auftraten. Es ergaben sich 5-JÜLR von 75,2% und 91,0%.

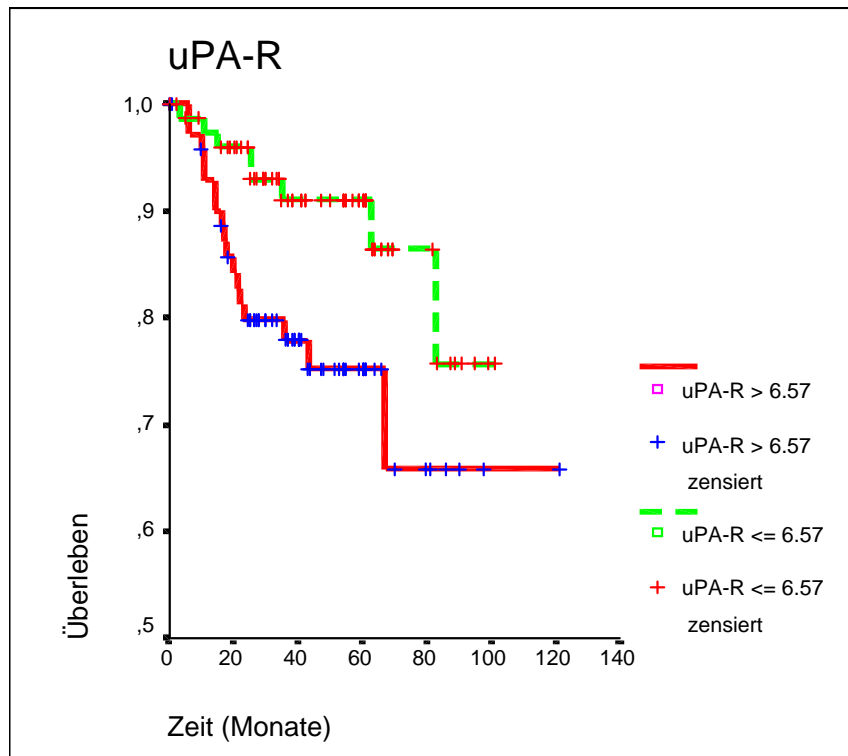


Abbildung 5: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA-R (p = 0,02)

3.1.3. Kathepsin D

Normalwerte und Tumorwerte

Bei Kathepsin D lag der Median im normalen Kolongewebe (n = 66) bei 13108,14 ng/mg Protein. Dabei reichten die Werte von 740 ng/mg bis 23712 ng/mg Protein. Bei einem minimalen Kathepsin D Wert von 1986 ng/mg Protein und maximalen von 45966 ng/mg Protein ergab sich ein Median für das maligne Gewebe (n = 153) von 11510 ng/mg Protein. Dieser war nicht signifikant um den Faktor 1,14 erniedrigt. Das Signifikanzniveau im Mann-Whitney-Test war nicht signifikant.

Prognostische Wertigkeit

Mit 7853 ng/mg Protein wurde für Kathepsin D ein signifikanter cutoff-Wert (p = 0,02) in dem maximal selektierenden log-rank Test gefunden. Die Patientengruppe (n = 31; 20,3%) mit dem erhöhten Risiko hatte 8 Todesfälle (25,8%) zu verzeichnen, während auf die andere Gruppe mit 122 Patienten (79,7%) 25 Ereignisse (20,5%) fielen. Die entsprechenden 5-JÜLR betragen 70,8% und 86,5%.

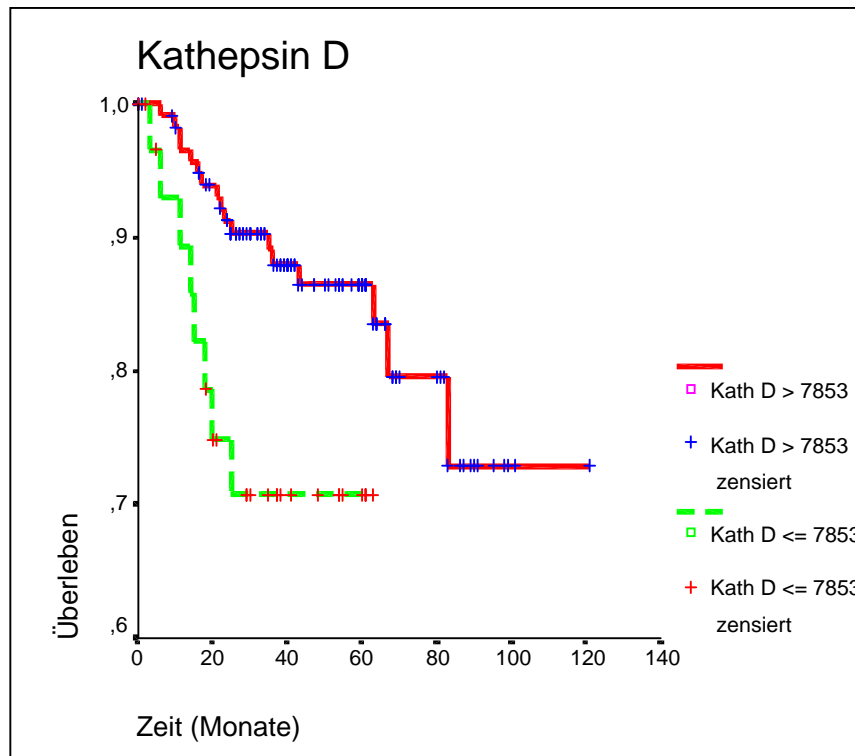


Abbildung 6: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Kathepsin D ($p = 0,02$)

3.1.4. PAI 1

Normalwerte und Tumorwerte

Der Gehalt von PAI-1 in normaler Schleimhaut ($n = 66$) lag im Median bei 1,68 ng/mg Protein. Die Werte reichten von 0,53 – 42,78 ng/mg Protein. Der mediane Tumorwert ($n = 153$) war mit 14,26 ng/mg Protein um den Faktor 8,5 höher als in normaler Schleimhaut. Die Signifikanzberechnung im Mann-Whitney-Test ergab ein $p < 0,001$ für die erhöhten Proteasen im Tumorgewebe.

Prognostische Wertigkeit

Ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,02$) für PAI-1 fand sich bei 26,57 ng/mg Protein unter der Anwendung der maximal selektierenden log-rank Statistik. Mit diesem cutoff-Wert konnten 109 Patienten (71,2%) mit einem signifikant niedrigeren Überlebensrisiko von 44 Patienten (28,8%) unterschieden werden. Die beobachtete Sterberate in der Niedrigrisikogruppe war 11,9% ($n = 12$) gegenüber 27,3% ($n = 13$) in der Hochrisikogruppe. Die 5-JÜLR lag bei 88,8% und 71,0%.

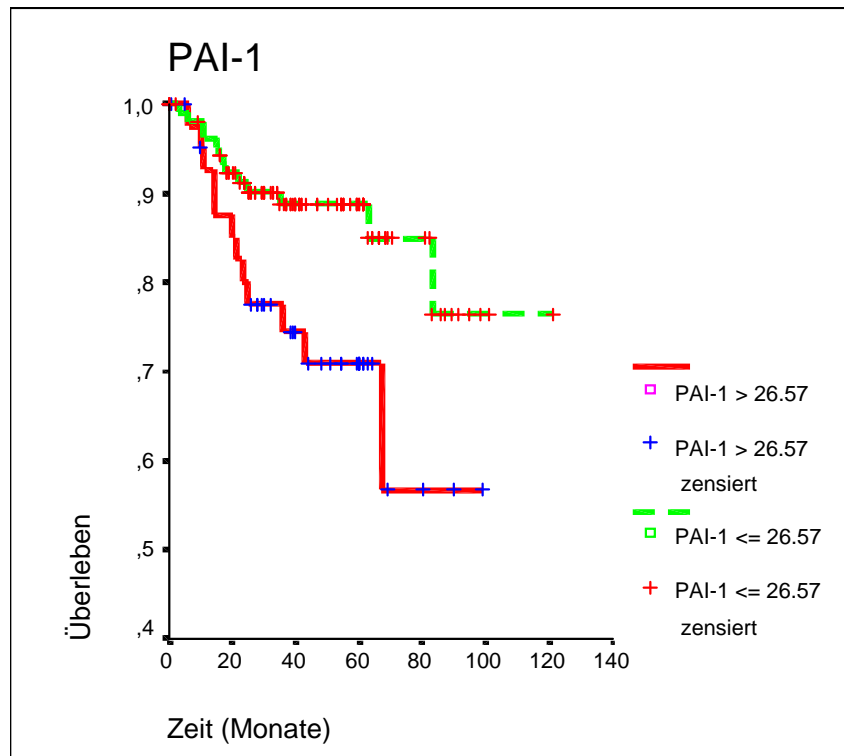


Abbildung 7: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-1 ($p = 0,02$)

3.1.5. PAI-2

Normalwerte und Tumorwerte

Für PAI-2 lag der Median in der normalen Schleimhaut ($n = 66$) bei 0,65 ng/mg Protein und hatte dabei eine Spannweite von 0,01 ng/mg bis 15,57 ng/mg Protein. Der mediane PAI-2 Wert im Tumorgewebe ($n = 153$) war um den Faktor 4,62 signifikant mit 3,0 ng/mg Protein erhöht. Die Extraktionswerte des Karzinomgewebes reichten von 0,02 – 88,76 ng/mg Protein. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,001$.

Prognostische Wertigkeit

Bei PAI-2 konnte keine prognostische Unterscheidung im maximal selektierenden log-rank Test hinsichtlich des Überlebens gefunden werden ($p = 0,08$). Es wurde der formal höchste Peak bei 1,74 ng/mg Protein zur Testung genommen, da kein optimierter Wert ermittelt werden konnte. Die entsprechende Kaplan-Meier Kurve zeigte keinen signifikanten Unterschied bei diesem cutoff-Wert.

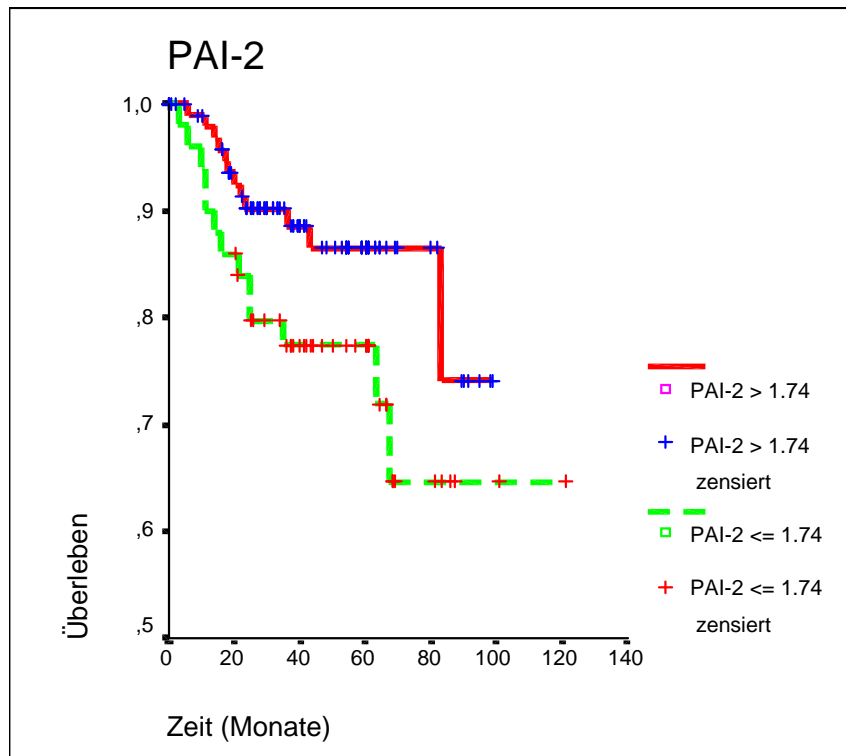


Abbildung 8: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-2 (p = n.s.)

3.1.6. Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Die Variablen Alter, pT, pN, Grading, uPA, uPA-R, PAI-1, PAI-2 und Kathepsin D wurden in gezeigter dichotomer Verteilung der uni- und multivariaten Analyse zugeführt. Dabei waren pN, das Grading, uPA, uPA-R, PAI-1 und Kathepsin D im univariaten Cox-Modell signifikant. In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass nur pN, Grading und PAI-1 das Signifikanzniveau für eine unabhängige Variable erreichen konnten. Die zuerst gewählte Variable und somit von größter prognostischer Relevanz war das Grading mit einem relativen Risiko von 3,6 (Konfidenzintervall: 1,5 – 8,5). Darauf folgte pN mit einem relativen Risiko von 4,3 und einem Konfidenzintervall von 1,9 bis 10,2. Zuletzt wurde PAI-1 mit einem relativen Risiko von 2,4 (Konfidenzintervall: 1,1 – 5,4) ausgewählt.

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
	cutoff-Wert	p-Wert	p-Wert	Relatives Risiko	Konfidenzintervall
Alter	68	-	-	-	-
pT	1+2↔3+4	-	-	-	-
pN	0↔1,2	<0,001	<0,001	4,3	1,9 – 10,2
Grading	1+2↔3+4	<0,001		0,004	3,6
uPA	8,5				1,5 –
uPA-R	4,06	0,019	-	-	-
Kat D	6,57	0,028	-	-	-
PAI-1	7853	0,022	-	-	-
PAI-2	26,57	0,02	0,031	2,4	1,1 – 5,4
	1,74	-	-	-	-

Tabelle 5: Uni- und multivariate Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse beim Kolonkarzinom

3.1.7. CART-Analyse

Die CART-Analyse wurde mit den selben Variablen wie die Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Auch die Dichotomisierung sämtlicher Variablen wurde exakt übernommen.

Es konnte nur eine Unterteilung für das Grading mit $p < 0,001$ gefunden werden. Die Untergruppe mit dem niedrigen Risiko bestand aus 95 Patienten (62,1%), von denen 8 (8,4%) während des Nachbeobachtungszeitraumes verstarben. In der Gruppe mit dem hohen Risiko waren 58 Patienten (37,9%). Davon verstarben in der Nachbeobachtungszeit 17 (29,3%). Eine weitere Unterteilung wurde nicht gefunden.

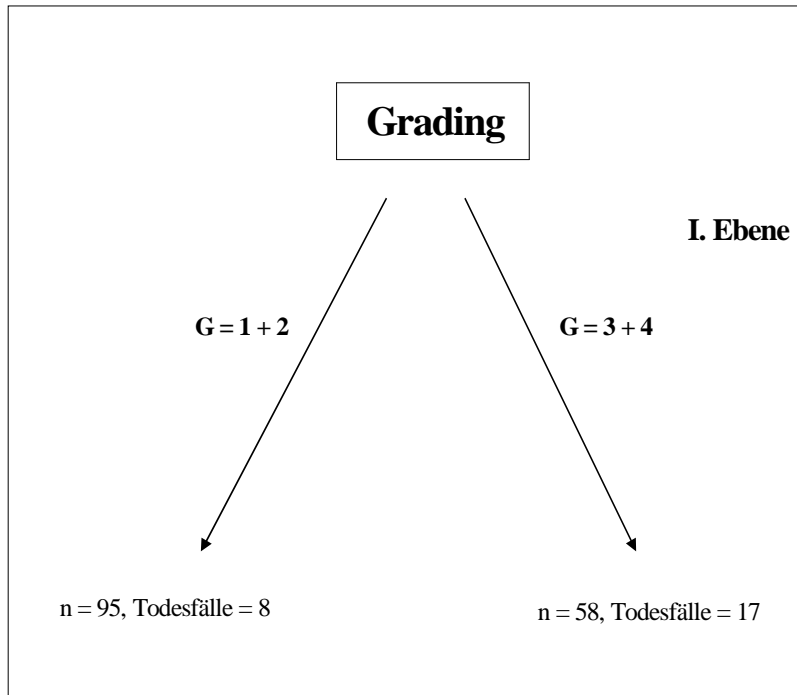


Abbildung 9: CART-Überlebensanalyse zur Risikostratifizierung beim Kolonkarzinom

3.2. Rektum

3.2.1. uPA

Normalwerte und Tumorwerte

In der normalen Rektumschleimhaut ($n = 25$) betrug der Median des uPA Wertes 0,38 ng/mg Protein und reichte von 0,10 ng/mg bis 1,36 ng/mg Protein. Die Tumorextrakte ($n = 152$) befanden sich in einem Bereich zwischen 0,07 ng/mg und 21,17 ng/mg Protein. Der Median war mit 3,15 ng/mg Protein um den Faktor 8,29 erhöht. Diese Erhöhung war im Mann-Whitney-Test mit einem $p < 0,001$ hochsignifikant.

Prognostische Wertigkeit

Für uPA konnte kein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,15$) hinsichtlich des Überlebens im maximal selektierenden log-rank Test gefunden werden, so dass der formal höchste Peak von 3,78 ng/mg Protein zur Testung benutzt wurde. Die zugehörige Kaplan-Meier Kurve konnte keinen signifikanten Unterschied bei diesem cutoff-Wert zwischen den beiden Gruppen zeigen.

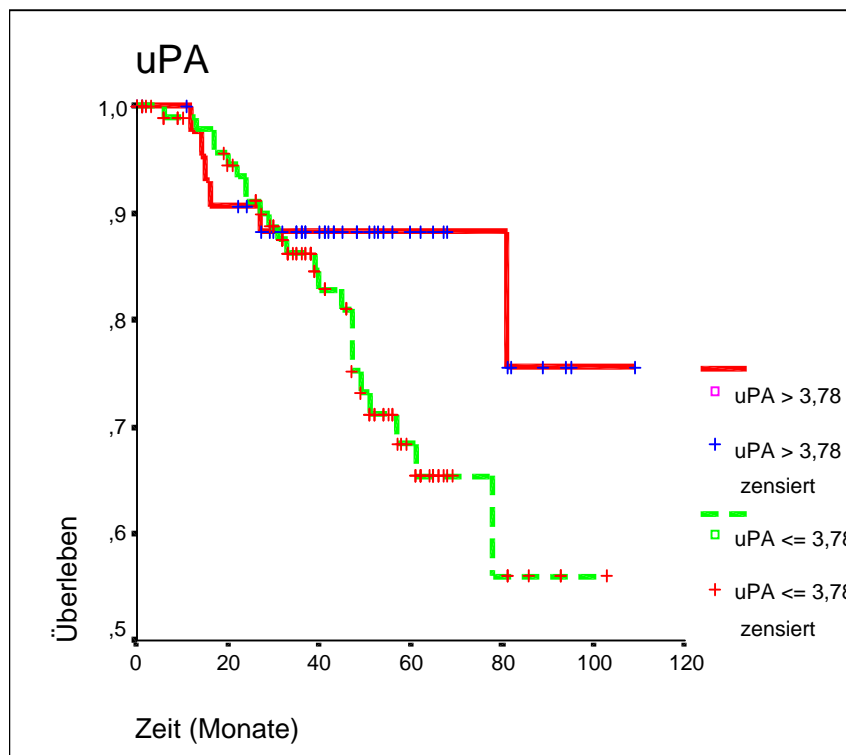


Abbildung 10: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA ($p = n.s.$)

3.2.2. uPA-R

Normalwerte und Tumorwerte

Normale Rektumschleimhaut (n = 25) hatte einen medianen uPA-R Gehalt von 1,64 ng/mg Protein. Die Werte reichten von 0,42 – 9,53 ng/mg Protein. Der mediane Tumorwert (n = 152) war signifikant um den Faktor 3,64 erhöht und lag bei 5,97 ng/mg Protein. Er reichte von 0,46 – 31,17 ng/mg Protein. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,001$.

Prognostische Wertigkeit

Die maximal selektierende log-rank Statistik ergab für uPA-R einen signifikanten cutoff-Wert ($p = 0,003$) von 4,12 ng/mg Protein. Im Hochrisikokollektiv mit 113 Patienten (74,3%) verstarben 28 (24,8%). In der Gruppe mit dem erniedrigten Risiko (n = 39; 25,7%) lag die Sterberate bei 2,6% (n = 1). Entsprechend ergaben sich 5-JÜLR von 95,0% und 67,3%.

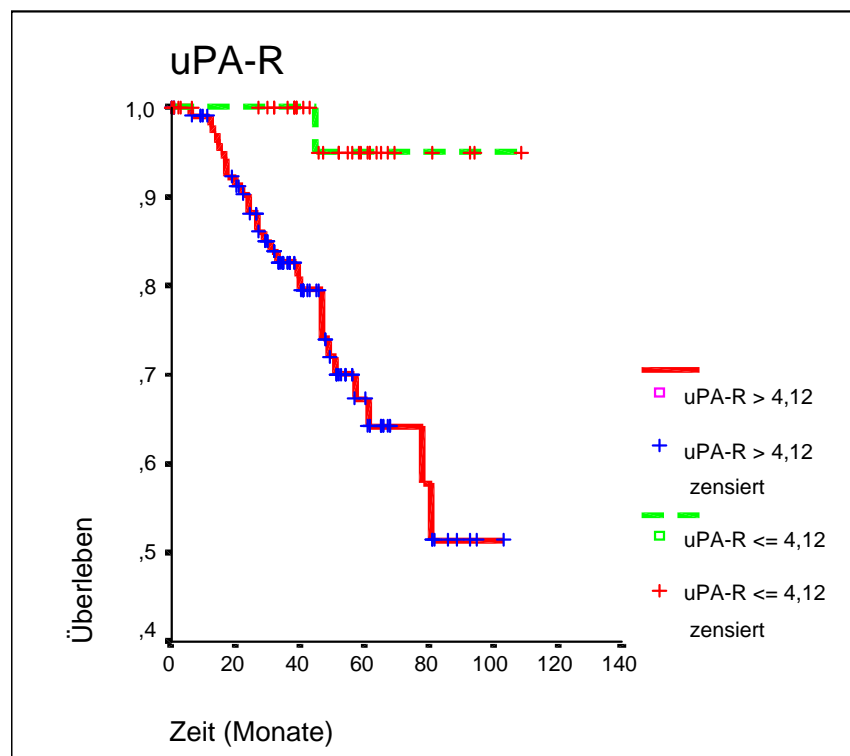


Abbildung 11: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA-R ($p = 0,003$)

3.2.3. Kathepsin D

Normalwerte und Tumorwerte

Für Kathepsin D fand sich in normaler Rektumschleimhaut ($n = 25$) ein medianer Gehalt von 10189,94 ng/mg Protein. Dabei reichten die Werte von 1004 ng/mg bis 23871 ng/mg Protein. Der Median im Tumorgewebe ($n = 152$) betrug 10474,50 ng/mg Protein und war somit um den Faktor 1,13 nicht signifikant erhöht ($p = 0,19$). Dabei gingen die Werte von 3317 ng/mg bis 29018 ng/mg Protein.

Prognostische Wertigkeit

Mit der maximal selektierenden log-rank Statistik wurde ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,03$) bei 11378 ng/mg Protein für Kathepsin D identifiziert. Die korrespondierenden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier zeigten das unterschiedliche Risiko der beiden Gruppen. Die Gruppe mit dem niedrigen Risiko umfasste 73 Patienten (48,0%), die Gruppe mit dem erhöhten Risiko umfasste 79 Patienten (52,0%). Die beobachteten Sterberaten ($n = 9$; 12,3% und $n = 20$; 25,3%) und die berechneten 5-JÜLR (82,8% und 66,0%) unterschieden sich signifikant.

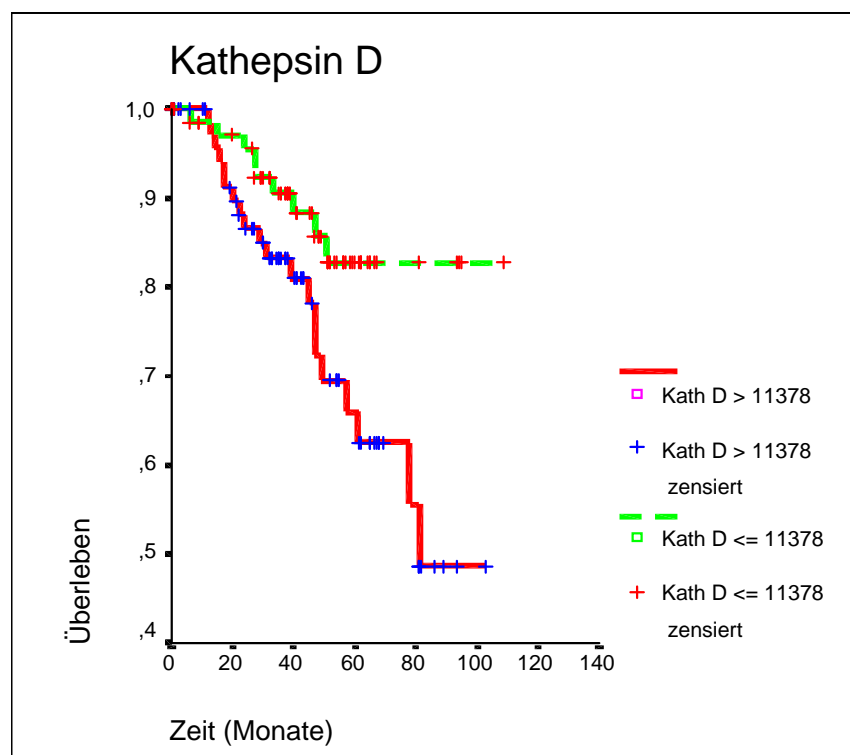


Abbildung 12: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Kathepsin D ($p = 0,03$)

3.2.4. PAI-1

Normalwerte und Tumorwerte

Der Gehalt von PAI-1 im normalen Rektumgewebe ($n = 25$) lag im Median bei 1,53 ng/mg Protein. Die Spannweite reichte von 0,11 ng/mg bis 17,05 ng/mg Protein. Der mediane PAI-1 Wert des malignen Gewebes ($n = 152$) betrug 10,0 ng/mg Protein und war um den Faktor 6,54 im Vergleich zur normalen Schleimhaut erhöht. Die Erhöhung war mit $p < 0,001$ hoch signifikant.

Prognostische Wertigkeit

Der signifikante cutoff-Wert ($p = 0,048$) von 6,33 ng/mg Protein wurde mit dem maximal selektierenden log-rank Test berechnet. Dabei ergab sich eine Sterberate von 23,5% ($n = 24$) für die 102 Patienten (67,1%) mit dem erhöhten Risiko und eine Rate von 10% ($n = 5$) für die 50 Patienten (32,9%) mit dem niedrigen Risiko. In der Kaplan-Meier Kurve zeigten sich 5-JÜLR von 68,8% und 85,5%.

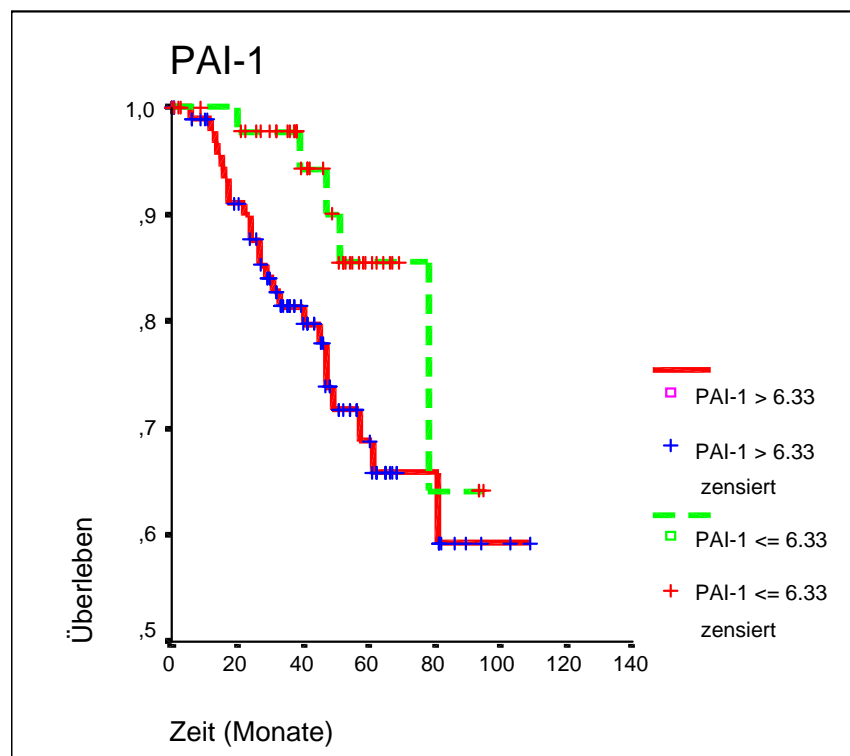


Abbildung 13: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-1 ($p = 0,048$)

3.2.5. PAI-2

Normalwerte und Tumorwerte

Normale Rektumschleimhaut (n = 25) hatte einen medianen PAI-2 Gehalt von 0,11 ng/mg Protein. Die Werte lagen dabei in einem Bereich von 0,00 ng/mg bis 3,23 ng/mg Protein. Der mediane Wert des Karzinomgewebes (n = 152) war um den Faktor 19,82 signifikant ($p < 0,001$) erhöht und lag bei 2,18 ng/mg Protein. Dabei deckten die Werte einen Bereich von 0,01 ng/mg bis 31,17 ng/mg Protein ab.

Prognostische Wertigkeit

Für das Überleben konnte bei PAI-2 keine prognostische Unterscheidung im maximal selektierenden log-rank Test gefunden werden. Die zum formal höchsten Peak bei 1,84 ng/mg Protein gehörende Kaplan-Meier Kurve zeigte keinen Unterschied bei diesem cutoff-Wert ($p = 0,07$).

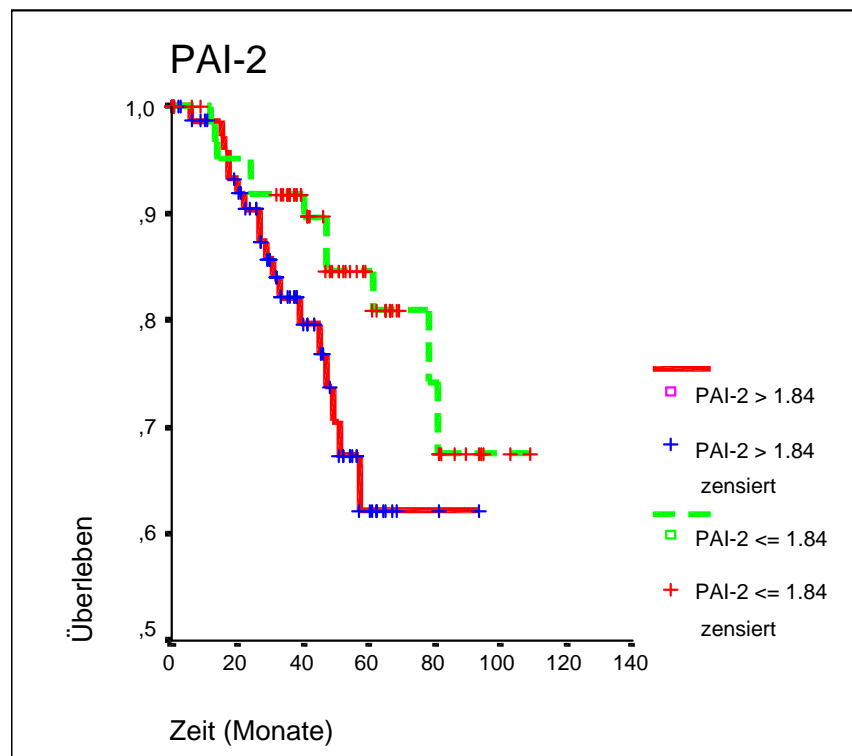


Abbildung 14: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-2 ($p = n.s.$)

3.2.6. Multivariate Cox-Regressionsanalyse Rektum

Auch beim Rektum fanden Alter , pN, Grading, uPA, PAI-1, PAI-2 und Kathepsin D in entsprechender dichotomer Verteilung in die uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse Eingang. Univariat signifikant fanden sich das Alter, pT, pN, uPA-R und Kathepsin D mit dem Überleben korreliert. Als unabhängige Variablen in der multivariaten Cox-Analyse zeigten sich Alter, pN und uPA-R. Dabei wurde der Nodalstatus pN mit einem relativen Risiko von 2,4 (Konfidenzintervall: 1,1 – 5,2) zuerst ausgewählt und war somit von größter prognostischer Bedeutung. Es folgten der uPA-Rezeptor mit einem relativen Risiko von 9,4 (Konfidenzintervall:1,3 – 70,7) und das Alter mit einem relativen Risiko von 2,6 und einem Konfidenzintervall von 1,3 bis 5,5.

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
	cutoff-Wert	p-Wert	p-Wert	Relatives Risiko	Konfidenz Intervall
Alter	68	0,014	0,010	2,6	1,3 – 5,5
pT	1+2↔3+4	0,006	-	-	-
pN	0↔1,2	0,002	0,030	2,4	1,1 – 5,2
Grading	1+2↔3+4	-	-	-	-
uPA	3,78	-	-	-	-
uPA-R	4,12	0,019	0,029	9,4	1,3 – 70,7
Kat D	11378	0,039	-	-	-
PAI-1	6,33	-	-	-	-
PAI-2	1,84	-	-	-	-

Tabelle 6: Uni- und multivariate Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse beim Rektumkarzinom

3.2.7. CART-Analyse

Rektum

Beim Rektum wurden die selben Variablen in bereits erwähnter dichotomer Ausprägung in die CART-Regressionsanalyse eingebracht.

Durch die Variable pN ergab sich die erste Unterteilung ($p = 0,001$). Dabei konnte eine Gruppe mit hohem Risiko von einer mit niedrigem Risiko unterschieden werden. In der 89 Patienten (63,6%) umfassenden Gruppe mit besserer Prognose gab es in der Nachbeobachtungszeit 10 Todesfälle (11,2%). In der zweiten Entscheidungsebene konnte diese Gruppe weiter durch die Höhe des Kathepsin D Wertes unterteilt werden ($p = 0,002$). In der prognostisch besseren Gruppe ($n = 49$; 55,1%) verstarb 1 Patient (2,0%), während bei den 40 Patienten (44,9%) mit schlechterer Prognose 9 Patienten (22,5%) verstarben. In der Gruppe mit hohem Risiko ($n = 51$; 36,4%) in der ersten Entscheidungsebene (pN) verstarben insgesamt 19 Patienten (37,3%). Hier wurde keine weitere Unterteilung mehr gefunden.

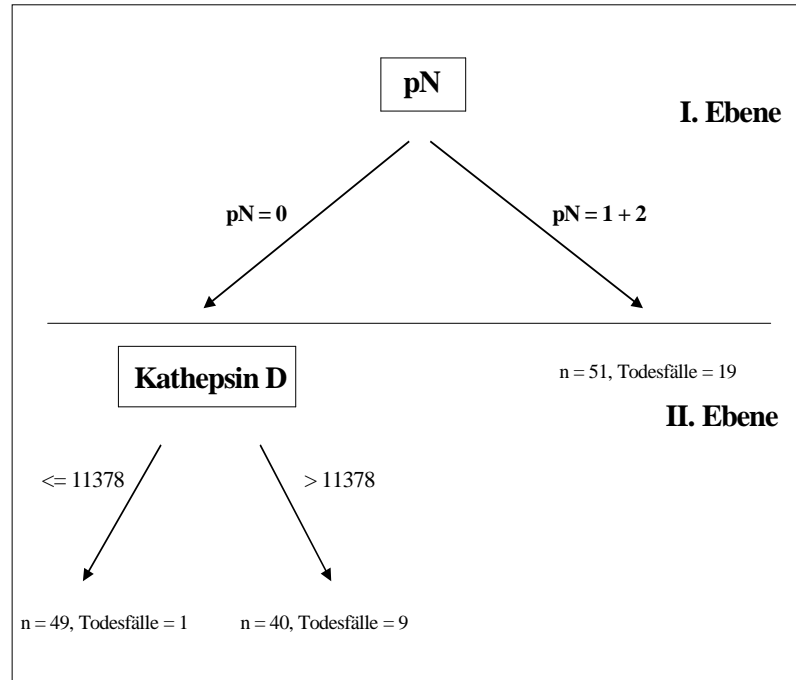


Abbildung 15: CART-Überlebensanalyse zur Risikostratifizierung beim Rektumkarzinom

3.3. Kolorektales Gesamtkollektiv und Überleben

3.3.1. uPA

Prognostische Wertigkeit

Für uPA konnte im maximal selektierenden log-rank Test kein signifikanter cutoff-Wert in Hinblick auf das Überleben gefunden werden. Das geforderte Signifikanzniveau von 0,05 konnte mit einem $p = 0,06$ nicht erreicht werden. Der formal höchste Peak von 2,636 ng/mg Protein wurde zur Berechnung der log-rank Statistik herangezogen. In der dazu passenden Kaplan-Meier Kurve ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Die 5-JÜLR betragen 85,0% und 76,2%.

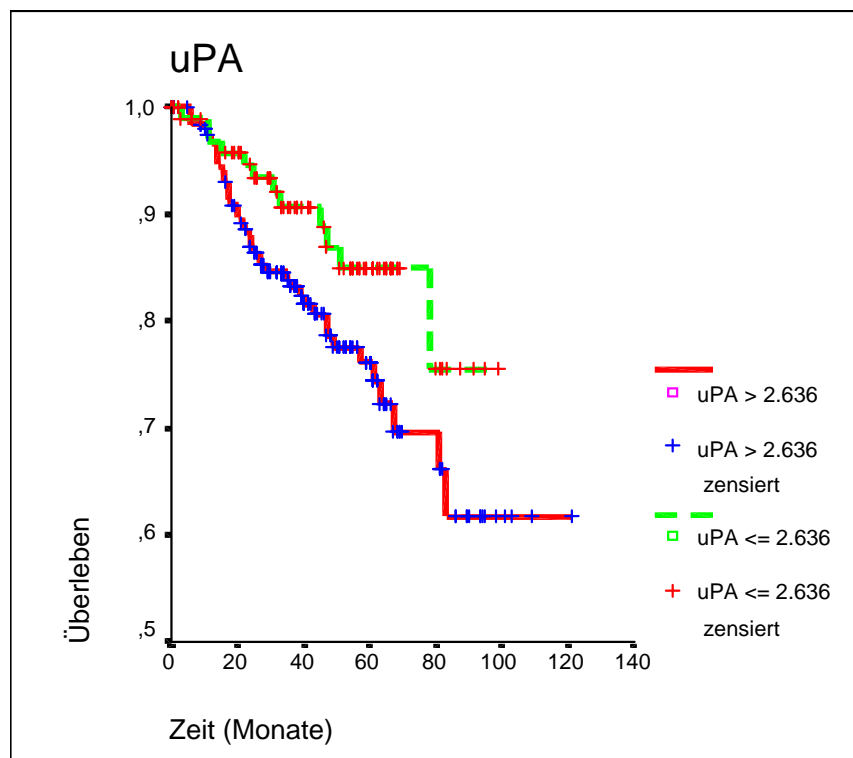


Abbildung 16: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA ($p = 0,06$)

3.3.2. uPA-R

Prognostische Wertigkeit

Im kolorektalen Gesamtkollektiv ergab sich für uPA-R mit 3,24 ng/mg Protein ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,003$) im maximal selektierenden log-rank Test. Dabei umfasste die Gruppe mit dem niedrigen Risiko 45 Patienten (14,8%) mit 1 Todesfall (2,2%). In der anderen Gruppe waren insgesamt 260 Patienten (85,2%) mit einer beobachteten Sterberate von 20,4% ($n = 53$). In der Kaplan-Meier Kurve konnten 5-JÜLR von 96,0% und 76,1% gefunden werden.

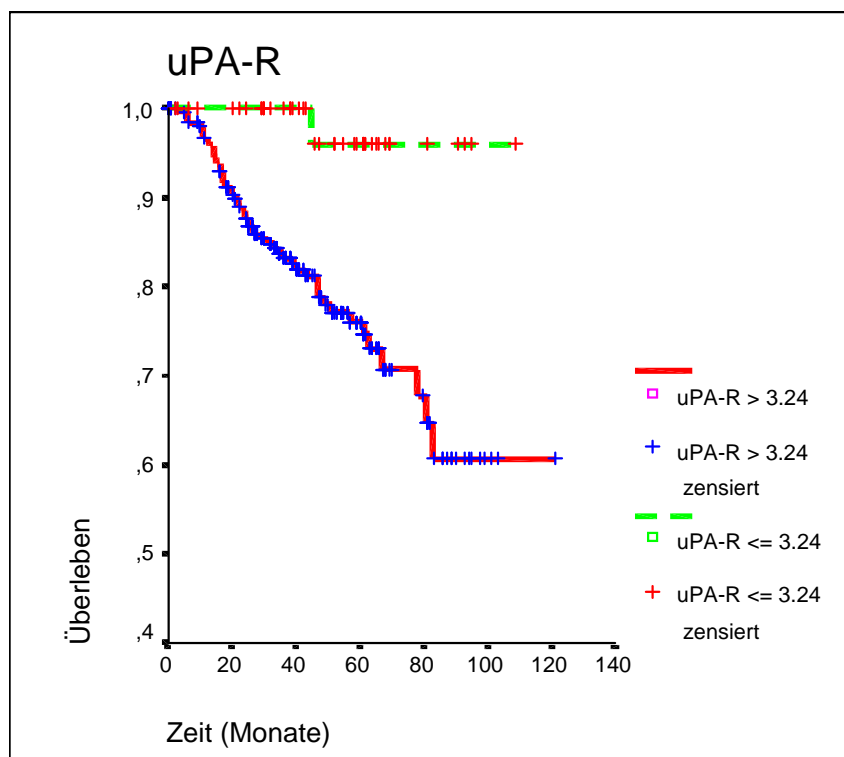


Abbildung 17: Kaplan-Meier Überlebenskurve für uPA-R ($p = 0,003$)

3.3.3. Kathepsin D

Prognostische Wertigkeit

Für Kathepsin D fand sich ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,03$) bei 16849 ng/mg Protein im maximal selektierenden log-rank Test. Für Kathepsin D > 16849 ng/mg ergab sich eine Gruppe mit erhöhtem Risiko, in der 45 Patienten (14,8%) waren, von denen 12 (26,7%) verstarben. Die Niedrigrisikogruppe umfasste 260 Patienten

(85,2%) mit einer Sterberate von 16,2% (n = 42). Es ergaben sich 5-JÜLR von 80,8% und 66,6%.

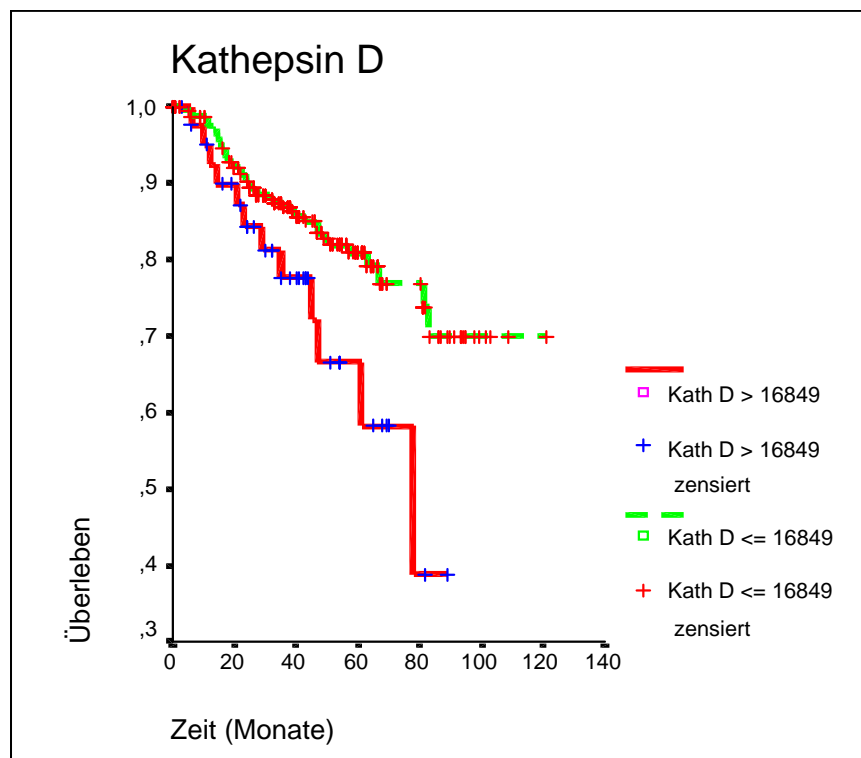


Abbildung 18: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Kathepsin D (p = 0,03)

3.3.4. PAI-1

Prognostische Wertigkeit

Ein signifikanter cutoff-Wert ($p = 0,006$) für PAI-1 fand sich bei 3,75 ng/mg Protein durch Berechnung mit dem maximal selektierenden log-rank Test. Mit diesem cutoff-Wert konnten 37 Patienten (12,1%) mit einem signifikant besseren Überlebensrisiko von den restlichen 268 Patienten (87,9%) unterschieden werden. Mit einer Sterberate von 0% verstarb in der Niedrigrisikogruppe niemand. Für die andere Gruppe betrug die Rate 20,2% (n = 54). In der Kaplan-Meier Überlebenskurve ergaben sich 5-JÜLR von 100% und 76,3%.

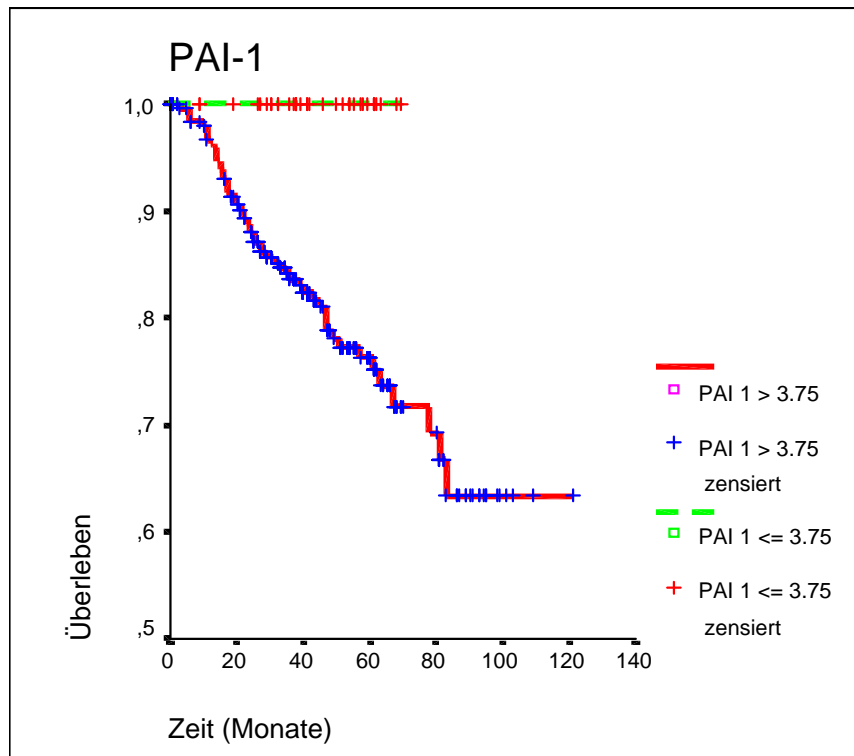


Abbildung 19: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-1 ($p = 0,006$)

3.3.5 PAI-2

Prognostische Wertigkeit

Für PAI-2 konnte im maximal selektierenden log-rank Test kein signifikantes Ergebnis erreicht werden. Zur Berechnung der Kaplan-Meier Kurve wurde der formal höchste Peak bei 0,41 ng/mg Protein mit einem $p = 0,24$ herangezogen. Zwischen der ersten Gruppe ($n = 34$; Sterberate: 14,7% bei 5 Todesfällen) und der zweiten Gruppe ($n = 271$; Sterberate: 18,1% bei 49 Todesfällen) ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,29$). Die 5-JÜLR betragen entsprechend 90,5% und 77,3%.

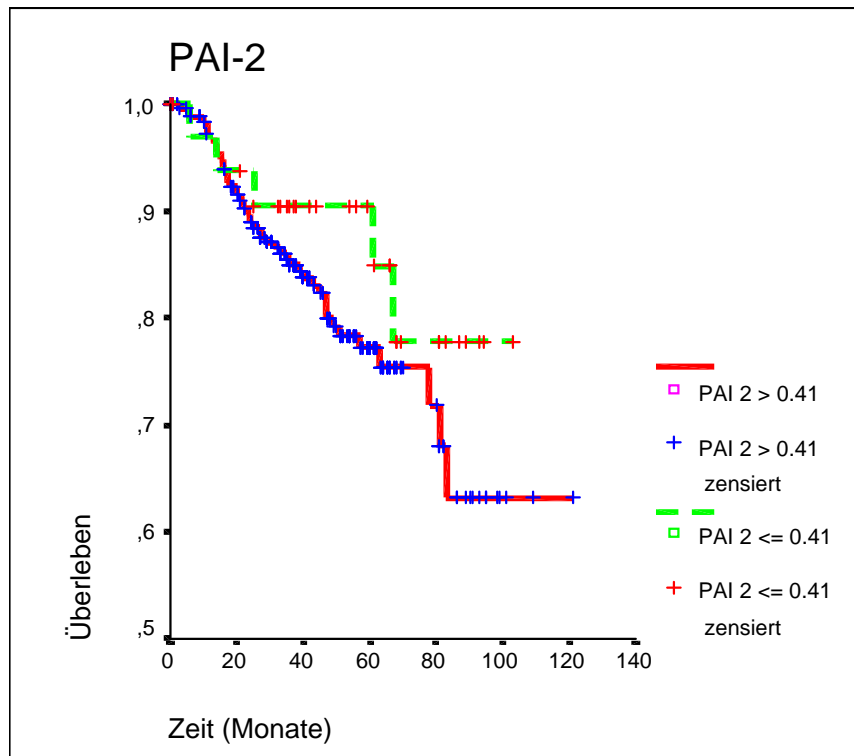


Abbildung 20: Kaplan-Meier Überlebenskurve für PAI-2 (p = n.s.)

3.3.6 Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Beim kolorektalen Gesamtkollektiv wurden uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1, PAI-2, Grading, pT und pN in entsprechender dichotomer Verteilung in die multivariate Cox-Regressionsanalyse eingeschlossen. Während uPA-R, Kathepsin D und PAI-1 in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung besaßen, konnten sie in der multivariaten Analyse das geforderte Signifikanzniveau nicht erreichen. Als unabhängige Variablen wurden nur das Grading und der Nodalstatus pN bestimmt. Es wurde pN ($p < 0,001$) mit einem relativen Risiko von 3,3 (Konfidenzintervall: 1,9 – 5,9) zuerst ausgewählt. Darauf folgte das Grading mit einem relativen Risiko von 2,2 (Konfidenzintervall: 1,3 – 3,7).

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse		
	cutoff-Wert	p-Wert	p-Wert	Relatives Risiko	Konfidenzintervall
pT	1+2↔3+4	-	-	-	-
pN	0↔1,2	<0,001	<0,001	3,3	1,9 – 5,9
Grading	1+2↔3+4	<0,001		0,006	2,2
uPA	3,7				
uPA-R	2,636	-	-	-	-
Kat D	3,24	0,003	-	-	-
PAI-1	16849	0,03	-	-	-
PAI-2	3,75	0,006	-	-	-
	0,41	-	-	-	-

Tabelle 7: Ergebnisse der univariaten log-rank Statistik und multivariaten Cox-Regressionsanalyse beim kolorektalen Gesamtkollektiv

3.4. Vergleich der Verteilung der Proteasen und deren Inhibitoren

Um signifikante Unterschiede der Proteasenwerte in den drei Stadien zwischen Kolon und Rektum zu testen, wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt.

3.4.1. Stadium I

Im Stadium I ergaben sich zwischen den Kolonkarzinomen (n = 27) und den Rektumkarzinomen (n = 49) für die Proteasen uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 keine signifikanten Unterschiede. Eine Übersicht gibt Tabelle 7.

	uPA	uPA-R	Kathepsin D	PAI-1	PAI-2
Median Kolon	3,86	4,90	11151,00	7,12	2,82
Median Rektum	3,11	4,95	10687,00	6,19	2,99
p-Wert*	0,17	0,88	0,62	0,46	0,50

Tabelle 8: Mediane für Kolon- und Rektumkarzinom im Stadium I. P-Wert des Mann-Whitney 2-Proben-Tests.

* Exakte zweiseitige Signifikanz

3.4.2. Stadium II

Für PAI-1 konnte im Mann-Whitney-Test ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03$) der Werte der Kolonkarzinome (n = 72) und der Rektumkarzinome (n = 48) festgestellt werden. Für alle anderen Proteasen konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden (Tabelle 8).

	uPA	uPA-R	Kathepsin D	PAI-1	PAI-2
Median Kolon	3,47	6,89	11766,00	19,30	3,67
Median Rektum	3,14	7,30	11370,00	12,55	2,18
p-Wert*	0,29	0,63	0,98	0,03	0,25

Tabelle 9: Mediane für Kolon- und Rektumkarzinom im Stadium II. P-Wert des Mann-Whitney 2-Proben-Tests.

*Exakte zweiseitige Signifikanz

3.4.3. Stadium III

Für uPA, uPA-R, PAI-1, PAI-2 und Kathepsin D waren die Unterschiede zwischen Kolon (n = 54) und Rektum (n = 55) im Mann-Whitney-Test nicht signifikant (Tabelle 9).

	uPA	uPA-R	Kathepsin D	PAI-1	PAI-2
Median Kolon	3,37	7,48	11618,00	14,09	1,98
Median Rektum	3,20	6,08	12403,00	11,52	1,93
p-Wert*	0,57	0,68	0,36	0,19	0,88

Tabelle 10: Mediane für Kolon- und Rektumkarzinom im Stadium III. P-Wert des Mann-Whitney 2-Proben-Tests.

* Exakte zweiseitige Signifikanz

4. Diskussion

Prognosefaktoren spielen eine immer größere Rolle zur Planung und Durchführung einer individuellen Tumorthherapie. Sie teilen die Patienten in genau definierte Gruppen ein, für die unterschiedliche Therapiestrategien notwendig sind. In dieser Arbeit wurden die Faktoren der tumorassoziierten Proteolyse uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 untersucht. Diese spielt sich an der Grenze zwischen der Tumorzelle und der perizellulären Matrix ab, die aus Kollagengeflecht, Grundsubstanz, Entzündungszellen und Bindegewebszellen besteht. Nach der Publikation von Astedt und Holmberg (1976) wurden Testsysteme entwickelt, um die Enzymaktivität der Protease uPA im Tumorgewebe zu bestimmen. Dabei entdeckte man, dass uPA im Tumorzellkulturen erhöht ist und mit der Progression des Tumors korreliert. Auf Grund von nicht zu messenden Bindungskomplexen und Zellmembranverletzungen zeigte die Gewebe-Enzymographie oft widersprüchliche Ergebnisse. Erst die Entwicklung von spezifischen Antikörpern ermöglichte eine quantitative Bestimmung des Gesamtpools, inklusive der inaktiven Proenzyme (Übersicht bei Duffy, 1996).

Die in dieser Arbeit benutzte Methode der ELISA-Messung bietet die Vorteile der Wiederholbarkeit, der Objektivität der Ergebnisse und die über einen langen Zeitraum mögliche Lagerung und Neubestimmung der Werte. Dazu reichen bereits 100 bis 300 mg Feuchtgewicht Tumorgewebe für eine repräsentative Analyse aus (Ruiter et al, 1998). Es wurde dafür eine Gewebemenge von 15 x 60 µm dicken Gefrierschnitten mit einer histologisch kontrollierten Tumorgewebemenge von mehr als 40 % verwendet. Die dabei verwendeten ELISA-Kits wurden im BIOMED-1 Programm evaluiert (Sweep et al, 1998).

Eine andere häufig in der Literatur verwendete Methode ist die Immunhistologie, deren Vorteil in der gesonderten Beurteilung einzelner Zellgruppen liegt. Ihr Nachteil liegt in der Subjektivität der Evaluierung der Ergebnisse.

In dieser Arbeit wurden uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 beim Kolon- und Rektumkarzinom bestimmt. In fast allen publizierten Studien zu diesen Faktoren werden die Ergebnisse von Kolon und Rektum gemeinsam betrachtet. Auch in dieser Arbeit wurden die Ergebnisse für das Gesamtkollektiv ausgewertet, aber auf Grund der unterschiedlichen Klinik, Therapie, Lokalrezidivrate und Fernmetastasierungswege wurde das Kolon- und Rektumkarzinom zusätzlich getrennt

betrachtet und nach Hinweisen gesucht, ob eine unterschiedliche Betrachtung hinsichtlich der Prognose auf Grund biologischer Parameter gerechtfertigt ist.

Bei der Bestimmung der cutoff-Werte des kolorektalen Gesamtkollektivs mit dem maximal selektierenden log-rank Test konnte für uPA und PAI-2 ($p = 0,06$ und $p = 0,23$) kein Signifikanzniveau erreicht werden. Dementsprechend zeigten diese beiden Werte auch in der univariaten Analyse keine prognostische Bedeutung. Dies steht im Gegensatz zu einer Vielzahl von Publikationen, in denen sowohl uPA (Ganesh et al, 1994, i; Buo et al, 1995; Ganesh et al, 1997; Yang et al, 2000), als auch PAI-2 (Ganesh et al, 1994, i; Ganesh et al, 1997) uni- und multivariat signifikant waren. Allerdings konnte auch Fujii et al, 1999 in einer immunhistochemischen Arbeit für uPA keine prognostische Bedeutung aufzeigen. Erst in der Betrachtung des Quotienten aus uPA positiv und PAI-2 negativ ergab sich eine prognostische Aussagekraft.

UPA-R, Kathepsin D und PAI-1 waren dagegen in der univariaten Analyse signifikant, verloren ihre prognostische Bedeutung allerdings in der multivariaten Analyse. Die stärkste prognostische Bedeutung besaß der Nodalstatus pN mit einem relativen Risiko von 3,3. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Vielzahl von bereits publizierten Arbeiten überein (Hermanek et al, 1995). Dies zeigt, dass unabhängig von der Größe des Tumors eine bereits stattgefundene lymphogene Metastasierung die Prognose des Patienten verschlechtert. Als weiteren unabhängigen prognostischen Faktor wurde das Grading mit einem relativen Risiko von 2,2 ausgewählt, das einen in vielen Studien etablierten Prognoseparameter darstellt (Newland et al, 1994; Hermanek et al, 1995).

In dieser Arbeit konnte die in einer Vielzahl von Studien nachgewiesene unabhängige prognostische Bedeutung für die Proteasen des kolorektalen Karzinoms nicht bestätigt werden. Aber im Gegensatz zu anderen Autoren wurde ein klar definiertes Patientengut verwendet, in dem alle residualtumorfrei reseziert wurden und zum Zeitpunkt der Operation frei von Fernmetastasen waren. Ein weiterer Vorteil liegt in der fast gleichen Anzahl von Kolon- und Rektumkarzinomen, die in keiner anderen publizierten Studie erreicht werden konnte. Zusätzlich wurden die hier vorliegenden Untersuchungen mit der bis dato größten Patientenzahl durchgeführt, so dass diese Ergebnisse sicher einer erneuten Überprüfung bedürfen.

Bei der getrennten Betrachtung des Kolon- und Rektumkarzinoms wurden ferner die Werte der Proteasen und ihrer Inhibitoren im malignen und normalen Gewebe untersucht. Im Tumorgewebe des Kolons waren vergleichend zum Normalgewebe die

Werte für uPA um 8,65x erhöht, für uPA-R 3,95x, für PAI-1 8,5x und für PAI-2 4,62x. Mit einer Erniedrigung im Tumorgewebe um den Faktor 1,14 konnte für Kathepsin D mit einem $p = 0,38$ kein Signifikanzniveau erreicht werden.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch für das Rektum gewonnen werden. So war uPA um den Wert 8,29x, uPA-R 3,64x, PAI-1 6,54x und PAI-2 19,82x im Tumorgewebe signifikant erhöht. Kathepsin D zeigte eine nicht signifikante ($p = 0,19$) Erhöhung um den Faktor 1,13. Hierbei fällt auf, dass sowohl beim Kolon-, als auch beim Rektumkarzinom Kathepsin D im Tumorgewebe nicht signifikant gegenüber dem Normalgewebe verändert ist, aber jeweils eine univariat prognostische Bedeutung besitzt. Auffällig ist auch die starke Erhöhung von PAI-2 im malignen Rektumgewebe (19,82x) im Vergleich zum Kolon (4,62), während alle anderen Veränderungen zwischen Normal- und Tumorgewebe beim Kolon und Rektum ähnlichen sind. Auf der Basis von ELISA-Bestimmungen von Tumorextrakten fanden sich auch in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen entsprechende Ergebnisse. So wurde bei Skelly et al, 1997 ebenfalls für das Kolon und Rektum getrennte uPA Messungen vorgenommen. Dabei war uPA im Tumorgewebe des Kolons um den Faktor 3,5 und im Rektum um den Faktor 3,7 erhöht. Des weiteren wurden Erhöhungen im Tumorgewebe kolorektaler Karzinome für uPA von 10x (de Bruin et al, 1988), 6,5x (Ganesh et al, 1994, i) und 6,3x (Herszenyi et al, 1999) nachgewiesen, für PAI-1 5,9x (Herszenyi et al, 1999) und für Kathepsin D 1,7x (Galandiuk et al, 1993). Für PAI-2 konnte eine signifikante Erhöhung des PAI-2 Antigenwertes bei Dukes C kolorektalen Karzinomen um den Faktor 1,8 im Vergleich zum Stadium Dukes B gezeigt werden (Ganesh et al, 1997).

Um die Ergebnisse der publizierten Arbeiten zu Überlebensanalysen vergleichen zu können, muss man die Publikationen hinsichtlich ihres Residualtumor- und Metastasenstatus evaluieren. Da ein Kollektiv mit R0-resezierten und metastasenfremden Patienten verwendet und zusätzlich noch die Karzinome nach Kolon und Rektum aufgetrennt wurden, ist nur ein eingeschränkter Vergleich zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen und bereits publizierten möglich.

Die Parameter Geschlecht, pT, pN, Stadium, Grading, uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 wurden univariat mit dem log-rank Test in Hinblick auf das Überleben untersucht. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede der dichotomisierten Gruppen beim Kolonkarzinom für pN, Stadium, Grading, uPA, uPA-R, Kathepsin D und PAI-1. Kathepsin D war dabei invers korreliert, so dass im

Gegensatz zum Gesamtkollektiv beim Kolonkarzinom niedrige Werte mit einer schlechteren Prognose einhergingen. PAI-2 konnte mit einem $p = 0,08$ das geforderte Signifikanzniveau nicht erreichen. Beim Rektumkarzinom waren pT, pN, uPA-R, Kathepsin D und PAI-1 mit dem Überleben korreliert. PAI-2 war auch hier mit einem $p = 0,07$ nicht mehr signifikant.

Ganesh et al konnte 1994 (i) an 92 Patienten mit einem kolorektalem Karzinom zeigen, dass uPA und PAI-2 mit dem Gesamtüberleben korreliert waren. Im Normalgewebe zeigte sich eine Signifikanz für erniedrigte tPA Werte für das Gesamtüberleben, die in Verbindung mit uPA im Tumorgewebe, uPA (Tumorgewebe)/tPA (Normalgewebe), den stärksten univariaten Prognoseparameter darstellte.

Im selben Jahr konnte Ganesh et al (1994, ii) in einer anderen Arbeit auch für den uPA-R eine univariate prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben nachweisen. Yang et al, 2000 konnte bei 59 teils metastasierten Patienten für uPA und uPA-R mit Hilfe der Immunhistochemie eine Korrelation sowohl für das Gesamtüberleben, als auch für das rezidivfreie Überleben zeigen. Dies war für PAI-1 und PAI-2 nicht der Fall.

Für PAI-1 zeigten auch andere immunhistochemische Studien für kolorektale Karzinome ähnliche Ergebnisse (Buo et al, 1995; Ganesh et al, 1994, i). Nielsen et al, 1998 gelang es im Gegensatz dazu mit der ELISA-Methode bei kolorektalen Karzinomen eine Korrelation zum Überleben für PAI-1 im Plasma nachzuweisen. Im Tumorgewebe gelang dies auch Angermeier et al, 1998 für 53 R0 resezierte Rektumkarzinome. Ein Grund für die Unterschiede im Nachweis von PAI-1 durch Immunhistochemie und ELISA dürften in der Verteilung von PAI-1 in der extrazellulären Matrix und Stroma liegen.

Eine multivariat signifikante Bedeutung für PAI-2 konnte außer von Ganesh et al, 1994 (i) bei einem kolorektalen Mischkollektiv auch für das Rektumkarzinom allein von Angermeier et al, 1998 mit Hilfe der ELISA Methode nachgewiesen werden.

Für eine Vielzahl von anderen Tumorentitäten konnte eine ähnlich Bedeutung der Proteasen und deren Inhibitoren sowohl in der Tumorprogression und Metastasierung, als auch in der Überlebensprognose gefunden werden (Übersicht bei Duffy et al, 1999). So konnte zum Beispiel Nekarda et al, 1994 beim Magenkarzinom für uPA eine univariate und für PAI-1 sowohl eine univariate, als auch eine multivariate prognostische Bedeutung zeigen.

Ebenfalls beim Magenkarzinom konnten Allgayer et al, 1997 für Kathepsin D in einer semiquantitativen Immunhistochemiestudie bei 203 Patienten sowohl eine univariate, als auch eine multivariate prognostische Bedeutung für das rezidivfreie Überleben nachweisen. Hier waren aber erhöhte Werte mit einer schlechteren Prognose verbunden. Das Gesamtüberleben war dagegen nur in der univariaten Analyse signifikant. Bei den Kathepsin D Werten des Kolonkarzinoms zeigt sich im Vergleich zum Magenkarzinom eine umgekehrte prognostische Bedeutung.

In der multivariaten Analyse nach dem Cox-Regressionsmodell waren für das Kolonkarzinom pN, Grading und PAI-1 unabhängige Prognosefaktoren. Die Reihung nach dem relativen Risiko war pN (4,3), Grading (3,6) und PAI-1 (2,4). Beim Rektumkarzinom waren dies das Alter, pN und uPA-R. Das relative Risiko erbrachte hier die Reihenfolge uPA-R (9,4), Alter (2,6) und pN (2,4). Hierbei fällt auf, dass uPA-R für einen biologischen Parameter ein erstaunlich hohes relatives Risiko besitzt und in der multivariaten Analyse noch vor dem prognostisch etablierten Nodalstatus ausgewählt wurde. Mit Hilfe von uPA-R lässt sich eine Hochrisikogruppe mit 113 Patienten identifizieren (entspricht 74,3% der gesamten Rektumkarzinome). Da biologische Faktoren normalerweise auf Grund ihres niedrigen relativen Risikos nur als Stratifizierungsparameter in Untergruppen dienen, bekommt uPA-R beim Rektumkarzinom eine ganz neue Bedeutung.

PAI-2 konnte kein statistisch signifikantes Niveau in der multivariaten Analyse erreichen. Dies steht im Gegensatz zu der multivariaten Analyse von 53 Rektumkarzinomen, bei der PAI-2 einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt (Angermeier et al, 1998). Da es sich bei diesen 53 Rektumkarzinomen um ein Teilkollektiv der in dieser Arbeit verwendeten Patienten handelt, sind die Ergebnisse von Angermeier et al auf Grund der geringeren Fallzahl in Frage zu stellen.

In einer weiteren Studie war PAI-2 bei einem kolorektalen Mischkollektiv ebenfalls multivariat signifikant, während uPA keine prognostische Bedeutung mehr erlangte (Ganesh et al, 1994, i).

Dies konnte Ganesh et al, 1994 (ii) in einer aus dem gleichen Jahr veröffentlichten Arbeit auch für den uPA-R zeigen.

In einer immunhistochemischen Untersuchung konnte sowohl für uPA, als auch für uPA-R eine unabhängige prognostische Bedeutung nachgewiesen werden (Yang et al, 2000).

Für Kathepsin D konnten keine Daten einer multivariaten Analyse in der Literatur für Kolon- und Rektumkarzinome gefunden werden.

Hier zeigt sich, dass der Nodalstatus pN, wie bei einer Vielzahl anderer gastrointestinaler Karzinome (Siewert et al, 1998), sowohl beim Kolon-, als auch beim Rektumkarzinom eine unabhängige prognostische Bedeutung besitzen. Bei Betrachtung der Proteasen und ihrer Inhibitoren allerdings zeigte sich, dass unterschiedliche Faktoren in der multivariaten Analyse das Signifikanzniveau erreichten. Während beim Kolonkarzinom PAI-1 eine unabhängige prognostische Bedeutung besaß, war dies beim Rektumkarzinom uPA-R. Weiterhin bemerkenswert ist die umgekehrte Bedeutung der Kathepsin D Werte des Kolonkarzinoms im Vergleich zum Rektumkarzinom, zum kolorektalen Gesamtkollektiv und anderer gastrointestinaler Karzinome, wie das Magenkarzinom (Allgayer et al, 1997).

Die CART-Analyse bietet im Gegensatz zur multivariaten Analyse nach dem Cox-Regressionsmodell den Vorteil, dass Patientengruppen mit einem signifikant unterschiedlichem Risiko auf Grund der evaluierten Prognoseparameter definiert werden können (Hermanek et al, 1990). Diese Form des Prognosemodells entspricht mehr den klinischen Gegebenheiten.

Dabei wurden für das Kolonkarzinom zwei Gruppen identifiziert. In der ersten Ebene erfolgte eine Unterteilung in G = 1 oder 2 und G = 3 oder 4. Dabei stellte die besser differenzierten Karzinome die niedrig Risiko Gruppe mit einer DOD-Rate von 8,4% dar. In der hoch Risiko Gruppe verstarben dagegen 17 von 58 Patienten (DOD-Rate: 29,3%). Beim Rektumkarzinom fanden sich eine Risikounterteilung in drei Gruppen. Einmal nach dem Lymphknotenstatus und zum zweiten wurde die Gruppe der nichtbefallenen Lymphknoten (pN = 0) nach Kathepsin D unterteilt. Die Patienten mit befallenen Lymphknoten (pN = 1 oder 2) stellten die prognostisch ungünstigste Gruppe mit einer DOD-Rate von 37,3% dar. Die Gruppe mit nicht befallenen Lymphknoten und Kathepsin D Werten von größer 11378 ng/mg Protein hatte eine DOD-Rate von 22,5%. In der prognostisch günstigsten Gruppe (pN = 0 und Kathepsin D \leq 11378 ng/mg Protein) verstarb von 49 Patienten nur einer (DOD-Rate: 2%).

In der Literatur gibt es keine vergleichbaren Studien mit CART- Analysen für das kolorektale Karzinom.

Auch für die getrennte stadienabhängige Beobachtung der Proteasenwerte beim Kolon und Rektumkarzinom gibt es nur wenige vergleichbare Publikationen in der Literatur. Auf Grund der unterschiedlichen Metastasierungswege und der teilweise doch

differenten Therapieregime wurde der Frage nachgegangen, ob es auf biologischer Ebene einen Hinweis dafür gibt, Kolon- und Rektumkarzinome als unterschiedliche Entitäten zu betrachten. Allerdings erhielt man bei dem stadiengetrennten Vergleich der tumorassoziierten Proteasen und deren Inhibitoren, bis auf eine Erhöhung von PAI-1 im Stadium II beim Kolonkarzinom, kein signifikantes Ergebnis. Skelly et al konnte 1997 für uPA eine signifikante ($p = 0,03$) Erhöhung im Tumorgewebe des Kolon im Vergleich zum Rektum bei einem etwa halb so großem Kollektiv nachweisen. Hier erfolgte aber keine Auftrennung nach den Tumorstadien. Weiter geht auch aus der Publikation nicht hervor, ob die Stadienverteilung in den beiden Kollektiven ähnlich ist. So lässt sich nicht beurteilen, ob dieser Unterschied auf die Lokalisation, oder auf das Stadium zurückgeht.

Der Unterschied für PAI-1 im Stadium II in den stadienadaptierten Vergleichen, die inverse Bedeutung von Kathepsin D beim Kolonkarzinom und die unterschiedlichen multivariaten Ergebnisse bei der getrennten Betrachtung des Kolon- und Rektumkarzinoms sollte im Hinblick auf die Aufteilung von Kolon- und Rektumkarzinomen in weiteren Studien untersucht werden.

Ähnlich wie beim Magenkarzinom (Siewert et al, 1998) ist beim Kolonkarzinom der stärkste unabhängige prognostische Parameter der nodale Status, beim Rektumkarzinom steht er an dritter Stelle. Dies zeigt, dass unabhängig von der Größe des Tumors eine bereits stattgefundene lymphogene Metastasierung die Prognose des Patienten verschlechtert.

PAI-1 war beim Kolonkarzinom neben pN und dem Grading, und uPA-R beim Rektumkarzinom neben dem Alter und pN ein unabhängiger Prognosefaktor. Für uPA-R konnte dies in zwei anderen Studien für das kolorektale Karzinom aufgezeigt werden (Ganesh et al, 1994, ii; Yang et al, 2000).

Somit zeigte sich, dass sowohl PAI-1 beim Kolonkarzinom, als auch uPA-R beim Rektumkarzinom eine unabhängige prognostische Aussagekraft besitzen, während sie im Gesamtkollektiv das Signifikanzniveau nicht erreichen konnten. Dies erlaubt die Prognosegruppen weiterhin zu optimieren und somit einer individuellen Tumorthapie näher zu kommen. Des Weiteren könnten die tumorinvasionsassoziierten Proteasen bei größerem Verständnis eigene Therapieansatzpunkte bieten. Hier spielen vor allem die Antisense-Oligonucleotid-Technologie, Antikörper gegen das Proteasensystem, natürliche oder synthetische Enzyminhibitoren und uPA- oder uPA-R-Analoga eine immer größere Rolle. Ziel ist

es dabei das Tumorinvasions- und Metastasierungspotential des Tumor essentiell zu reduzieren (Schmitt et al, 1997).

5. Zusammenfassung

An 153 Kolonkarzinomen und 152 Rektumkarzinomen wurden prospektiv die invasionsassoziierten Proteolysefaktoren (uPA, uPA-R, Kathepsin D) und die Inhibitoren (PAI-1, PAI-2) auf ihre prognostische Bedeutung für das Überleben untersucht. Einschlusskriterien waren: eine R0-Resektion, keine Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Operation (UICC Stadium I – III), keine Vorbehandlung und die ausreichende Asservation schockgefrorenen Gewebes des Primärtumors.

Aus histologisch kontrolliertem Tumorgewebe und Normalgewebe wurden mit Triton-100 inkubierte Zytosolextrakte hergestellt und uPA, uPA-R, Kathepsin D, PAI-1 und PAI-2 mit kommerziell erhältlichen ELISAs gemessen.

Beim Kolonkarzinom befanden sich 27 Patienten (17,6%) im Stadium I, 72 Patienten (47,1%) im Stadium II und 54 Patienten (35,3%) im Stadium III. In der medianen Nachbeobachtungszeit von 47 Monate (16 - 121) verstarben 40 Patienten (26,1%) der 153 in Folge eines Rezidives.

Die Werte im Tumorgewebe des Kolons waren im Vergleich zum Normalgewebe für uPA um 8,65x, für uPA-R 3,95x, für PAI-1 8,5x und für PAI-2 4,62x signifikant erhöht. Für Kathepsin D im Tumorgewebe zeigte sich kein statistischer Unterschied zum Normalgewebe mit einer Erniedrigung um den Faktor 1,14.

Beim Kolonkarzinom fand sich eine signifikante Korrelation zwischen pN-Kategorie, Stadium, Grading, uPA, uPA-R, PAI-1 und Kathepsin D mit dem Überleben. Dabei zeigte Kathepsin D eine inverse Korrelation im Gegensatz zum Rektumkarzinom und kolorektalen Gesamtkollektiv. Für PAI-2 konnte keine Korrelation mit dem Überleben gezeigt werden. In der multivariaten Analyse (Cox-Regressionsmodell) konnten die pN-Kategorie (RR = 4,3), das Grading (RR = 3,6) und PAI-1 (RR = 2,4) als unabhängige Prognoseparameter identifiziert werden.

In der CART-Analyse konnten beim Kolonkarzinom bei vorgegebener Unterteilung nach dem Grading (G 1, 2 versus G 3, 4) insgesamt zwei Prognosegruppen definiert werden. Die prognostisch günstigere Gruppe der höher differenzierten Karzinome (G = 1, 2) hatte eine DOD-Rate von 8,4%. In der anderen Gruppe (G = 3, 4) war die DOD-Rate 29,3%.

Beim Rektumkarzinom waren 49 Patienten (32,2%) im Stadium I, 48 Patienten (31,6%) im Stadium II und 55 Patienten (36,2%) im Stadium III. Bei einer medianen Beobachtungszeit von 46 Monaten (6 – 109) verstarben 40 (26,3%) der 152 Patienten in Folge eines Rezidives.

Die Werte im Tumorgewebe des Rektums waren im Vergleich zum Normalgewebe für uPA 8,29x, für uPA-R 3,64x, für PAI-1 6,54x und für PAI-2 19,82x signifikant erhöht. Kathepsin D zeigte eine Erhöhung um den Faktor 1,13 ohne statistischen Unterschied zum Normalgewebe.

In der univariaten Überlebensanalyse beim Rektumkarzinom fand sich eine signifikante Unterteilung für die pT-Kategorie, pN-Kategorie, Stadium, uPA-R, Kathepsin D und PAI-1. Für uPA und PAI-2 konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden. In der multivariaten Analyse waren uPA-R (RR = 9,4), das Alter (RR = 2,6) und pN (RR = 2,4) unabhängige Prognoseparameter.

Im CART-Prognosemodell beim Rektumkarzinom konnten insgesamt drei prognostisch unterschiedliche Patientengruppen identifiziert werden. Dabei erfolgte die erste Unterteilung nach dem Lymphknotenstatus pN (pN0 versus pN+). Die prognostisch bessere Gruppe der nicht befallenen Lymphknoten (pN0) konnte in der zweiten Ebene durch Kathepsin D unterteilt werden. Die prognostisch beste Gruppe war Lymphknoten negativ und hatte einen Kathepsin D Wert von kleiner 11378 ng/mg Protein (DOD-Rate: 2%). Die zweite Gruppe war ebenfalls Lymphknoten negativ und hatte einen Kathepsin D Wert von größer 11378 ng/mg Protein bei einer DOD-Rate von 22,5%. Die schlechteste Gruppe war Lymphknoten positiv, ohne weitere Unterteilung (DOD-Rate: 37,3%).

In der vergleichenden, stadienadaptierten Untersuchung der Proteasenwerte und deren Inhibitoren zwischen Kolon- und Rektumkarzinom konnten bis auf PAI-1 im Stadium II keine Unterschiede festgestellt werden.

Beim kolorektalen Gesamtkollektiv besaßen uPA-R, Kathepsin D, und PAI-1 in der univariaten Analyse eine prognostische Bedeutung. In der multivariaten Überlebensanalyse waren nur die pN-Kategorie (RR = 3,3) und das Grading des Tumors (RR = 2,2) unabhängige Prognoseparameter.

6. Ausblick

Im Vergleich zu anderen publizierten Studien hatte diese Arbeit eine große Patientenfallzahl und untersuchte ein klinisch interessantes Subkollektiv (R0, Stadium I – III). Sowohl beim kolorektalen Gesamtkollektiv, als auch bei der getrennten Auswertung stellte der Nodalstatus pN einen sehr wichtigen klinischen Prognoseparameter dar. Beim Rektumkarzinom konnte mit dem CART-Modell für Patienten mit pN0 eine weitere prognostische Unterteilung durch Kathepsin D gefunden werden. Von den Proteasen/Inhibitoren beim Kolonkarzinom hatte PAI-1 eine unabhängige prognostische Bedeutung. Beim Rektumkarzinom war dies der uPA-R mit einem für einen biologischen Faktor ungewöhnlich hohen relativen Risiko von 9,4. Beide eignen sich zur Bildung von Gruppen mit unterschiedlicher Prognose und damit zur Therapieoptimierung. Der Unterschied zwischen Karzinomen des Rektums und des Kolons in der stadienadaptierten, vergleichenden Untersuchung der Proteasenexpression für PAI-1 in Stadium II bedarf noch weiterer Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

Allgayer, H., Babic, R., Grutzner, K. U., Beyer, B. C., Tarabichi, A., Wilhelm, S. F., Heiss, M. M.: An immunohistochemical assessment of cathepsin D in gastric carcinoma: its impact on clinical prognosis. *Cancer* 80 (1997) 179-187.

American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2000. <http://www.cancer.org> (2001) 1-43.

Andreasen, P. A., Nielsen, L. S., Kristensen, P., Grondahl-Hansen, J., Skriver, L., Dano, K.: Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J.Biol.Chem.* 261 (1986) 7644-7651.

Angermeier, C., Vogelsang, H., Nekarda, H., Schmitt, M., Berger, U., Siewert, J. R.: Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is an independent prognostic factor in R0-resected rectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 124 (1998) R52-R52 (Abstract).

Appella, E., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., Stoppelli, M. P., Corti, A., Cassani, G., Blasi, F.: The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. *J.Biol.Chem.* 262 (1987) 4437-4440.

Astedt, B., Holmberg, L.: Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature* 261 (1976) 595-597.

Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Giacosa, A., Rath, U., Faivre, J.: Calcium and fibre supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence: a randomised intervention trial. European Cancer Prevention Organisation Study Group. *Lancet* 356 (2000) 1300-1306.

Breimann, L., Friedmann, J., Ohlsen, R., Stone, C.: "Classification and regression trees (CART)". Wadsworth International Group, Belmont, CA (1984).

Buo, L., Meling, G. I., Karlsrud, T. S., Johansen, H. T., Aasen, A. O.: Antigen levels of urokinase plasminogen activator and its receptor at the tumor-host interface of colorectal adenocarcinomas are related to tumor aggressiveness. *Hum.Pathol.* 26 (1995) 1133-1138.

- Cerottini, J. P., Caplin, S., Saraga, E., Givel, J. C., Benhattar, J.: The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am.J.Surg.* 175 (1998) 198-202.
- Chapuis, P. H., Dent, O. F., Fisher, R., Newland, R. C., Pheils, M. T., Smyth, E., Colquhoun, K.: A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br.J.Surg.* 72 (1985) 698-702.
- Compton, C., Fenoglio-Preiser, C. M., Pettigrew, N., Fielding, L. P.: American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 88 (2000) 1739-1757.
- Cox, D. R.: Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 34 (1972) 187-220.
- Cubellis, M. V., Wun, T. C., Blasi, F.: Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. *EMBO J.* 9 (1990) 1079-1085.
- Dano, K., Behrendt, N., Brunner, N., Ellis, V., Plough, M., Pyke, C.: The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis* 8 (1994) 204-215.
- De Bruin, P. A., Griffioen, G., Verspaget, H. W., Verheijen, J. H., Dooijewaard, G., van den Ingh, H. F., Lamers, C. B.: Plasminogen activator profiles in neoplastic tissues of the human colon. *Cancer Res.* 48 (1988) 4520-4524.
- Deng, G., Royle, G., Seiffert, D., Loskutoff, D. J.: The PAI-1/vitronectin interaction: two cats in a bag? *Thromb.Haemost.* 74 (1995) 66-70.
- Duffy, M. J.: Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin.Cancer Res.* 2 (1996) 613-618.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W., O'Higgins, N.: Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg.Oncol* 71 (1999) 130-135.
- Ellis, V., Wun, T. C., Behrendt, N., Ronne, E., Dano, K.: Inhibition of receptor-bound urokinase by plasminogen-activator inhibitors. *J.Biol.Chem.* 265 (1990) 9904-9908.

Estreicher, A., Muhlhauser, J., Carpentier, J. L., Orci, L., Vassalli, J. D.: The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J.Cell Biol.* 111 (1990) 783-792.

Fujii, T., Obara, T., Tanno, S., Ura, H., Kohgo, Y.: Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 as a prognostic factor in human colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology.* 46 (1999) 2299-2308.

Galandiuk, S., Miseljic, S., Yang, A. R., Early, M., McCoy, M. D., Wittliff, J. L.: Expression of hormone receptors, cathepsin D, and HER-2/neu oncoprotein in normal colon and colonic disease. *Arch.Surg.* 128 (1993) 637-642.

Ganesh, S., Sier, C. F., Griffioen, G., Vloedgraven, H. J., de Boer, A., Welvaart, K., van de Velde, C. J., van Krieken, J. H., Verheijen, J. H., Lamers, C. B.: Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res.* 54 (1994) 4065-4071 (i).

Ganesh, S., Sier, C. F., Heerding, M. M., Griffioen, G., Lamers, C. B., Verspaget, H. W.: Urokinase receptor and colorectal cancer survival [letter]. *Lancet* 344 (1994) 401-402 (ii).

Ganesh, S., Sier, C. F., Heerding, M. M., van Krieken, J. H., Griffioen, G., Welvaart, K., van de Velde, C. J., Verheijen, J. H., Lamers, C. B., Verspaget, H. W.: Contribution of plasminogen activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 75 (1997) 1793-1801.

Ghadimi, B. M., Schlag, P. M.: [Tumor metastasis. Molecular principles and therapeutic options]. *Chirurg.* 69 (1998) 1315-1322.

Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., Willett, W. C.: Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54 (1994) 2390-2397.

Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Fuchs, C., Rosner, B. A., Speizer, F. E., Willett, W. C.: Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann.Intern.Med.* 129 (1998) 517-524.

- Giovannucci, E.: The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed.Pharmacother.* 53 (1999) 303-308.
- Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Jago, N., Asselain, B., Remvikos, Y., Girodet, J., Salmon, R. J., Thomas, G.: Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106 (1994) 42-48.
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B.: The molecular basis of Turcot's syndrome. *N.Engl.J.Med.* 332 (1995) 839-847.
- Hermanek, P., Hutter, R. V., Sobin, L. H.: Prognostic grouping: the next step in tumor classification. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 116 (1990) 513-516.
- Hermanek, P., Wittekind, C.: Residual tumor (R) classification and prognosis. *Semin.Surg.Oncol.* 10 (1994) 12-20.
- Hermanek, P., Gospodarowicz, M. K., Henson, D. E., Hutter, R. V. P., Sobin, L. H.: "Prognostic Factors in Cancer". Springer, Berlin (1995).
- Hermanek, P.: Prognostic factor research in oncology. *J.Clin.Epidemiol.* 52 (1999) 371-374.
- Herszenyi, L., Plebani, M., Carraro, P., De Paoli, M., Roveroni, G., Cardin, R., Tulassay, Z., Naccarato, R., Farinati, F.: The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer* 86 (1999) 1135-1142.
- Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Chow, W. H., Schuman, L. M., Co, C. H., Gridley, G., Bjelke, E., Wacholder, S., Blot, W. J.: Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int.J.Cancer* 77 (1998) 549-553.
- International Union Against Cancer. UICC: "TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5.Auflage". Hrsg. Ch. Wittekind, G.Wagner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1997).
- Kaplan, E. L., Meier, P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53 (1958) 457-481.

- Levin, B.: The role of dietary factors and chemoprevention in gastrointestinal malignancy. *Curr.Opin.Oncol.* 7 (1995) 377-380.
- Lindmark, G., Bergstrom, R., Pahlman, L., Glimelius, B.: The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 71 (1995) 1090-1094.
- Liotta, L. A., Steeg, P. S., Stetler-Stevenson, W. G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 (1991) 327-336.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M., Pagano, M.: Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat.Med.* 3 (1997) 231-234.
- McArdle, C. S., Hole, D.: Impact of variability among surgeons on postoperative morbidity and mortality and ultimate survival. *BMJ.* 302 (1991) 1501-1505.
- Michelassi, F., Ayala, J. J., Balestracci, T., Goldberg, R., Chappell, R., Block, G. E.: Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann.Surg.* 214 (1991) 11-18.
- Nekarda, H.: Faktoren der tumorinvasionsassoziierten Proteolyse als Prognoseparameter beim residuumtumorfrei resezierten Magenkarzinom. Habilitationsschrift. Fakultät für Medizin der Technischen Universität München (2001) .
- Nekarda, H., Schmitt, M., Ulm, K., Wenninger, A., Vogelsang, H., Becker, K., Roder, J. D., Fink, U., Siewert, J. R.: Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res.* 54 (1994) 2900-2907.
- Newland, R. C., Dent, O. F., Lyttle, M. N., Chapuis, P. H., Bokey, E. L.: Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 73 (1994) 2076-2082.
- Nielsen, H. J., Pappot, H., Christensen, I. J., Brunner, N., Thorlacius-Ussing, O., Moesgaard, F., Dano, K., Grondahl-Hansen, J.: Association between plasma

concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer. *BMJ*. 316 (1998) 829-830.

Nykjaer, A., Petersen, C. M., Moller, B., Jensen, P. H., Moestrup, S. K., Holtet, T. L., Etzerodt, M., Thogersen, H. C., Munch, M., Andreasen, P. A.: Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J.Biol.Chem.* 267 (1992) 14543-14546.

Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E. I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., Blasi, F.: Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J.* 16 (1997) 2610-2620.

Ofner, D., Riedmann, B., Maier, H., Hittmair, A., Rumer, A., Totsch, M., Spechtenhauser, B., Bocker, W., Schmid, K. W.: Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma--correlation with tumour stage and long-term survival. *J.Pathol.* 175 (1995) 441-448.

Peltomaki, P., de la Chapelle, A.: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv.Cancer Res* 71 (1997) 93-119.

Peto, R., Peto, J.: Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *J.R.Statist.Soc.A* 135 (1972) 185-207.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H., Schmitt, M.: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int.J.Oncol.* 13 (1998) 893-906.

Rocheffort, H., Liaudet-Coopman, E.: Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *APMIS* 107 (1999) 86-95.

Ruiter, D. J., Ferrier, C. M., van Muijen, G. N., Henzen-Logmans, S. C., Kennedy, S., Kramer, M. D., Nielsen, B. S., Schmitt, M.: Quality control of immunohistochemical evaluation of tumour-associated plasminogen activators and related components. European BIOMED-1 Concerted Action on Clinical Relevance of Proteases in Tumour Invasion and Metastasis. *Eur.J.Cancer* 34 (1998) 1334-1340.

- Sankila, R., Aaltonen, L. A., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P.: Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 110 (1996) 682-687.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F., Graeff, H.: Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb.Haemost.* 78 (1997) 285-296.
- Schmoll, H. J.: Kolorektales Karzinom. In "Kompendium Internistische Onkologie. Band 2", Schmoll, H. J., Höffken, K., and Possinger, K. (Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1999) 3. Auflage, 941 - 1039.
- Schwartz, M. K.: Tissue cathepsins as tumor markers. *Clin.Chim.Acta* 237 (1995) 67-78.
- Segal, M. R.: Regression Trees for censored data. *Biometrics* 44 (1988) 35-47.
- Seiffert, D., Loskutoff, D. J.: Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin. *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 2824-2830.
- Shibata, D., Reale, M. A., Lavin, P., Silverman, M., Fearon, E. R., Steele, G., Jessup, J. M., Loda, M., Summerhayes, I. C.: The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 335 (1996) 1727-1732.
- Siewert, J. R., Bottcher, K., Stein, H. J., Roder, J. D.: Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann.Surg.* 228 (1998) 449-461.
- Skelly, M. M., Troy, A., Duffy, M. J., Mulcahy, H. E., Duggan, C., Connell, T. G., O'Donoghue, D. P., Sheahan, K.: Urokinase-type plasminogen activator in colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and patient outcome. *Clin.Cancer Res.* 3 (1997) 1837-1840.
- Stefansson, S., Lawrence, D. A.: The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383 (1996) 441-443.

Stephens, R. W., Pedersen, A. N., Nielsen, H. J., Hamers, M. J., Hoyer-Hansen, G., Ronne, E., Dybkjaer, E., Dano, K., Brunner, N.: ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin.Chem.* 43 (1997) 1868-1876.

Sweep, C. G., Geurts-Moespot, J., Grebenschikov, N., de Witte, J. H., Heuvel, J. J., Schmitt, M., Duffy, M. J., Janicke, F., Kramer, M. D., Foekens, J. A., Brunner, N., Brugal, G., Pedersen, A. N., Benraad, T. J.: External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br.J.Cancer* 78 (1998) 1434-1441.

Toribara, N. W., Sleisenger, M. H.: Screening for colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 332 (1995) 861-867.

Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und Technischen Universität: Kolonkarzinome, Rektumkarzinome. In "Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Gastrointestinale Tumoren.", (2001) 6. Auflage, 215 – 265.

van Meijer, M., Pannekoek, H.: Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update. *Fibrinolysis* 9 (1995) 263-276.

Vassalli, J. D., Baccino, D., Belin, D.: A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J.Cell Biol.* 100 (1985) 86-92.

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos, J. L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.* 319 (1988) 525-532.

Wanebo, H. J., Rao, B., Pinsky, C. M., Hoffman, R. G., Stearns, M., Schwartz, M. K., Oettgen, H. F.: Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 299 (1978) 448-451.

Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D. I., Bodary, S. C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., Chapman, H. A.: Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273 (1996) 1551-1555.

Yang, J. L., Seetoo, D., Wang, Y., Ranson, M., Berney, C. R., Ham, J. M., Russell, P. J., Crowe, P. J.: 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* 89 (2000) 431-439.

8. Anhang

8.1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen Seite

1. Einleitung

Abbildung 1:	Aktivierungskaskade der Proteasen und Inhibitoren	8
Abbildung 2:	Prinzip der lokalen Tumorprogression und Metastasierung	11
Abbildung 3:	Duale Funktion des Plasminogenaktivator-komplexes	12

2. Patienten

Tabelle 1:	Lokalisationsverteilung der Kolon- und Rektumkarzinome	14
Tabelle 2:	Stadienverteilung der Kolonkarzinome	15
Tabelle 3:	Stadienverteilung der Rektumkarzinome	16
Tabelle 4:	Aufstellung der verwendeten Parameter	17

3. Ergebnisse

Kolon

Abbildung 4:	Überlebenskurve für uPA	23
Abbildung 5:	Überlebenskurve für uPA-R	24
Abbildung 6:	Überlebenskurve für Kathepsin D	25
Abbildung 7:	Überlebenskurve für PAI-1	26
Abbildung 8:	Überlebenskurve für PAI-2	27
Tabelle 5:	Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse	28
Abbildung 9:	CART-Analyse beim Kolonkarzinom	29

Rektum

Abbildung 10:	Überlebenskurve für uPA	30
Abbildung 11:	Überlebenskurve für uPA-R	31

Abbildung 12:	Überlebenskurve für Kathepsin D	32
Abbildung 13:	Überlebenskurve für PAI-1	33
Abbildung 14:	Überlebenskurve für PAI-2	34
Tabelle 6:	Ergebnisse der Cox-Regressionsanalyse	35
Abbildung 15:	CART-Analyse beim Rektumkarzinom	36

Kolorektales Gesamtkollektiv

Abbildung 16:	Überlebenskurve für uPA	37
Abbildung 17:	Überlebenskurve für uPA-R	38
Abbildung 18:	Überlebenskurve für Kathepsin D	39
Abbildung 19:	Überlebenskurve für PAI-1	40
Abbildung 20:	Überlebenskurve für PAI-2	41
Tabelle 7:	Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analyse	42

Vergleich der Proteasen und deren Inhibitoren

Tabelle 8:	Mediane der Proteasen und Inhibitoren im Stadium I	43
Tabelle 9:	Mediane der Proteasen und Inhibitoren im Stadium II	44
Tabelle 10:	Mediane der Proteasen und Inhibitoren im Stadium III	44

8.2. Abkürzungsverzeichnis

CART	„Classification and Regression Tree“ Analyse
DOD-Rate	„Death of Disease-Rate“ (= beobachtete Sterberate)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
5-JÜLR	5-Jahresüberlebensrate nach Kaplan-Meier
Kath D	Kathepsin D
KI	Konfidenzintervall
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 1
PAI-2	Plasminogenaktivator Inhibitor Typ 2
PBS	Phosphate-buffered Saline
RR	relatives Risiko
TBS	Tris-buffered Saline
tPA	tissue-type plasminogen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (Urokinase)
HMW-uPA	aktives uPA mit hohem Molekulargewicht
LMW-uPA	aktives uPA mit niedrigem Molekulargewicht
UPA-R	Urokinase-Rezeptor

Danksagung

Mein Dank geht vor allem an Herrn PD Dr. Nekarda für die Idee und Überlassung des Themas, für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsraum im Labor und am Computer, die Benutzung von Material aus der Tumorbank, die Überlassung von Überlebensdaten der Karzinompatienten, die zahlreichen konstruktiven Anregungen und die kritische Diskussion meiner Ergebnisse.

Des weiteren an Herrn Dr. Vogelsang für die Unterstützung bei der Definition von Fragestellung und Ziel der Arbeit, die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, die Bereitstellung von Literatur, sowie die Vorkorrekturen und die Anregung zur weiteren Beschäftigung mit onkologischen Fragestellungen.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Herrn MD J. Mueller für sein angeregtes Interesse und den Beistand in histologischen Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den MTA's des chirurgisch-onkologischen Labors, Frau Carmen Seidl, Frau Dietlind Pöhlmann und Frau Heidi Beil-Moeller für die Unterstützung am Computer, beim Erlernen der Methoden, beim Vorbereiten der Proben und die Weitergabe von Informationen.

Dank auch an Frau Ursula Berger von dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Direktor: Univ. Prof. Dr. A. Neiß) für die Mitwirkung bei statistischen Fragen und die Weitergabe von Informationen.

Mein größter Dank gilt aber meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Verständnis dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Alexander M. Zimmermann

Geburtsdatum und -ort: 07. Mai 1973 in Aichach

Eltern: Jürgen Zimmermann, Lehrer
Anna Elisabeth Zimmermann, Bankkauffrau

Schulbildung: 1979 – 1983 Grundschule, Aichach
1983 – 1992 Deutschherren Gymnasium, Aichach

Wehrdienst: 1992 – 1993 Grundwehrdienst an der Sanitätsakademie
München

Studium: 1993 – 1999 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians Universität München
1999 Wechsel an die Technische Universität München

Famulaturen: Chirurgie in Aichach, München, Des Moines (USA) und
Kapstadt (Südafrika)

Praktisches Jahr: Innere Medizin an der University of North Carolina
(USA) und am Klinikum Rechts der Isar, München
Chirurgie am Klinikum Rechts der Isar, München
Orthopädie am Klinikum Rechts der Isar, München

AIP: Seit 16. August 2000 Arzt im Praktikum an der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Technischen
Universität München, Klinikum Rechts der Isar