

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Prof. Dr. med. M. B. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Retrospektive Analyse von an der
Universitätsmedizin Göttingen (UMG)
behandelten Patienten und Patientinnen mit
kolorektalen Karzinomen im Zeitraum 2000 bis
2020 und Korrelation der klinischen Parameter
mit Proteinanalysen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Linde-Allegre Emmalie Rosen

aus

Göttingen

Göttingen 2022

D e k a n:	Prof. Dr. med. W. Brück
I. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Lena-Christin Conradi
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Philipp Ströbel
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. Thomas Meyer
Datum der mündlichen Prüfung:	23.06.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Retrospektive Analyse von an der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) behandelten Patienten und Patientinnen mit kolorektalen Karzinomen im Zeitraum 2000 bis 2020 und Korrelation der klinischen Parameter mit Proteinanalysen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

In Erinnerung an unseren Vater



Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Ätiopathogenese des kolorektalen Karzinoms	3
1.2. Klassifikation kolorektaler Karzinome.....	5
1.3. Marker zur Prädiktion und Prognoseabschätzung in der Therapie der kolorektalen Karzinome	5
1.3.1. RAS und BRAF-Mutationen.....	6
1.3.2. EGFR-Rezeptorproteine.....	6
1.3.3. Mikrosatelliteninstabilität.....	7
1.3.4. Bedeutung der Glykolyse im kolorektalen Karzinom.....	8
1.4. Prinzipien der Therapie des Kolorektalen Karzinoms.....	9
1.4.1. Resektion.....	9
1.4.2. Chemotherapie.....	10
1.5. Tumorstadien-adaptierte Therapie des Kolonkarzinoms	10
1.5.1. Lokal begrenztes Kolonkarzinom UICC I-II.....	10
1.5.2. Lokal fortgeschrittenes Kolonkarzinom UICC III	11
1.5.3. Fernmetastasiertes Kolonkarzinom UICC IV	11
1.6. Personalisierung der onkologischen Therapie des metastasierten Kolorektalen Karzinoms unter Berücksichtigung zielgerichteter Therapien	11
1.7. Cancer Scout.....	13
1.8. Zielsetzung und Fragestellung	14
2. Patientenkohorte, Material und Methodik.....	16
2.1. Patientenkollektiv.....	16
2.2. Einverständnis und Ethikvotum	17
2.3. Datenerfassung in SecuTrial ®.....	17
2.4. Follow-Up-Erhebung.....	17
2.5. Proteomics-Analyse	18
2.6. Statistische Methodik	18
2.6.1. Variablen der klinikopathologischen Parameter	19
2.6.2. Box-Plot-Diagramme	19
2.6.3. Häufigkeitstabellen	20

2.6.4.	Kreuztabellen	20
2.6.5.	Korrelationsanalysen (Bivariat).....	20
2.6.6.	Mann-Whitney U Test	21
2.6.7.	Cramers-V Wert.....	21
2.6.8.	Sterbetafeln	22
2.6.9.	Kaplan-Meier-Kurven.....	22
2.6.10.	Signifikanzniveau	23
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Patientenkollektiv und postoperative klinikopathologische Parameter.....	24
3.2.	Follow-Up.....	30
3.3.	Proteinexpressionen in Abhängigkeit des Tumorstadiums, Nodalstatus, Gradings und der Lokalisation.....	34
3.4.	Disease-free-survival und Overall-survival in Korrelation zu den klinikopathologischen Parametern.....	42
3.5.	Disease-free-survival und Overall-survival in Abhängigkeit der Expression von Proteinen aus der Glykolyse und von EGFR-Proteinen.....	46
4.	Diskussion	57
4.1.	Charakteristika des Patientenkollektivs	58
4.2.	<i>DFS</i> und <i>OS</i> in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter	59
4.3.	Proteinexpression in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter	63
4.4.	<i>DFS</i> und <i>OS</i> in Abhängigkeit der Proteinexpression.....	65
5.	Zusammenfassung	68
6.	Literaturverzeichnis.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Untersuchtes Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien sowie erhobene Parameter.....	16
Abbildung 2. Histogramm und prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation	24
Abbildung 3. Balkendiagramme der Tumorstadien und des Gradings in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	25
Abbildung 4. Balkendiagramme des Nodalstatus und Metastasierungsstatus in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	26
Abbildung 5. Balkendiagramm des UICC-Stadiums in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	26
Abbildung 6. Histogramm zur Dauer des Follow-Ups in Monaten (n = 697)	30
Abbildung 7. Balkendiagramm der Erstrezidivlokalisation in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	30
Abbildung 8. Balkendiagramme der Zweitrezidiv- und Drittrezidivlokalisation in Abhängigkeit der Tumorlokalisation	31
Abbildung 9. Balkendiagramm der Todesursache in Abhängigkeit der Tumorlokalisation....	32
Abbildung 10. Balkendiagramme der Proteinexpression der metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums, des Gradings und der Lokalisation.....	34
Abbildung 11. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums	36
Abbildung 12. Kombinierte Darstellung von Streudiagramm nach Pearson und Balkendiagramm der Proteinexpression in Abhängigkeit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen je Protein.....	37
Abbildung 13. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Gradings.....	38
Abbildung 14. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit der Tumorlokalisation rechtes versus linkes Colon	39
Abbildung 15. Balkendiagramme der Proteinexpression der Proteine der EGFR-Familie in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus und der Tumorlokalisation	40
Abbildung 16. Balkendiagramm der Proteinexpression des EGFR-Proteins ERBB3 in Abhängigkeit des Metastierungsstatus.....	41
Abbildung 17. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des Tumorstadiums	42
Abbildung 18. Streudiagramm nach Pearson des OS mit linearem Zusammenhang von Überlebenszeit und Anzahl der untersuchten Lymphknoten (n = 697)	43
Abbildung 19. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des Nodalstatus ...	43

Abbildung 20. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus	44
Abbildung 21. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des UICC-Stadiums	44
Abbildung 22. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des Gradings.....	45
Abbildung 23. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Tumorlokalisation rechtes versus linkes Colon	46
Abbildung 24. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine PGK1 und PKLR.....	48
Abbildung 25. Kaplan-Meier-Schätzer des <i>DFS</i> und <i>OS</i> in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine HK1 und HK3.....	49
Abbildung 26. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine ENO2 und ALDOB.....	50
Abbildung 27. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der gesamten metabolischen Proteine der Glykolyse.....	51
Abbildung 28. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der EGFR-Proteine	52
Abbildung 29. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der einzelnen Proteine der EGFR-Familie.....	53
Abbildung 30. Streudiagramm nach Pearson des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression Glykolyse und EGFR-Familie.....	54
Abbildung 31. Streudiagramm nach Pearson des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression der EGFR-Proteine	55
Abbildung 32. Streudiagramm nach Pearson des DFS und OS in Abhängigkeit der Proteinexpression metabolischen Proteine der Glykolyse gesamt.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Veränderte Darstellung der UICC-Klassifikation (modifiziert nach Boczek (2017))	5
Tabelle 2. Postoperative klinikopathologische Parameter der untersuchten kolorektalen Karzinome (n=697)	28
Tabelle 3. Tabelle der Follow-Up-Daten der kolorektalen Karzinome im untersuchten Kollektiv	33
Tabelle 4. Reihenfolge Korrelationsstärke der metabolischen Proteine der Glykolyse	40

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatöse Polyposis Coli (Tumorsuppressorgen)
ASIR	Altersstandardisierte Inzidenzrate pro 100.000 Einwohner
CME	Komplette mesokolische Exzision
cTNM	TNM-Klassifikation nach klinischen Staging-Ergebnissen
CTx	Chemotherapie
DFS	Krankheitsfreies Überleben
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	<i>Formalin-fixed Paraffin-Embedded Tissue</i>
FOLFIRI	Kombinierte 5-Fluorouracil-, Folinsäure und Irinotecan-Chemotherapie
FOLFOX	Kombinierte Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin
FOLFOXIRI	Kombinierte Chemotherapie nach FOLFOX-Regime plus Irinotecan
5-FU	5-Fluorouracil
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Conditions</i>
K-RAS	Kirsten-ras-Protoonkogen
KRK	Kolorektales Karzinom
LK	Lymphknoten
mKRK	Metastasiertes kolorektales Karzinom
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
N/A	<i>Not Available</i>
NGS	<i>Next-generation-sequencing</i>
OP	Operation
ORR	<i>Overall Response Rate</i>
OS	<i>Overall Survival</i>
PFS	Progressionsfreies Überleben
pTNM	TNM-Klassifikation nach histopathologischem Befund
RAS	Rat sarcoma
TMB	<i>Tumor-mutational-burden</i>

TNM	Klassifikationssystem maligner Tumore
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XELOX	Kombinierte Capecitabin- und Oxaliplatin-Chemotherapie

1. Einleitung

Im Jahr 2020 traten 1,931 Millionen Neuerkrankungen von kolorektalen Karzinomen (KRK) weltweit auf, womit sie die dritthäufigsten Karzinome weltweit darstellen. In 59,5% der Fälle handelte es sich um Kolonkarzinome (1,148 Millionen), in 37,9% der Fälle (732.210) um Rektumkarzinome. Im Jahr 2020 verstarben 935.173 Erkrankte weltweit. Die hohe Mortalität von 48,4% zeigt die weitere Notwendigkeit zur Verbesserung von Vorsorge, Diagnostik und Therapie (Wild CP 2020).

Betrachtet man die weltweiten Inzidenzraten, wird deutlich, dass regional große Unterschiede vorzufinden sind. Es zeigt sich, dass es Schwerpunkte des Auftretens vor allem in Nordamerika, Europa und Ozeanien gibt. So lag 2020 die Inzidenzrate in Europa bei 0,69% (519.820 auf 743.837.100 Einwohner), in Nordamerika bei 0,49% (180.575 auf 363.844.506 Einwohner) während sie in Asien bei 0,22% lag (1.009.400 Erkrankungen bei 4.543.943.980) (Siegel et al. 2020).

Die Entwicklung der Inzidenzraten in den vergangenen Jahrzehnten ist insgesamt rückläufig, korreliert jedoch stark mit der sozioökonomischen Struktur. In Schwellenländern zeigen sich Anstiege der Inzidenzraten, während in hochentwickelten Nationen die hohen Inzidenzraten stagnieren oder rückläufig sind (Wild CP 2020).

Umgekehrt findet sich jedoch in den hochentwickelten Nationen ein starker und kontinuierlicher Anstieg der Inzidenzraten in den jüngeren Altersgruppen (Wong et al. 2021). Auch wenn *Early-Onset-KRK* häufig mit familiären Prädispositionen zu erklären sind, treten die meisten *KRK* des jungen Patienten spontan auf. Ursächlich scheinen vor allem Lebensstil-assoziierte Faktoren wie Übergewicht zu sein (Siegel et al. 2017).

Im Jahr 2016 wurden 58.290 *KRK* Neuerkrankungen in Deutschland registriert, entsprechend einer altersstandardisierten Erkrankungsrate von 31,8 pro 100.000 Einwohner bei Frauen (38,5% weibliche) und 50,7 pro 100.000 Einwohner bei Männern (61,5% männliche Patienten) (Robert Koch Institut 2020a). Damit ist auch in Deutschland ein sich seit 2003 fortsetzender Rückgang der Inzidenz zu verzeichnen. In der Betrachtung der Jahre 2000 versus 2016 zeigt sich, dass ein noch stärkerer Rückgang der altersstandardisierten Sterberate, von 19,0 auf 11,3/100.000 Einwohner bei Frauen (Rückgang 40,5%) und von 29,6 auf 19,0/100.000 Einwohner bei Männern (Rückgang 35,8%), zu verzeichnen gewesen ist (Cardoso et al. 2021).

Genderdisclaimer:

In dieser Arbeit wird das generische Maskulinum benutzt. Es bezieht sich sowohl auf die männliche, die weibliche und andere Geschlechteridentitäten, diese werden ausdrücklich in allen Fällen mitgemeint. Auf die Verwendung der männlichen und weiblichen Sprachformen wird zur Verbesserung der Leserlichkeit verzichtet und beabsichtigt keine Wertung.

Ein Effekt, der sich durch standardisierte Früherkennungsprogramme bei gutem Zugang zu medizinischer Versorgung erklären lässt und welcher bei ansteigenden Inzidenzraten in jüngeren Altersgruppen eine Ausweitung der Screening-Maßnahmen bedenken lassen sollte (Kreis 2016).

Umgekehrt jedoch ändert sich, neben der medizinischen Bedeutung, auch der sozioökonomische Stellenwert des KRK aufgrund der steigenden Lebenserwartung und der höheren Inzidenz im fortgeschrittenen Alter keineswegs.

Um eine effiziente und ökonomisch sinnvolle Behandlung gewährleisten zu können, liegt ein Schwerpunkt, neben der Verbesserung der frühzeitigen Diagnostik und der Intensivierung etablierter multimodaler Therapiemethoden, auf der Personalisierung mittels zielgerichteter Therapien.

Große Fortschritte wurden in der molekularpathologischen Analytik, der Gensequenzierung und Proteinanalyse erzielt. So können dank der molekularen Diagnostik prädiktive und prognostische Biomarker identifiziert werden, die neue Ansatzstellen für effektivere Therapiekonzepte darstellen (Kloor et al. 2008).

Eine Mutationsanalyse der RAS-Gene KRAS und NRAS, des BRAF-Gens und die Erhebung des Status hinsichtlich einer Mikrosatelliteninstabilität dienen dazu den Patienten eine möglichst effektive Behandlung zu zuführen (Nöpel-Dünnebacke et al. 2020).

Durch die Entwicklung zielgerichteter Therapien, wie monoklonaler Antikörper gegen intrazelluläre Proteine und Rezeptoren, konnten die Therapieoptionen in den vergangenen Jahren deutlich erweitert und die Prognosen mitunter drastisch verbessert werden. So stehen beispielsweise mit *Cetuximab*, einem monoklonalen Antikörper gegen den EGFR-Rezeptor, und *Bevacizumab*, einem monoklonalen Antikörper gegen den VEGF Gefäßwachstumsfaktor, zielgerichtete Substanzen zur Verfügung, welche die Therapie im Stadium IV entscheidend beeinflusst haben (Cunningham et al. 2004). Während *Cetuximab* eine hohe Wirksamkeit bei Vorliegen des RAS-Proteins im Wildtyp zeigt, ist die Anwendung bei mutiertem RAS-Protein nicht erfolgsversprechend, stattdessen kann in diesem Fall *Bevacizumab* angewendet werden und eine entsprechende Mutationsanalyse ist essenziell für die Einleitung der adäquaten Therapie. Dies zeigt, welchen Stellenwert die Tumorphysiologie in der Selektion der vielversprechendsten Therapeutika einnimmt. Beide Substanzen sind bereits seit 2004 zugelassen und sind Bestandteil der Leitlinie in der Therapie des metastasierten KRK. Sie werden in Form von Kombinationen mit Chemotherapeutika als *Targeted Therapies* eingesetzt (Modest und von Bergwelt-Baildon 2019).

Die Analyse der Tumoren in Bezug auf eine Mikrosatelliteninstabilität ermöglicht eine weitergehende Differenzierung der Tumorsubtypen und der Auswahl der geeignetsten

Therapiekonzepte. MSI-Tumoren zeigen häufig keine guten Ansprechraten auf die klassischen Chemotherapeutika, so dass ein Bedarf nach alternativen Therapieoptionen besteht.

Mit *Pembrolizumab* steht ein monoklonaler PD-1-Checkpointinhibitor zur Verfügung, welcher bei MSI-KRK im Stadium IV eine Verbesserung des *Progression-Free-Survivals* im Vergleich zu konventionellen Chemotherapieregimen zeigt. In der *KEYNOTE-177*-Studie konnte eine Verlängerung des *PFS* von 8,2 Monaten (konventionelle CTx) auf 16,5 Monate (*Pembrolizumab*) und bei einem Ansprechen der Tumoren auf eine Therapie mit *Pembrolizumab* ebenfalls Langzeitremission nachgewiesen werden (André et al. 2020).

Auch die Kombinationstherapie mit den Immuncheckpoint-Inhibitoren *Nivolumab* (PD1) und *Ipilimumab* (CTLA4) zeigte im Rahmen der Checkmate 142-Studie vielversprechende Ergebnisse in der Anwendung bei mikrosatelliteninstabilen mKRK (Lenz et al. 2021).

Die umfangreiche molekulare Diagnostik, als Grundlage für diese und zukünftige Therapien, ist äußerst kostenintensiv, so dass, bei sich fortsetzender Ressourcenverknappung in der Krankenversorgung, neue kostengünstigere Ansätze erforscht werden müssen, welche eine rasche Verfügbarkeit in der breiten Anwendung ermöglichen sollen.

Erste Ansätze mittels *Deep Learning* zeigen erfolgsversprechende Ergebnisse beispielsweise bei der Analytik der Mikrosatelliteninstabilität mittels automatisierter Scans von HE-gefärbten Präparaten (Kather et al. 2019).

Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Forschungsprojekt *Cancer-Scout* des Institutes für Pathologie der UMG, widmet sich in Zusammenarbeit mit Siemens Healthineers (*Erlangen*), der Fragestellung wie digitale Biopsien automatisiert analysiert werden können und eine ökonomisch vertretbare Molekulardiagnostik hierdurch zur Verfügung gestellt werden kann.

1.1. Ätiopathogenese des kolorektalen Karzinoms

Das Auftreten von KRK ist von genetischen Risikofaktoren, endogenen Risikofaktoren, wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und dem männlichen Geschlecht, sowie durch exogene, Lebensstil-assoziierte Risikofaktoren stark beeinflusst. Zu diesen exogenen Faktoren zählen neben einem hohen sozioökonomischen Status, Tabakkonsum, hoher Fleisch- und Fettkonsum, eine ballaststoffarme Ernährung, Alkohol- und Kaffeekonsum, unzureichende Vitaminzufuhr und körperliche Inaktivität (Huxley et al. 2009).

Die Mehrzahl der KRK ist mit fortschreitendem Lebensalter zu verzeichnen. Während 90% der Erkrankungen nach dem 50. Lebensjahr auftreten, liegt das Hauptmanifestationsalter zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr (Katalinic 2021).

KRK werden in sporadische, familiär gehäuft und hereditär auftretende Tumore unterschieden. Während die meisten Karzinome sporadisch, als Folge einer Häufung somatischer Mutationen, auftreten, liegen in 20-30% der Fälle familiär-gehäuft auftretende Tumore vor. Hier ist eine familiäre Häufung nachweisbar, während eine monogenetische Ursache nicht aufgezeigt werden kann. In 5-10% der Fälle kann eine hereditäre Ursache gefunden werden (Möslein 2016).

Zumeist handelt es sich um die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Lynch-Syndrom, das *Hereditary-Nonpolyposis-Colon-Cancer-Syndrom* (HNPCC), seltener treten das juvenile Polyposis-Syndrom und das Peutz-Jeghers-Syndrom ursächlich auf (Aretz 2010).

In etwa 80% der Fälle sporadisch auftretender Karzinome wird eine Chromosomeninstabilität als Ursache angenommen. Der Entstehung sporadischer kolorektaler Adenokarzinome geht in der Vielzahl der Fälle eine maligne Transformation aus vorbestehenden benignen Adenomen voraus (Muto et al. 1975).

Diese Transformation findet sich vor allem bei breitbasig-villösen und großen Adenomen. Mit der Identifikation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie APC und P53 mit daraus resultierendem Funktionsverlust oder aktivierenden Mutationen in Tumoronkogenen wie den Proteinen der RAS- und RAF-Familie, konnte hierbei auch auf zytogenetischer Ebene ein Entstehungsmodell konstruiert werden (Vogelstein et al. 1988).

Bei etwa 16% der Tumoren lässt sich eine Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Dabei zeigen sich Mutationen in DNA-Mismatch-Repair-Genen (hMSH2, hMLH1, hMLH3, hMSH6, hPMS2 und hPMS6). Durch einen Funktionsverlust in der DNA-Reparatur kommt es zu Replikationsfehlern und entsprechender Anhäufung von Mutationen, die letztlich zur Karzinogenese führen. Dieser Weg wird als Mikrosatelliteninstabilitäts-Signalweg beschrieben (Aaltonen et al. 1994; Schneider et al. 2013).

Hereditäre KRK, insbesondere das Lynch-Syndrom, sind ebenfalls durch eine hohe Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet. Vor allem lassen sich hier aber auch Keimbahnmutationen verantwortlich machen. Beschrieben wird dies durch das Modell der *Two-Hit-Hypothese* (Knudson 1971).

Die hereditären Prädispositionssyndrome sind durch eine Vielzahl unterschiedlicher Ausprägungen und Risikoprofile charakterisiert. Von großer Relevanz ist die Identifikation von gesunden Risikopatienten, treten die verschiedenen Entartungen doch häufig deutlich früher als die sporadischen KRK auf. Ziel ist das Ermöglichen eines frühzeitigen Screenings, um bereits anhand von Risikoläsionen und molekularpathologischen Markern zukünftige Therapieentscheidungen zeitgerecht planen zu können (Schmiegel et al. 2019).

Wichtigstes Screeninginstrument ist die Anamnese. Hierzu stehen mit den Amsterdam- und den revidierten Bethesda-Kriterien klinische Risikostratifizierungswerkzeuge zur Verfügung.

Aufgrund der Vielseitigkeit der Prädispositionssyndrome und des entsprechend unterschiedlichen Entartungsrisikos ist eine exakte Zuordnung von Läsionen und Risiken zu den Syndromen von enormer Bedeutung, um eine entsprechend risikoadaptierte Vorsorge anbieten zu können (Rodriguez-Bigas et al. 1997).

Durch die Molekulargenetik konnten Syndrom-spezifische Mutationen aufgezeigt werden, anhand derer eine Zuordnung möglich wird (Möslein 2016).

1.2. Klassifikation kolorektaler Karzinome

Die Klassifikation der KKR erfolgt anhand der von der Union internationale contre le cancer (UICC) veröffentlichten TNM-Klassifikation für solide Tumoren (Wittekind et al. 2020).

Tabelle 1. Veränderte Darstellung der UICC-Klassifikation (modifiziert nach Boczek (2017))

	Tis	T1	T2	T3	T4a	T4b	Jedes T	
							M1a	M1b
N0	0	I	I	IIA	II B	II C	IV A	IVB
N1	0	III A	III A	III B	III B	III C	IV A	IV B
N2a	0	III A	III B	III B	III C	III C	IV A	IV B
N2b	0	III B	III B	III C	III C	III C	IV A	IV B

1.3. Marker zur Prädiktion und Prognoseabschätzung in der Therapie der kolorektalen Karzinome

Durch molekulare Diagnostik und die Gensequenzierung konnten verschiedene prognostische und prädiktiver Marker und neue Ansatzpunkte für Therapien entschlüsselt und aufgezeigt werden. Bereits heute gilt die molekularpathologische Diagnostik vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien als wichtige Grundlage um eine Prognoseabschätzung zu ermöglichen und den Patienten die bestmögliche, der Tumorbiologie entsprechende, Therapie zukommen zu lassen. Neben der grundlegenden Untersuchung von Mutationsanalysen aus der Familie der RAS- und RAF-Proteine stellt ebenso die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität einen wichtigen wegweisenden Punkt in der Wahl der richtigen Therapie dar.

Weitere Ansätze finden sich auf dem Gebiet der Proteinexpressionsanalyse *Proteomics*, durch die es gelang Proteinexpression in den Tumoren zu analysieren und dadurch mögliche neue therapeutische Ansatzstellen und prädiktive Marker zu finden.

1.3.1. RAS und BRAF-Mutationen

Mutation in den RAS-Genen deuten auf eine schlechtere Prognose hin. Der Einsatz monoklonaler Anti-EGFR-Antikörper wie *Cetuximab* ist, im Falle von Mutationen des EGFR-Rezeptors, nicht erfolgsversprechend, da das aus den RAS-Genen codierte G-Protein vom Rezeptor entkoppelt, intrinsisch aktiv ist und eine Inhibition nicht mehr erfolgen kann (Stintzing et al. 2009).

Mutationen im BRAF-Gen finden sich vor allem in rechtsseitig lokalisierten Tumoren. Bei Vorliegen einer BRAF-Mutation ist die Prognose sehr schlecht und ein Ansprechen auf eine Therapie mit *Cetuximab* unwahrscheinlich. Entsprechend ist eine Ergänzung der Therapie unter Hinzunahme des Anti-VEGF-Antikörpers *Bevacizumab* bei Vorliegen einer KRAS-Mutation indiziert (Loupakis et al. 2014).

Mit *Encorafenib* ist darüber hinaus seit 2020 ein selektiver BRAF-Inhibitor zugelassen, welcher bei Vorliegen einer BRAF-Mutation in Kombination mit *Cetuximab* angewendet werden kann und für den Studien vielversprechende Ergebnisse zeigen (Kopetz et al. 2019).

1.3.2. EGFR-Rezeptorproteine

In Anbetracht der Bedeutung der EGFR-Rezeptoren in der heutigen Therapie mit zielgerichteten Substanzen, könnten die Expressionsstärken der Proteine aus der Familie der EGFR-Rezeptorproteine EGFR, ERBB2 (HER-2/neu) und ERBB3 (HER3) in Abhängigkeit von Tumorstadium und Lokalisation als wichtige Schlüsselstelle hinsichtlich Prädiktion und therapeutischem Nutzen in Frage kommen (Loree et al. 2018). Die EGFR-Rezeptoren EGFR, HER-2/neu und HER3 gelten dabei als wichtige *Targets* von diversen Wirkstoffen. *Cetuximab* als monoklonaler Antikörper gegen den EGFR-Rezeptor wird in der Leitlinie zur Therapie des metastasierten KRK seit langem angewandt, während mit *Trastuzumab* und *Pertuzumab* ebenfalls zwei selektive Inhibitoren des ERBB2-Rezeptors in Form von monoklonalen Antikörpern in der Therapie des Mamma- und inzwischen auch des Magenkarzinoms zur Verfügung stehen und deren Anwendung auch im metastasierten KRK in klinischen Studien geprüft wird (Okamoto et al. 2021). *Trastuzumab-Emtasin* als Konjugat aus monoklonalem EGFR-Antikörper und *Emtasin* (T-DM1) sowie *Afatinib* als Inhibitor der Rezeptor EGFR, HER-2/neu und ERBB4 sowie *Lapatinib* als dualer Inhibitor von EGFR und HER-2/neu stellen weitere Wirkstoffe zur Inhibition der EGFR-Rezeptoren dar (Conradi et al. 2019).

1.3.3. Mikrosatelliteninstabilität

In KRK lassen sich oftmals Längenabweichungen in einfach repetitiven DNA-Sequenzen nachweisen. Diese als Mikrosatelliteninstabilität bezeichneten Ausfälle von DNA-*Mismatch-Repair* Genen (*MMR*) basieren auf einem mutations- und methylierungsbedingtem Funktionsausfall, welcher in der Folge zu einer stark erhöhten Mutationsfrequenz führt. Unterschieden wird anhand der Anzahl der vorliegenden Mutationen zwischen *high-grade* Mikrosatelliteninstabilität (*MSI-H*) bei Mutationen in mindestens 2 Genen, einer *low-grade* Mikrosatelliteninstabilität (*MSI-L*) bei Mutation in nur einem Gen und der Mikrosatellitenstabilität (*MSS*) bei fehlendem Nachweis von Mutationen (Dietmaier 2010).

Der Mikrosatelliteninstabilität kommt neben der Funktion als prädispositiver Biomarker hinsichtlich des Lynch-Syndroms, ebenfalls eine Rolle als prädiktiver und prognostischer Marker zu (Klingbiel und Tejpar 2016).

Zum Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Das Standardverfahren stellt die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) mit nachfolgender Fragmentlängenbestimmung dar. Alternativ kommt ebenfalls die Real-Time-*PCR* mit anschließender Denaturierungsprofilanalyse zur Anwendung.

Auch das *Next-Generation-Sequencing* (*NGS*) kommt inzwischen vermehrt zum Einsatz. Besonders ist hierbei, dass neben der Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse eine umfassende Mutationsanalyse und die Untersuchung des *Tumor-Mutational-Burden* (*TMB*) erfolgen kann (Dietmaier et al. 2019).

In etwa 15% aller KRK lässt sich eine erhöhte Mikrosatelliteninstabilität nachweisen. Die Ursache liegt in den meisten Fällen in einer Promotormethylierung des *MLH1*-Gens, oftmals assoziiert mit einer Mutation im *BRAF(V600E)*-Gen (Lo et al. 2016).

Patienten in den *UICC* Stadien I und II profitieren insbesondere bei Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität nicht von einer systemischen Therapie, während umgekehrt im Stadium III eine vorliegende *MSI-H* bei *BRAF*-Mutationen ein ungünstiger Prognosefaktor ist (Kraeft et al. 2021). *MSI*-Tumoren sind häufig nicht metastasiert und umgekehrt liegt nur in ca. 5% der Fälle von fernmetastasierten Tumoren des Stadiums IV eine Mikrosatelliteninstabilität vor (Copija et al. 2017).

Metaanalysen zeigen, dass besonders das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität im Stadium IV mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Im Stadium IV gilt eine *BRAF*-Mutation ebenfalls unabhängig vom Mikrosatellitenstatus als ungünstiger Prognosefaktor (Lo et al. 2016). Zur Prognosebeurteilung wird zunächst der *BRAF*-Mutationsstatus betrachtet und folgend die Mikrosatelliteninstabilität untersucht.

Prädiktiven Wert hat der Mikrosatellitenstatus bei der Therapie mit PD1-Checkpoint-Inhibitoren wie *Pembrolizumab*, *Nivolumab* und *Ipilimumab* hinsichtlich des *Progression-Free-Survivals* (PFS) und *Overall-Survivals* (OS). *Pembrolizumab* als PD-1-Antikörper blockiert den PD-1-Rezeptor und unterbindet die Interaktion des Rezeptors mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 (André et al. 2020).

Studien weisen darauf hin, dass Patienten mit einem fortgeschrittenen KRK und Mikrosatelliteninstabilität eine Responserate von 71% bei der Anwendung von *Pembrolizumab*, unabhängig von der Tumorlokalisation, zeigen (Kurreck et al. 2021).

Einen prädiktiven Wert hat die Mikrosatelliteninstabilität in der Betrachtung der Therapie mit 5-FU (Klingbiel und Tejpar 2016). So scheinen MSI-Tumoren häufig resistent gegenüber einer 5-FU-Therapie, auch wenn die Datenlage hierzu bisher keine eindeutigen Schlüsse zulässt (Aggarwal et al. 2021).

1.3.4. Bedeutung der Glykolyse im kolorektalen Karzinom

Einen weiteren Ansatzpunkt für mögliche neue prognostische und therapeutisch relevante Marker, stellen, neben den voran beschriebenen molekularpathologischen Biomarkern, die metabolischen Proteine der Glykolyse dar. Otto Warburg beschrieb 1924 den später nach ihm benannten Effekt, dass Tumore, im Gegensatz zu gesunden Zellen, eine dauerhaft erhöhte Aktivität der anaeroben Glykolyse auch in Anwesenheit von Sauerstoff aufweisen. Die erhöhte Expression der metabolischen Enzyme lässt diese als Ansatzstelle für neue Therapieoptionen erscheinen (Potter et al. 2016).

Durch die Arbeiten im Rahmen des *Human Genome Projects* und infolge des *The Cancer Genome Atlas Networks* (TCGA) konnten anhand von Gensequenzierungen potenzielle *Tumor-Driver*-Gene identifiziert werden und 2012 in einer Übersichtsarbeit molekularpathologische Charakteristika des KRK dargestellt werden (The Cancer Genome Atlas 2012).

Einer Arbeitsgruppe um Zhu et al. gelang es, fünf Glykolyse-assoziierte Gene als prognostische Marker und potenzielle therapeutische Zielstrukturen darzustellen (Zhu et al. 2021).

Analog zum Nachweis der erhöhten Expression von Genen der Glykolyse, können, durch die Fortschritte im Bereich der Proteomanalyse, heute gezielt die Expressionen von Proteinen aus der Glykolyse in Tumoren und die Bedeutung der Proteine für den Tumormetabolismus und damit die prognostische Relevanz untersucht werden (Zhang et al. 2014).

Vasaikar et. Al beschrieben 2019 *Colon-Cancer-Associated Proteins and Phosphosites*, Proteine, die typischerweise eine erhöhte Expression in KRK zeigen sowie verstärkte Phosphorylierungen von Proteinen aufweisen. So konnte beispielsweise eine erhöhte Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) nachgewiesen werden, welches zu einer erhöhten Proliferation von

Rb in Kolonkarzinomen führen könnte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass in Tumoren mit hoher Mikrosatelliteninstabilität eine verminderte CD8-T-Zell-Infiltration und im Gegenzug dazu eine erhöhte Expression von Glykolyseproteinen nachweisbar ist, was die Glykolyse ebenfalls als Ansatzpunkt neuer Therapieoptionen weiter in den Fokus rückt (Vasaikar et al. 2019).

1.4. Prinzipien der Therapie des Kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des Kolonkarzinoms ist stadienabhängig und erfolgt in Deutschland basierend auf der S-3-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und der deutschen Krebshilfe.

Sie besteht aus einem multimodalen und interdisziplinären Behandlungskonzept und umfasst die Resektion und eine (neo-)adjuvante systemische Therapie unter Berücksichtigung des Tumorstadiums und des Gesundheitszustandes des Patienten. Insbesondere der Allgemeinzustand, das Alter und mögliche Vorerkrankungen des Patienten gewinnen in der Wahl der Therapie an Bedeutung und beeinflussen damit die Therapie aufgrund einer Risiko-Nutzen-Abwägung (André et al. 2015).

1.4.1. Resektion

Primäres Ziel der Therapie des Kolonkarzinoms ist die R0-Resektion. Die weitergehende Therapie bedarf der postoperativen pathologischen Aufarbeitung des Präparates und der entnommenen Lymphknoten. In Abhängigkeit des UICC-Stadiums folgt ggfs. eine adjuvante Therapie (Gröne 2016; Schmiegel et al. 2019).

Mit der zunehmenden Standardisierung der operativen Therapien in Kombination mit den etablierten Systemtherapien konnten in den vergangenen 20 Jahren deutlich prognoseverbessernde Ergebnisse erzielt werden.

Operativ kommt klassischerweise die En-Bloc-Resektion mit systematischer regionärer Lymphadenektomie zur Anwendung. Da die lymphogene Metastasierung über die parakolischen Lymphknoten und die Lymphknoten an den Stammarterien erfolgt, kann eine sichere En-Bloc-Resektion, bei Berücksichtigung einer vollständigen Mitentnahme des Mesokolons, gewährleistet werden (West et al. 2010).

Eine Sentinel-Lymphadenektomie wird aufgrund uneinheitlicher Studienlage nicht empfohlen. Als Qualitätskriterium fordert die aktuelle S3-Leitlinie die Entfernung von 12 oder mehr Lymphknoten (Caplin et al. 1998; Schmiegel et al. 2019).

Um eine mögliche Tumorzell dissemination und damit ein erhöhtes Rezidivrisiko zu vermeiden, wurde die Technik der *Complete Mesocolic Excision* (CME) entwickelt (Hohenberger et al. 2009).

Hierbei erfolgt die Präparation unter Schonung der mesokolischen Faszienblätter entlang der embryonalen Schichten. Gleichzeitig kann eine maximale Radikalität hinsichtlich der Lymphknotenausbeute erzielt werden (Abdelkhalek et al. 2018).

Wie Studien in den vergangenen Jahrzehnten gezeigt haben, sind die Ergebnisse eines minimalinvasiven Vorgehens mit der offenen Chirurgie gleichwertig. Die perioperativen Ergebnisse, wie frühzeitiger Kostaufbau und ein kürzerer stationärer Aufenthalt, sogar der konventionellen Chirurgie überlegen (von Heesen und Ghadimi 2021).

1.4.2. Chemotherapie

Ab dem UICC II Stadium wird bei Vorliegen von Risikofaktoren, wie einem T4-Tumorstadium, einer Tumorperforation, einer Operation unter Notfallbedingungen oder einer zu geringen Anzahl untersuchter Lymphknoten, eine adjuvante Therapie empfohlen.

Die Chemotherapieregime basieren auf einer Therapie mit *5-Fluoruracil* (5-FU) und *Oxaliplatin* in Kombination mit Folsäure (Schmiegel et al. 2019).

Während diese im Stadium II adjuvant fakultativ bei Vorliegen von Risikofaktoren und MSS-Tumoren erfolgt, ist sie in den Stadien III und IV obligat und wird neoadjuvant angewandt, im Stadium IV mit dem primären Ziel, die vollständige Resektabilität von primär nicht resektablen Leber- und Lungenmetastasen zu ermöglichen (Gröne 2016).

1.5. Tumorstadien-adaptierte Therapie des Kolonkarzinoms

1.5.1. Lokal begrenztes Kolonkarzinom UICC I-II

Das lokal begrenzte Kolonkarzinom umfasst die UICC-Stadien I und II. Der Tumor befindet sich hierbei im Stadium T1 bis T4, eine Nodal- und Fernmetastasierung ist ausgeschlossen.

Nach R0-Resektion kann im UICC-Stadium I auf eine adjuvante Therapie verzichtet werden. Ab UICC-Stadium II ist bei einem Vorliegen von Risikofaktoren eine Chemotherapie mit Fluoropyrimidinen in Erwägung zu ziehen (Schmiegel et al. 2019).

Die MOSAIC-Studie zeigte, dass eine adjuvante Chemotherapie im Stadium II mit *5-FU* und *Oxaliplatin* nicht zu einer verbesserten Prognose führte (André et al. 2015).

Umgekehrt gilt jedoch, dass gegebenenfalls bei fraglicher Indikation für eine adjuvante Therapie eine Analyse des Mikrosatellitenstatus durchgeführt werden sollte, da Patienten mit Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität nicht von einer adjuvanten Therapie profitieren und entsprechend diese nicht durchgeführt werden sollte (Ribic et al. 2003).

1.5.2. Lokal fortgeschrittenes Kolonkarzinom UICC III

Mit dem Nachweis einer lymphatischen Metastasierung ist auch bei R0-Resektion die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie gegeben.

Standardtherapie ist seit der Veröffentlichung der MOSAIC-Studie 2004 die Kombination von *5-Fluorouracil* und *Oxaliplatin*. Die Studie zeigte einen deutlichen Vorteil hinsichtlich des OS durch Hinzunahme von *Oxaliplatin* (André et al. 2015; Dienstmann et al. 2015).

Aufgrund der ausgeprägten Neurotoxizität des *Oxaliplatin*s, ist eine Anwendung nach aktueller Leitlinie jedoch gut abzuwägen. Bei Patienten jenseits des 70. Lebensjahres ist auf *Oxaliplatin* zu verzichten, da retrospektive Analysen der MOSAIC-Studie und die NSABP C-07-Studie keinen Vorteil in diesem Alterskollektiv zeigen konnten.

Bei Kontraindikationen gegen eine *Oxaliplatin*-haltige Therapie ist eine orale Fluoropyrimidin-Monotherapie (*Capecetabine*) anzustreben (Kraeft et al. 2021).

1.5.3. Fernmetastasiertes Kolonkarzinom UICC IV

Im Stadium des metastasierten KRK richtet sich die Therapie nach dem Ausmaß der Metastasierung, ob die Metastasierung synchron oder metachron erfolgt, nach dem Zustand des Patienten hinsichtlich einer intensivierten Therapiefähigkeit sowie nach der Tumorbiologie (Ettrich und Seufferlein 2016; Kurreck et al. 2021).

Ist die Erkrankung primär resektabel, so ist ein chirurgisches Vorgehen zu wählen und auf eine neoadjuvante Therapie zu verzichten. Erscheint die Erkrankung primär irresektabel (jedoch potenziell resektabel) ist eine neoadjuvante Therapie mit dem Ziel der sekundären Resektabilität zu wählen oder andernfalls, bei per se nicht-resektablen Tumoren, bleibt sie die einzige verbleibende therapeutische Option.

Die Therapieempfehlungen richten sich hierbei nach der molekularpathologischen Diagnostik, da sich die Therapiekonzepte in Abhängigkeit von Lokalisation und molekularem Status stark unterscheiden und der Nutzen der intensiven, teuren und toxischen Therapien gut abgewogen werden muss.

1.6. Personalisierung der onkologischen Therapie des metastasierten Kolorektalen Karzinoms unter Berücksichtigung zielgerichteter Therapien

Betrachtet man die Stadien-abhängigen Therapiekonzepte, so fällt auf, dass sich diese neben der reinen Tumorbiologie vor allem auch am Allgemein- und Gesundheitsstatus des Patienten orientieren. Abzuwägen ist neben der Frage von welchem Therapiekonzept der Patient

profitiert, die Frage welche Therapie welche Nebenwirkungen und Einschränkungen mit sich bringt, ob der Patient eine intensiviertere Therapie vertragen kann und wann die unerwünschten Wirkungen der Therapie den Nutzen überwiegen. Durch die Etablierung molekularpathologischer Diagnostik und Gensequenzierung konnten neue Ansatzstellen als Zielstrukturen für den Einsatz zielgerichteter Therapien identifiziert werden.

Beim metastasierten Kolorektalen Karzinom sollte vor Beginn der Erstlinientherapie neben der Tumorlokalisation der BRAF- und RAS-Mutationsstatus sowie die Mikrosatellitenstabilität untersucht und einbezogen werden (Dienstmann et al. 2015; Guinney et al. 2015).

In diesem Stadium erlangen vor allem die Therapien mit monoklonalen Antikörpern gegen Tyrosinkinaserzeptoren aus den Familien der EGFR- und VEGF-Rezeptoren eine große Bedeutung und finden eine breite Anwendung in Kombination mit den konventionellen Chemotherapeutika.

Liegt RAS im Wildtyp vor, so ist eine Therapie mit Anti-EGFR Substanzen wie *Cetuximab* und *Panitumumab* in Erwägung zu ziehen. Umgekehrt ist ein Ansprechen der Therapie mit diesen Substanzen bei mutiertem RAS-Protein nicht erfolgsversprechend, anstelle dessen ist eine Therapie mit *Bevacizumab* indiziert (Ettrich und Seufferlein 2016).

Ein mutiertes BRAF-Protein wird mit einer schlechten Prognose und einer Therapieresistenz gegen anti-EGFR-Substanzen assoziiert. Stattdessen ist in diesem Fall eine Therapie mit der anti-VEGF-Substanz *Bevacizumab* indiziert. (Kurreck et al. 2021) Ebenfalls ist die Therapie mit BRAF-Inhibitoren wie *Vemurafenib* und *Dabrafenib* in Erwägung zu ziehen. Insbesondere in Kombination mit *Irinotecan* und *Cetuximab* zeigt sich eine Verbesserung des PFS (Kopetz et al. 2021).

Durch Anwendung von Immuntherapien mit Checkpointinhibitoren wie *Pembrolizumab* konnten ebenfalls deutliche Verbesserungen hinsichtlich des PFS bei Patienten mit hoher Mikrosatelliteninstabilität erzielt werden (André et al. 2020; Ettrich und Seufferlein 2016).

Neben dem UICC-Stadium und der Molekularpathologie ist die Prognose und Therapie abhängig von der Lokalisation des Tumors. Rechtsseitig gelegene Kolonkarzinome sind häufiger mit einer BRAF-Mutation und einer schlechteren Prognose assoziiert.

Im Falle eines mutierten BRAF-Rezeptors kommt die Anwendung einer Chemotherapeutriplette wie FOLFOXIRI ergänzt um eine *Targeted Therapy* mit *Bevacizumab* zum Einsatz (Loupakis et al. 2014).

1.7. Cancer Scout

Angesichts der Notwendigkeit die molekularpathologische Diagnostik ökonomisch in der breiten Anwendung zu etablieren, rückt die Nutzung künstlicher Intelligenz immer mehr in den Blickpunkt. Der Bundesverband Deutscher Pathologen e.V. hat entsprechend 2018 einen Leitfaden zur Digitalen Pathologie veröffentlicht. (Haroske et al. 2018)

In der klassischerweise analogen Pathologie halten vermehrt digitale Verfahren und nachfolgend die Anwendung künstlicher Intelligenz (KI) und maschinellen Lernens (ML) Einzug. Auch wenn randomisierte Studien hierzu noch ausstehend sind, so liefern erste *Proof-of-Concept*-Arbeiten vielversprechende Ergebnisse und zeigen mitunter eine Gleichwertigkeit bis Überlegenheit digital-assistierter Vorgehen im Vergleich zur analogen, rein untersucher-abhängigen, Pathologie. (Forsch et al. 2021)

Vor dem Hintergrund, dass Tumore gleichartige Zell- und Molekularmuster aufweisen, scheint eine automatisierte Analyse und Detektion der Biomarker hinsichtlich eines prognostischen und prädiktiven Nutzens vielversprechend.

Die Arbeiten an dieser Dissertation erfolgen im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungsprojektes *Cancer Scout (UMG 2020)*.

Dieses Forschungsprojekt wird durch das Institut für Pathologie der Georg-August-Universität Göttingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Philipp Ströbel sowie Siemens Healthineers (*Erlangen*) geführt.

Es widmet sich der Fragestellung, wie eine Anwendung von künstlicher Intelligenz die molekularpathologische Diagnostik schnell und kostengünstig verfügbar machen kann, um betroffenen Patienten zeitnah neue spezifische Therapieoptionen anbieten zu können.

Hierzu wurden 1000 Tumorpräparate kolorektaler Karzinome des Institutes identifiziert und zur weiteren Aufarbeitung an das kooperierende Unternehmen *Biognosys (Schlieren, Schweiz)* gesandt, welches dann eine Gensequenzierung und Proteomics-Analyse durchführte.

Ziel ist die Erstellung eines digitalen Scans der molekularpathologischen Raster des Präparats und nachfolgend der Abgleich mit den bereits ermittelten Rastern der Datenbank. Aufgrund dieser Rasteranalyse soll der Tumor in molekulare Subgruppen unterteilt und daraus resultierend möglicherweise eine Empfehlung für eine spezifische Therapie ausgesprochen werden können. Aus den gewonnenen Datensätzen wird eine Datenbank mit Vergleichsmustern als Grundlage für eine zukünftige, automatisierte Analytik anhand der Morphologie erstellt.

1.8. Zielsetzung und Fragestellung

Von den 1000 primären Patienten konnten, nach Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien, die Daten von 697 Patienten hinsichtlich der klinikopathologischen Parameter zum Operationszeitpunkt untersucht und zu definierten Zeitpunkten in einem *Follow-Up* erhoben und ausgewertet werden. Durch das Erstellen eines großen monozentrischen Datensatzes aus klinikopathologischen Parametern und *Follow-Up*-Daten konnten gezielt die Zeiträume 2000-2010 und 2010-2020 untersucht und dabei betrachtet werden, wie sich das Patientenkollektiv zusammensetzte und ob es signifikante Unterschiede im Vergleich zur Literatur gab.

Die stetigen Erfolge in der Verbesserung von Diagnostik und Therapieoptionen haben in den vergangenen Jahrzehnten zu einer deutlich früheren Diagnostik der Tumore und zu einer starken Prognoseverbesserung geführt. Ein Effekt der bei der Betrachtung der weltweiten Zahlen zu Inzidenz und Mortalität sowie den Veränderungen des *DFS* und *OS* reflektiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit soll dargestellt werden, wie sich die Verteilung der klinikopathologischen Parameter im an der UMG operierten Patientenkollektiv zusammengesetzt hat, wie diese Parameter mit dem *DFS* und *OS* korrelieren und ob sich die erhobenen Werte im Vergleich der Jahrzehnte untereinander (2000-2010 versus 2010-2020) signifikant verändert haben.

Die Differenz zwischen der Anzahl der im Rahmen des *Cancer-Scout*-Projektes analysierten Präparate und der im *Follow-Up* betrachteten 697 Patienten erklärt sich dadurch, dass für das *Follow-Up* lediglich Patienten inkludiert wurden, welche an der UMG operiert und behandelt wurden. Die Präparate, die von externen Kliniken eingesandt wurden, wurden aus dem *Follow-Up* ausgeschlossen. Diese Vorgehensweise ermöglichte es einen validen monozentrischen Datensatz, bestehend aus den umfassenden vorliegenden diagnostischen und therapeutischen Daten und Befunde der an der UMG operierten Patienten erstellen zu können.

Durch die im Rahmen des *Cancer Scout* Projektes ermöglichten Proteinexpressionsanalysen im Sinne eines *Whole Proteome Profiling* durch *Untargeted Proteomics* von 1000 KRK-Tumoren konnte ein großer Datensatz generiert werden. Durch die Identifizierung aller in den Tumoren nachweisbarer Proteine, der anschließenden Quantifizierung dieser und damit der Darstellung der Proteinexpressionsstärken, konnte ein neuartiger und umfassender Datensatz an Proteinexpressionen gewonnen werden der in Folge mit den klinikopathologischen Parametern und den *Follow-Up*-Daten des untersuchten Kollektivs in Form einer Überlebenszeitanalyse ausgewertet wurde, um Aufzuzeigen ob und wie die Überlebenszeit mit verschiedenen Proteinexpressionsmustern korreliert.

Vor dem Hintergrund der, durch den Warburg-Effekt beschriebenen, erhöhten Aktivität der anaeroben Glykolyse stellt sich die Frage, ob in kolorektalen Karzinomen eine vermehrte

Expression von Proteinen der Glykolyse als Therapieziel nachweisbar ist und wie stark die Expressionsstärke mit Tumorstadium und Lokalisation korreliert. Gleiches erfolgte durch die Analyse der EGFR-Rezeptorproteine. Folgend wurden das untersuchte Kollektiv hinsichtlich der Proteinexpressionen der Glykolyse- und der EGFR-Rezeptorproteine betrachtet und zum einen hinsichtlich der Expressionsstärken in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter sowie zum anderen hinsichtlich der Überlebenszeit analysiert.

2. Patientenkohorte, Material und Methodik

2.1. Patientenkollektiv

Das gesamte Kollektiv setzte sich aus insgesamt 2680 Präparaten zusammen, deren Tumorpräparate im Institut für Pathologie eingingen. Nach Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien des Institutes wurden 1000 Präparate, die im Zeitraum 2000 bis 2020 untersucht wurden, für die weitere Analytik im Rahmen des *Cancer-Scout*-Projektes festgelegt. Die Einwilligung der Patienten zur Verwendung der Daten wurde zum Zeitpunkt der Operation eingeholt. Zur Erstellung eines vollständigen Datensatzes wurde alle Patienten eingeschlossen, die an der UMG operiert wurden, so dass 303 Patienten für die weitere Untersuchung in dieser Arbeit ausgeschlossen wurden.

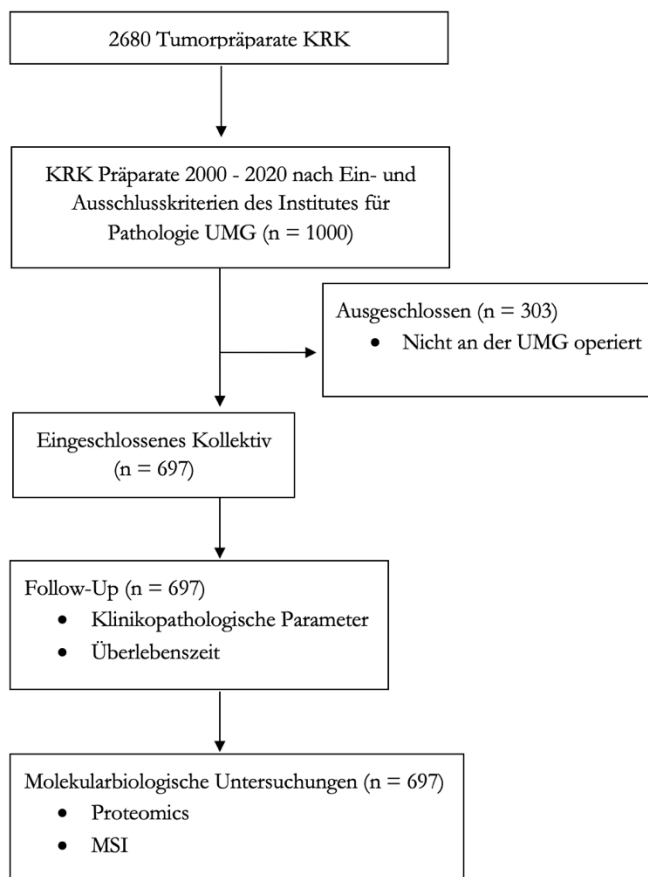


Abbildung 1. Untersuchtes Patientenkollektiv, Ein- und Ausschlusskriterien sowie erhobene Parameter

So konnten Daten der an der UMG operierten Patienten erhoben werden, die die klinikopathologischen Parameter zum Operationszeitpunkt für 697 Patienten umfassten und, welche durch das *Follow-Up* ergänzt wurden und mittels Überlebenszeitanalysen weiter ausgewertet wurden.

Eingeschlossen wurden Patienten mit primärem Adenokarzinom des Colons ($n = 560$) sowie mit nicht vorbehandelten Rektumkarzinomen ($n = 137$) jedes Tumorstadiums. Es sind

ausschließlich Operationsresektate betrachtet worden. Probenbiopsien (i. e. abgetragene Polypen, Biopsien) wurden ausgeschlossen.

Nach der Identifizierung der Fälle, wurden diese in einer *SecuTrial*®-Datenbank erfasst und mittels einer elektronischen Datenbankmaske alle relevanten Parameter sowie das klinische *Follow-Up* erfasst.

Die Datenerfassung erfolgte durch die Dokumentation aus der Patientenakte. Die Vervollständigung der Datensätze der Patienten hinsichtlich des Überlebens erfolgte durch Nachsorgeuntersuchungen an der UMG oder durch telefonische Kontaktaufnahme zu den behandelnden Haus- und Fachärzten.

2.2. Einverständnis und Ethikvotum

Für die Durchführung der Analysen in der vorliegenden Arbeit erging ein positives Votum der Ethikkommission Göttingen (Nummer: 24/4/20). Das Einverständnis zur Datenerhebung und Auswertung erfolgte durch die Patienten im Rahmen des Therapieaufenthaltes. Die erstellten Datensätze sind anonymisiert erfasst.

2.3. Datenerfassung in SecuTrial ®

Die erhobenen Daten wurden in das *Good-Clinical-Practice*-konforme Datenbanksystem *SecuTrial*® übertragen (Wright et al. 2020). *SecuTrial*® ist eine webbasierte elektronische Datenerfassungssoftware (EDC) des Herstellers *InterActive Systems* und bietet die Möglichkeit zur Erfassung von Patientendaten mittels elektronischer Erhebungsbögen (*Electronic Case Report Form eCRF*). Dies ermöglicht die standardisierte Datenerfassung.

2.4. Follow-Up-Erhebung

Das *Follow-Up* erstreckte sich über den Zeitraum von 2000 bis 2020, die Datenerhebung fand im Zeitraum April 2020 bis Januar 2021 statt und erfolgte durch die Nachsorgedokumentation in der UMG sowie telefonisch durch Kontaktaufnahme zu den behandelnden niedergelassenen Ärzten. Der Austausch von Befunden erfolgte per Fax. Zur Dokumentation der erhobenen Daten, wurden diese digital mittels der *SecuTrial*®-Software in einer Datenbank erfasst.

Zunächst erfolgte die Erfassung der klinikopathologischen Parameter zum Operationszeitpunkt. Die 697 Patienten wurden nachfolgend einem systematischen *Follow-Up* unterzogen, mit dem Ziel, in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter, das Überleben, das Auftreten von Fernmetastasen und von Lokalrezidiven darzustellen und damit das krankheitsfreie Überleben (*Disease-Free-Survival DFS*), das tumorspezifische Gesamtüberleben

(*Cancer-Specific-Survival* CSS) und das Gesamtüberleben (*Overall-Survival* OS) zu untersuchen. Hierbei beschreibt das *DFS* den Zeitraum nach Durchführung einer Therapie ohne das Auftreten eines Progresses, Rezidives oder einer Metastasierung. Das CSS beschreibt den Zeitraum von der Diagnosestellung bis zum Eintritt des Todes aufgrund des Karzinoms. Das OS beschreibt den Zeitraum von der Diagnosestellung bis zum diagnoseunabhängigen Tod des Patienten (Ulm 2011).

Patienten wurden als *tumorfrei* klassifiziert, wenn diese mindestens 10 Jahre ohne Nachweis eines Lokalrezidives oder einer Fernmetastasierung überlebten bzw., wenn zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung kein Rezidiv nachzuweisen war. Die letzte Nachsorge durfte zum Zeitpunkt der *Follow-Up*-Erhebung maximal 6 Monate zurückliegen. Patienten, die zum Zeitpunkt der letzten Betrachtung noch leben, wurden zensiert.

2.5. Proteomics-Analyse

Durch das Institut für Pathologie wurden insgesamt 1000 Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeproben von Resektaten kolorektaler Karzinome an das Schweizer Unternehmen *Biognosys* (Schlieren) gesandt. *Biognosys* führte dann als Auftragsarbeit die Detektion und Quantifizierung aller nachweisbaren Proteine (*Untargeted proteomics*) in den Tumorpräparaten durch. Hierzu wurden die Präparate zunächst nach einem etablierten Protokoll aufbereitet und anschließend zur *Untargeted-Proteomics*-Analyse der *Hyper Reaction Monitoring*-Massenspektrometrie zugeführt (Piazza et al. 2020).

Durch die Analyse konnten 8602 Proteine, 109.190 Peptide und 192.248 Peptideisenvarianten detektiert und 7611 Proteine, 99.822 Peptide und 179.949 Peptideisenvarianten quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinexpression der metabolischen Enzyme der Glykolyse und der EGFR-Rezeptorproteine von 697 Patienten näher betrachtet. Vor dem Hintergrund der Fragestellung ob sich die Proteine aus der EGFR-Familie oder die Glykolyse als Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie nutzen lassen, erfolgte die Analyse in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter und hinsichtlich des *DFS* und *OS*. Die metabolischen Enzyme der Glykolyse, die durch die *Proteomics*-Analysen identifiziert wurden, umfassen 18 Proteine, während 3 Proteine der EGFR-Rezeptorfamilie analysiert wurden.

2.6. Statistische Methodik

Für die statistische Analyse wurden vor allem die bivariate Korrelationsanalyse, Regressionsanalysen, Cramers-V, Mann-Whitney-U- und Pearsons Square-Test verwendet. Zur Darstellung der Daten wurden unterschiedliche Modelle genutzt. Folgend werden

Histogramme, Überlebenszeitdiagramme, Balkendiagramme und Tortendiagramme erläutert und dargestellt.

2.6.1. Variablen der klinikopathologischen Parameter

Der zur Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Datensatz enthält drei Arten von Variablen. Nominale Variablen sind solche, die in keine logische Reihenfolge gebracht werden können. Ein Beispiel für eine nominale Variable stellt das Geschlecht dar. Die Werte in nominalen Variablen stellen Merkmalsausprägungen dar, welche keinen Zusammenhang zu den Alternativwerten haben.

Bei ordinalen Variablen ist die Bildung einer Rangfolge möglich, jedoch nur qualitativ und nicht quantitativ. Als Beispiel hierfür sei der Nodalstatus (pN-Status) angeführt: N1 (1-3 LK befallen) und N2 (>3 LK befallen) unterscheiden sich in der Menge der befallenen Lymphknoten untereinander und auch von N0 (keine befallenen LK), es lässt sich anhand der Werte jedoch nicht sagen wie viel mehr oder weniger Lymphknoten befallen sind. Dies ist jedoch möglich in den Rohdaten für den pN-Status, wenn man die Anzahl der befallenen Lymphknoten angibt. Entsprechend stellt dies eine metrische Variable dar, da jeder Wert eine klar definierte Differenz zu jedem anderen Wert hat (Kromrey 2002).

2.6.2. Box-Plot-Diagramme

Für die Veranschaulichung der Verteilung einer Variablen im Datensatz einzeln oder in Abhängigkeit zu einer weiteren Variablen, eignen sich besonders gut Box-Plot-Diagramme. Diese tragen auf der x-Achse eine nominale oder ordinale Variable mit all ihren Ausprägungen auf; auf der y-Achse eine metrische Variable. Für jede Merkmalsausprägung werden fünf spezielle Punkte angezeigt. Durch eine Strichmarkierung in der Mitte der Box wird der Median angezeigt. Dies ist der $n/2$ 'te Wert, wenn alle Werte der Größe nach sortiert werden. Nach oben und unten wird die Box durch zwei weitere Linien begrenzt, die oberen und unteren Quartilslinien. Die entstandene Box gibt an, in welchem Bereich 50% aller vorkommenden Werte liegen. Die oberen und unteren Linien werden als *Whisker* bezeichnet. Diese bilden die Grenzen des Intervalls. Per definitionem soll die Spannweite des „Whiskers“ nicht mehr als das 1,5fache des Interquartilsabstands betragen. Alle Werte, die folglich außerhalb des „Whiskers“ liegen sind als Ausreißer zu betrachten. Die Ausreißer werden durch zwei verschiedene Symbole dargestellt, ein Kreis symbolisiert einen kleinen Ausreißer; ein Stern einen starken Ausreißer. Ist ein Box-Plot allgemein symmetrisch aufgebaut und hat wenig Ausreißer, so kann auf eine Normalverteilung geschlossen werden. Die Lage des Medians innerhalb der Box spiegelt eine Links- oder Rechtsverschiebung der Datenwerte wider (Williamson et al. 1989).

2.6.3. Häufigkeitstabellen

Häufigkeitstabellen sind ein Instrument für die Auswertung von nominalen und ordinalen Variablen. Für jedes Ausprägungsmerkmal wird entweder die Häufigkeit oder die relative Häufigkeit angegeben. Zur Darstellung von nominalen oder ordinalen Variablen eignen sich Balkendiagramme, da eine nominale Variable oder eine ordinale Variable meist nur eine begrenzte Anzahl von Merkmalsausprägungen enthält. Ein Beispiel stellt das Geschlecht des Patienten dar.

Für metrische Variablen sind weder Häufigkeitstabellen noch Balkendiagramme empfehlenswert, da definitionsgemäß sehr viele Merkmalsausprägungen vorliegen.

Stattdessen kommen hierzu Histogramme zur Anwendung. Bei Histogrammen erhält man zudem stets eine Aussage über die Normalverteilungstendenz. Typische metrische Variablen sind zum Beispiel das Alter der Patienten oder auch das *DFS* (Kohn und Öztürk 2017).

2.6.4. Kreuztabellen

Ein häufig angewandtes Mittel sind Kreuztabellen, oder auch Kontingenztafeln. Hier werden Merkmalsausprägungen unterschiedlicher Variablen gemeinsam analysiert. Eine Zählung in einer Kreuztabelle bedeutet, dass der ‚Fall‘ bzw. der Patient zwei oder mehr bestimmte Merkmalsausprägungen enthält. So lässt sich aus einer Kreuztabelle beispielsweise leicht ablesen, bei wie vielen weiblichen Patienten der Kohorte ein Rektumkarzinom vorlag. In Kreuztabellen können metrische Variablen aufgrund der vielen unterschiedlichen Werte nur bedingt verwendet werden. Für metrische Variablen bezieht man zumeist den Mittelwert, Median, die Standardabweichung sowie die Extreme in eine Kreuztabelle mit ein. Ziel von Kreuztabellen ist es, einen Gesamtüberblick über den vorhandenen Datensatz zu erhalten. Zudem lassen sich erste Zusammenhänge zwischen bestimmten Variablen ablesen, da nicht nur absolute, sondern auch relative Häufigkeiten (Prozentwerte) angezeigt werden können (Kuckartz et al. 2010).

2.6.5. Korrelationsanalysen (Bivariat)

Um statistische Zusammenhänge zwischen zwei Variablen zu identifizieren kommen, je nach Typ der Variablen, unterschiedliche Instrumente zum Einsatz. So kann bei zwei mindestens ordinalen, besser, aber metrischen Variablen, eine bivariate Korrelationsanalyse vorgenommen werden. Bei dieser Methode wird ein Korrelationskoeffizient berechnet, welcher den Grad des linearen Zusammenhangs angibt. In dieser Arbeit wird hauptsächlich der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet. Zur Berechnung werden zunächst die arithmetischen

Mittelwerte der beiden Variablen bestimmt (\bar{x}). Im Anschluss daran wird die Varianz der einzelnen Variablen berechnet (σ^2). Durch die Erstellung einer weiteren Variablen, in der für jeden Fall der Wert beider Variablen miteinander multipliziert wird ($x \cdot y$), dadurch erhält man

$$\rho_{X,Y} = \text{corr}(X, Y) = \frac{\text{cov}(X, Y)}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

die Kovarianz ($\text{Cov}(x,y)$). Die Formel zur Berechnung lautet:

Diese Formel liefert immer Werte zwischen +1 und -1. Das Vorzeichen liefert die Richtung des Zusammenhangs und der Wert den Grad des Zusammenhanges, von perfekt (= 1) bis gar kein Zusammenhang (= 0).

Für die Bestimmung des Zusammenhangsmaßes einer nominalen Variablen und einer metrischen Variablen wird der Eta-Test angewandt, bzw. der Eta-Koeffizient berechnet. Hierzu werden die Quadratsummen zwischen den Gruppen durch die Quadratsumme zwischen und innerhalb der Gruppen dividiert:

$$\eta^2 = \frac{QS_{\text{Zwischen}}}{QS_{\text{Gesamt}}}$$

Nach Cohen (1988) zeigen Werte kleiner als 0,01 einen geringen, Werte zwischen 0,01 und 0,14 einen mittleren und Werte größer als 0,14 einen großen Effekt an (Cleff Thomas 2015).

2.6.6. Mann-Whitney U Test

Ein weiterer Test, der in dieser Arbeit zur Anwendung kommt, ist der Mann-Whitney-U-Test. Durch diesen können nominale Variablen mit ordinalen oder metrischen Variablen korreliert werden. Der große Vorteil ist, dass er ein parameterfreier Test und daher nicht auf eine Normalverteilung innerhalb der einzelnen Variablen angewiesen ist. Zunächst wird die abhängige Variable ihrem Wert nach sortiert, es erhält also jeder Wert einen Rang. Zu jedem dieser Werte korrespondiert nun ein Ausprägungsmerkmal der unabhängigen Variablen. Bildet man die Summe der Ränge, erhält man eine Rangsumme der einzelnen Merkmalsausprägungen, welche verglichen werden und Aussagen bezüglich der Unterschiede erlauben. Ferner kann durch das Standardisieren ein z-Wert errechnet werden, welcher eine Effektstärke der abhängigen Variablen berechnen kann (Mann und Whitney 1947).

2.6.7. Cramers-V Wert

Um den Zusammenhang zwischen zwei nominalen Merkmalen zu messen, kann das Assoziationsmaß Cramers-V verwendet werden. Cramers V nimmt dabei einen Wert zwischen eins (idealer Zusammenhang) und null (fehlender Zusammenhang) an. Berechnet wird das

Cramers V nach der Formel
$$\text{Cramers V} = \sqrt{\frac{\chi^2}{n \cdot (\min(k, m) - 1)}} = \phi^* \sqrt{\frac{1}{\min(k, m) - 1}} \in [0; 1]$$
, wobei n die Anzahl der Beobachtungen angibt, k die Spaltenanzahl und m die Zeilenanzahl (Cleff T. 2008).

2.6.8. Sterbetafeln

Um die Überlebensdauer entweder als *DFS* oder *OS* in Relation zu einem definierenden Faktor zu setzen, werden Sterbetafeln oder Kaplan-Meier Kurven verwendet. Sterbetafeln tragen auf der x-Achse die Zeitspanne und auf der y-Achse das kumulative Überleben, also die Anzahl der Patienten, die noch am Leben sind als Faktor von 1.

Sterbetafeln berechnen für jedes Zeitintervall die Anzahl der Patienten, die in der entsprechenden Gruppe noch vorhanden sind. Man befindet sich nicht mehr in der Gruppe, wenn das terminale Ereignis eingetreten ist, oder wenn man aus der Beobachtung ausscheidet. Dies geschieht immer dann, wenn das beobachtete Zeitintervall überschritten wurde, ohne dass das terminale Ereignis eingetreten ist. Subtrahiert man nun die Verstorbenen und die Ausgeschiedenen von der Gesamtzahl der am Anfang in der Gruppe befindlichen Fälle, erhält man den Startpunkt des Graphen im nun neuen Zeitintervall (Schendera 2014).

2.6.9. Kaplan-Meier-Kurven

Kaplan-Meier Kurven basieren auf dem gleichen Prinzip. Jedoch werden ausgeschiedene, also zensierte Fälle in der Kurve zusätzlich mit einem Kreuz markiert. Außerdem wird zu jedem Zeitpunkt ein Kaplan-Meier-Schätzer der Überlebensfunktion bestimmt. Dazu werden die Überlebensfraktionen nach jedem Zeitintervall miteinander multipliziert. Der große Vorteil von Kaplan-Meier-Kurven gegenüber Sterbetafeln ist, dass zensierte Fälle in die kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit nach einem bestimmten Zeitintervall weiterhin mit einbezogen werden können. Außerdem kann mit dem Kaplan-Meier-Verfahren der Log-Rang Test durchgeführt werden, um die statistische Signifikanz des Modells zu überprüfen. Für diesen Test werden mithilfe des Kaplan-Meier Schätzers in jedem Zeitintervall die Differenz zwischen den erwarteten terminalen Ereignissen und den tatsächlichen Ereignissen verglichen. Weichen, die erwarteten und die eingetreten Ereignisse zu stark voneinander ab, so kann nicht weiter davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um einen Zufallsbefund handelt (Zwiener et al. 2011).

2.6.10. Signifikanzniveau

Zur Überprüfung, ob die Arbeitshypothese statistisch signifikant und nicht zufälliger Natur ist, wurde das Signifikanzniveau mit $\alpha = 5\%$ festgelegt. Ist der p-Wert als Kennzahl der statistischen Auswertungen kleiner als α , so gilt das Resultat als signifikant (Timischl 2013).

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv und postoperative klinikopathologische Parameter

Das nach Anwendung der Ein- und Ausschlusskriterien 697 Patienten umfassende Kollektiv für diese Arbeit setzte sich aus 409 Männern (59%) und 288 Frauen (41%) zusammen.

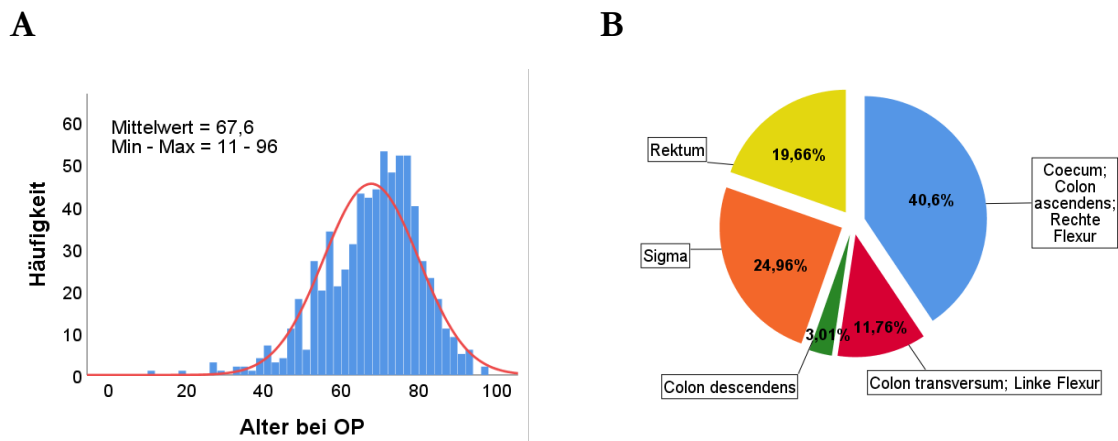


Abbildung 2. Histogramm und prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation

(A) Histogramm der Altersverteilung der Patienten mit einem KRK im untersuchten Kollektiv zum Operationszeitpunkt mit Normalverteilungskurve **(B)** Prozentuale Verteilung der Lokalisation der KRK im untersuchten Kollektiv (n = 697)

Das Alter der Patienten zum Operationszeitpunkt reichte vom 11. bis zum 96. Lebensjahr, der Mittelwert lag bei 67,6 Jahren. Mit einer Standardabweichung von 12,2 Jahren ergab sich eine Häufung der Erkrankten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (Abbildung 2). Aus dem Kollektiv waren insgesamt 61 Patienten (8,7%) zum Operationszeitpunkt ≤ 50 Jahre.

Die Lokalisation der Tumoren war im Coecum und Colon ascendens sowie der rechten Flexur mit 40,6% am häufigsten, am zweithäufigsten waren im untersuchten Kollektiv die Tumore des Sigmas (24,9%). Rektumkarzinome lagen in 19,7%, Karzinome des Colon transversum und der linken Flexur in 11,8% und Karzinome des Colon descendens in 3% der Fälle vor.

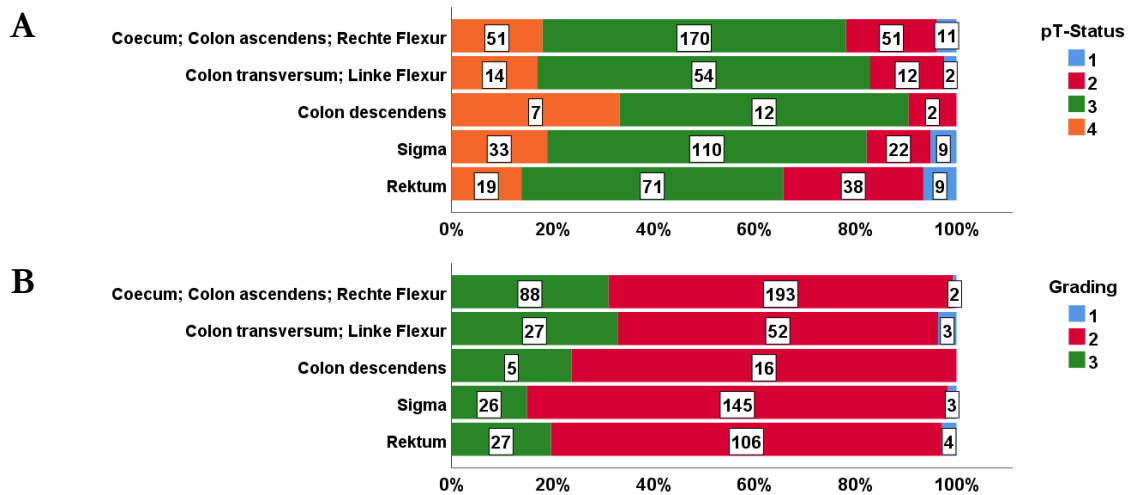


Abbildung 3. Balkendiagramme der Tumorstadien und des Gradings in Abhängigkeit der Tumorlokalisation. Balkendiagramme mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl der **(A)** verschiedenen Tumorstadien (pT-Status) T1, T2, T3 und T4 und des **(B)** Gradings G1, G2 und G3 jeweils in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Nach der operativen Therapie wurden die entnommenen Präparate histopathologisch untersucht. Die postoperativen klinikopathologischen Parameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

In der Gesamtbetrachtung der Parameter zum Operationszeitpunkt zeigte sich, dass der Hauptanteil der Tumore im Stadium pT3, mit Infiltration in die Subserosa oder nicht peritonealisiertes perikolisches Gewebe, operiert wurde (n = 417; 60%), gefolgt von den Stadien pT2, d.h. mit Infiltration in die Muscularis propria, (n = 125; 18%) und pT4, d.h. mit Infiltration in andere Organe oder Strukturen (n = 124; 18%).

Während bei 73% der Karzinome das Grading 2 vorlag (n = 512), lag ein Grading 3 in 25% der Fälle vor (n = 153). Lediglich in 12 Fällen (2%) wurden Tumore mit dem Grading 1 diagnostiziert, wobei 83,3% dieser Tumore im Stadium pT1 bzw. pT2 vorlagen und frühe Tumore somit mit einer besseren Differenzierung assoziiert zu sein schienen (Abbildung 3).

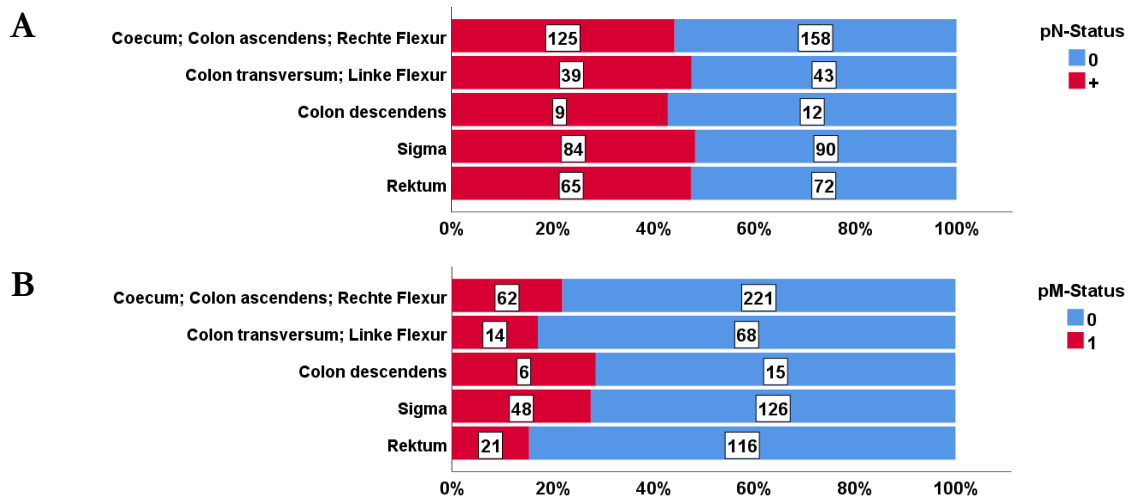


Abbildung 4. Balkendiagramme des Nodalstatus und Metastasierungsstatus in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Balkendiagramme mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl des **(A)** Nodalstatus (pN-Status) N0 und N+ (gruppiert N1 und N2) und **(B)** Metastasierungsstatus (pM-Status) M0 und M1 jeweils in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Wie in Abbildung 4 dargestellt, wurde in 165 (24%) Fällen zum Operationszeitpunkt ein Nodalbefall von 1-3 Lymphknoten (pN1) nachgewiesen, in 157 (23%) Fällen ein Befall von >4 Lymphknoten, in 375 (53,8%) Fällen lagen zum Operationszeitpunkt keine Lymphknotenmetastasen vor (pN0). Die mittlere Anzahl der befallenen Lymphknoten betrug 3 (min = 1, max = 47, SD = 5), die mittlere Anzahl der untersuchten Lymphknoten betrug 26 (min = 7, max = 115, SD = 13).

Ein primäres UICC Stadium IV, d.h. das Vorliegen einer Fernmetastasierung, wurde bei 151 (21,6%) Patienten zum Operationszeitpunkt nachgewiesen, wobei es sich in 127 Fällen um hepatische (84%) und in 3 Fällen (2%) um pulmonale Metastasen handelte. Eine Metastasierung in andere Organe lag in 14% der Fälle vor (n = 21).

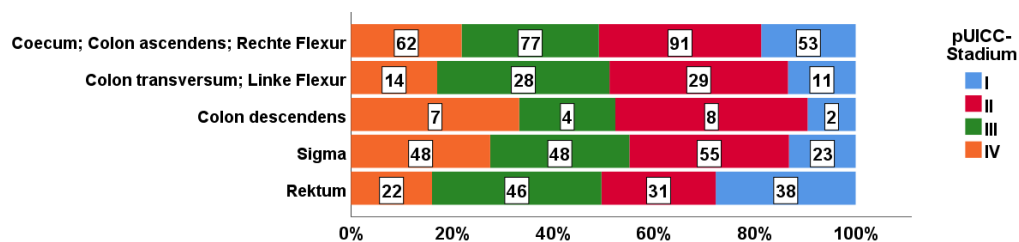


Abbildung 5. Balkendiagramm des UICC-Stadiums in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Balkendiagramm mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl des UICC-Stadiums I, II, III, IV in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Nach der UICC-Klassifikation (Abbildung 5) lag in 214 Fällen ein pUICC II (31%) vor, gefolgt von pUICC III mit 29% (n = 203), pUICC IV 22% (n = 153) und 127 Fällen im Stadium pUICC I (18%).

Eine R0-Resektion konnte in 96,41% der Fälle erreicht werden (n = 672), während in 20 Fällen (2,89%) lediglich eine R1-Resektion und in 5 Fällen (0,07%) eine R2-Situation vorlag, dabei waren alle R2-resezierten Tumoren rechtsseitig lokalisiert.

Weitergehend wurden die Präparate zusätzlich einer Analyse hinsichtlich des Mikrosatellitenstatus unterzogen. Insgesamt wurde eine Mikrosatelliteninstabilität in 15% der 697 untersuchten Präparate nachgewiesen (n = 103), wobei diese mit 68% vor allem bei den rechtsseitig lokalisierten Tumoren auftrat (n = 70).

Tabelle 2. Postoperative klinikopathologische Parameter der untersuchten kolorektalen Karzinome (n=697)

			Gesamt	Lokalisation				
				Coecum Colon ascendens rechte Flexur	Colon transversum linke Flexur	Colon descendens	Sigma	Rektum
Gesamt	n		697	283	82	21	174	137
Alter	Min. - Max.		11-96	28-93	11-92	48-93	27-96	19-96
Geschlecht	m	n	409	142	49	8	123	87
		%	59	50	60	38	71	64
	w	n	288	141	33	13	51	50
		%	41	50	40	62	29	36
OP-Methode	(erweiterte)	n	42	2	12	13	13	2
	Hemikolektomie rechts	%	6	1	15	62	7	1
	(erweiterete)	n	312	267	40	2	3	-
	Hemikolektomie links	%	45	94	49	10	2	-
	Sigmaresektion	n	107	-	-	1	105	1
		%	15	-	-	5	60	1
	Rektum- resektionen	n	180	-	1	-	46	133
		%	26	-	1	-	26	97
Andere	n	56	14	29	5	7	1	
	%	8	5	35	24	4	1	
pT-Status	1	n	31	11	2	-	9	9
		%	4	4	2	-	5	7
	2	n	125	51	12	2	22	38
		%	18	18	15	10	13	28
	3	n	417	170	54	12	110	71
		%	60	60	66	57	63	52
	4	n	124	51	14	7	33	19
		%	18	18	17	33	19	14
pN-Status	0	n	375	158	43	12	90	72
		%	54	56	52	57	52	53
	1	n	165	63	26	7	39	30
		%	24	22	32	33	22	22
	2	n	157	62	13	2	45	35
		%	23	22	16	10	26	26
pM-Status	0	n	546	-	-	-	-	-
		%	78	-	-	-	-	-
	1 Leber	n	127	46	13	6	44	18
		%	18	16	16	29	25	13
	Lunge	n	3	1	-	-	2	-
		%	0	0	0	0	1	0
Andere	n	21	15	1	-	2	3	
	%	3	2	1	0	1	2	

			Gesamt	Lokalisation				
				Coecum Colon ascendens rechte Flexur	Colon transversum linke Flexur	Colon descendens	Sigma	Rektum
Anzahl der untersuchten Lymphknoten	Mittelwert		26	25	29	24	24	27
	Minimum		7	7	6	9	2	1
	Maximum		115	74	115	64	94	76
	Standardabweichung		13	11	19	13	13	14
Anzahl der Lymphknotenmetastasen	Mittelwert		3	2	3	1	3	3
	Minimum		1	-	-	-	-	-
	Maximum		47	-	-	-	-	-
	Standardabweichung		5	4	6	2	6	6
pUICC-Stadium	I	n	127	53	11	2	23	38
		%	18	19	13	10	13	28
	II	n	214	91	29	8	55	31
		%	31	32	35	38	32	23
	III	n	203	77	28	4	48	46
		%	29	27	34	19	28	34
	IV	n	153	62	14	7	48	22
		%	22	22	17	33	28	16
Grading	1	n	12	2	3	-	3	4
		%	2	1	4	-	2	3
	2	n	512	193	52	16	145	106
		%	73	68	63	76	83	77
	3	n	173	88	27	5	26	27
		%	25	31	33	24	15	20
R-Status	0	n	672	271	80	21	169	131
		%	96	96	98	100	97	96
	1	n	20	7	2	-	5	6
		%	3	2	2	-	3	4
	2	n	5	5	-	-	-	-
		%	1	2	-	-	-	-
MSI-Status	MSI	n	103	70	17	2	9	5
		%	15	25	21	10	5	4

3.2. Follow-Up

Das Kollektiv wurde von 2000 bis 2020 einem *Follow-Up* unterzogen und die Datenerhebung erfolgte im Zeitraum April 2020 bis Januar 2021. Die Parameter des *Follow-Ups* werden in *Tabelle 3* dargestellt.

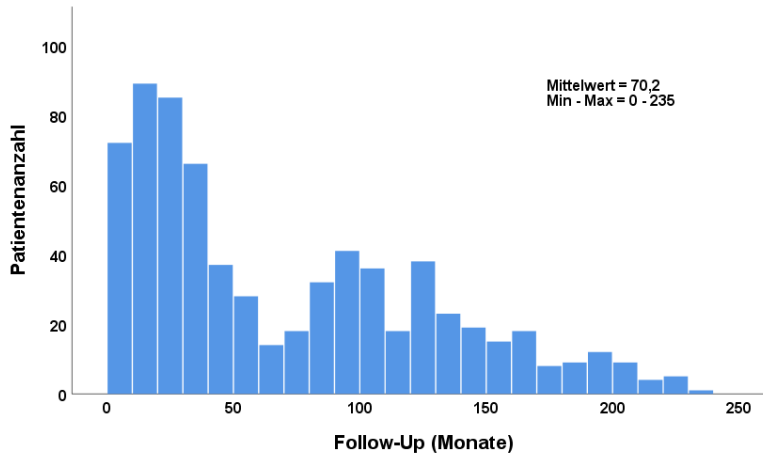


Abbildung 6. Histogramm zur Dauer des *Follow-Ups* in Monaten (n = 697)

Der mittlere Nachbeobachtungszeitraum lag bei 70,2 Monaten mit einer Standardabweichung von 58,14 Monaten, der minimale *Follow-Up*-Zeitraum betrug 0 Monaten, der maximale 235 Monate (Abbildung 6).

Im genannten Beobachtungszeitraum trat über alle Lokalisationen bei 31 Patienten ein Lokalrezidiv auf (Lokalrezidivrate $LRR = 4\%$), wobei die Verteilung lokalisationsabhängig variierte und insbesondere die Tumore des Colon descendens ($2/21 \cong 10\%$) und des Sigmas ($13/174 \cong 7\%$) betroffen waren, während die Rate bei den übrigen Tumoren zwischen 2 und 4% lag.

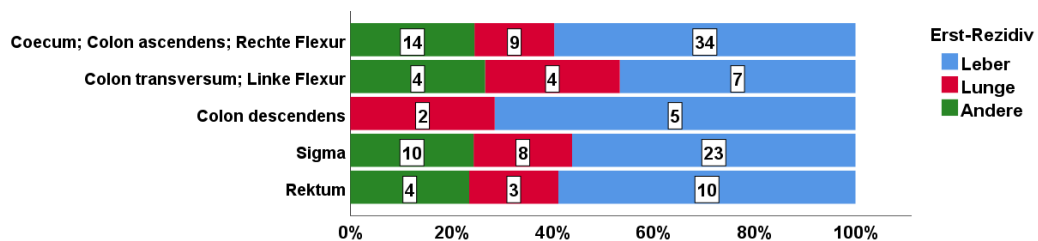


Abbildung 7. Balkendiagramm der Erstrezidivlokalisierung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Balkendiagramm mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl der Erstrezidivlokalisierung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Bei insgesamt 137 (19,65%) Erkrankten wurden im Beobachtungszeitraum 2000-2020 Fernmetastasen nachgewiesen, wobei zwischen einem Erst-, Zweit- und Drittrezidiv unterschieden wurde.

Während bei rechtsseitigen Tumoren bis einschließlich der rechten Flexur die Rezidivrate für Erstrezidive bei 19,86% (57/283) lag, lag sie bei linksseitigen Tumoren (Colon transversum bis einschließlich Sigma) bei 22,74% (63/277) und bei den Tumoren des Rektums bei 12,4% (17/137). In 58% der Fälle erfolgte die primäre Fernmetastasierung hepatisch (n = 79), in 19% pulmonal (n = 26) (Abbildung 7).

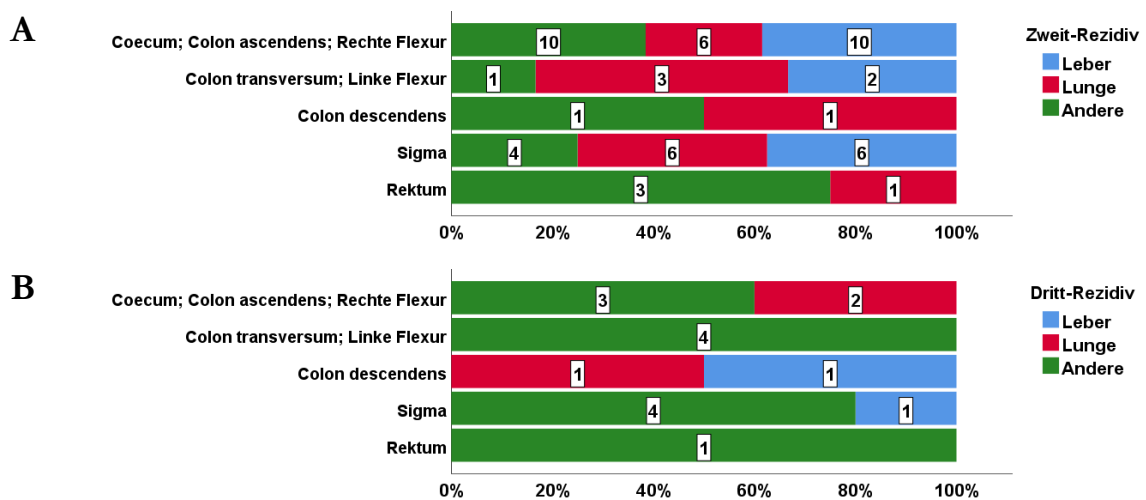


Abbildung 8. Balkendiagramme der Zweitrezidiv- und Drittrezidivlokalisierung in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Balkendiagramme mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl der **(A)** Zweitrezidivlokalisierungen und der **(B)** Drittrezidivlokalisierungen jeweils in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Wie in Abbildung 8 dargestellt, betrafen Zweit-Rezidive zu 33% die Leber (n = 18) und zu 31% die Lunge (n = 17), während Drittrezidive nur noch zu 12% hepatisch (n = 2) und zu 18% pulmonal (n = 3) auftraten.

Die Rate an Fernmetastasierungen in andere Organe nahm im Gegenzug vom Erstrezidiv (23%) zum Drittrezidiv (71%) stark zu.

Der Mittelwert des *DFS* bei Betrachtung aller Lokalisationen betrug 62 Monate, das maximale krankheitsfreie Überleben 235 Monate. Es zeigte sich, dass das *DFS* Lokalisations-abhängig rechtsseitig mit einem Mittelwert von 57 Monaten verkürzt erschien, während der Mittelwert für die linksseitigen Tumoren einschließlich des Sigmas bei 64,15 Monaten und bei Tumoren des Rektums bei 69,74 Monaten lag.

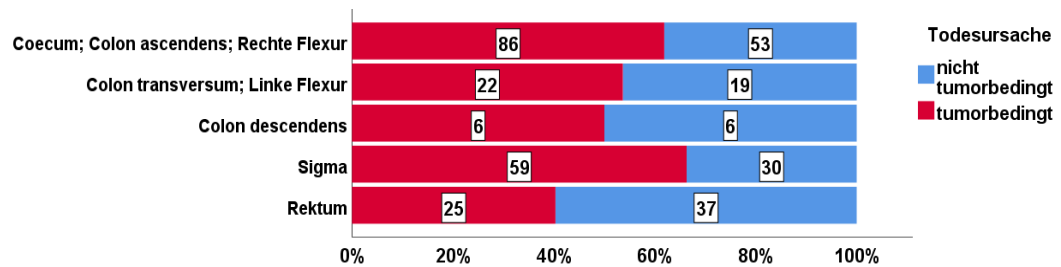


Abbildung 9. Balkendiagramm der Todesursache in Abhängigkeit der Tumorlokalisation

Balkendiagramm mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl der Todesursache (nicht tumorbedingt, tumorbedingt) in Abhängigkeit der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] (n = 697)

Insgesamt verstarben im Beobachtungszeitraum 2000-2020 341 Patienten (48,9%), 57,7% (n = 197) tumorbedingt und 42,3% (n = 144) nicht-tumorbedingt (Abbildung 9).

Das OS betrug in der Gesamtbetrachtung aller Tumoren im Mittel 70,2 Monate, bei rechtsseitigen Karzinomen im Mittel 63 Monate, während bei den linksseitigen Tumoren einschließlich des Sigmas das mittlere OS bei 75,93 Monaten und bei Rektumkarzinomen bei 73,95 Monaten lag. Das Signifikanzniveau für das DFS in Abhängigkeit der Tumorlokalisation lag bei $p = 0,4$ und für das OS bei $p = 0,2$, so dass dennoch kein über den Zufall hinausgehender Unterschied aufgezeigt werden konnte. Das CSS betrug im Mittel 31 Monate mit einem Maximum von 180 und einem Minimum von 0 Monaten.

Tabelle 3. Tabelle der Follow-Up-Daten der kolorektalen Karzinome im untersuchten Kollektiv

		Gesamt	Lokalisation							
			Coecum Colon ascendens rechte Flexur	Colon transversum linke Flexur	Colon descendens	Sigma	Rektum			
Gesamt	n	697	283	82	21	174	137			
Lokalrezidiv	nein	n	273	80	19	161	133			
		%	96	98	90	93	97			
	ja	n	31	10	2	2	13	4		
		%	4	4	2	10	7	3		
Fernmetastase	nein		560	-	-	-	-	-		
		ja	Erst-Rezidiv	Leber	n	79	34	7	5	23
			%	58	60	47	71	56	59	
			Lunge	n	26	9	4	2	8	3
			%	19	16	27	29	20	18	
			Andere	n	32	14	4	-	10	4
			%	23	25	27	-	24	24	
		Zweit-Rezidiv	Leber	n	18	10	2	-	6	-
			%	33	38	33	-	38	-	
			Lunge	n	17	6	3	1	6	1
			%	31	23	50	50	38	25	
			Andere	n	19	10	1	1	4	3
			%	35	38	17	50	25	75	
		Dritt-Rezidiv	Leber	n	2	-	-	1	1	-
			%	12	-	-	50	20	-	
			Lunge	n	3	2	-	1	-	-
		%	18	40	-	50	-	-		
		Andere	n	12	3	4	-	4	1	
		%	71	60	100	-	80	100		
Verstorben	nein		356	-	-	-	-	-		
		ja	Nicht tumorbedingt	n	145	53	19	6	30	37
			%	42	38	46	50	34	60	
		tumorbedingt	n	198	86	22	6	59	25	
		%	58	62	54	50	66	40		
Disease free survival	Mittelwert	62	57	65	68	63	70			
	Minimum	0	0	0	0	0	0			
	Maximum	235	222	220	196	235	203			
Cancer specific survival	Mittelwert	31	29	35	47	34	22			
	Minimum	0	0	0	5	0	1			
	Maximum	180	180	87	151	127	97			
Overall survival	Mittelwert	70	63	71	85	77	74			
	Minimum	0	0	0	0	0	0			
	Maximum	235	222	220	196	235	203			

3.3. Proteinexpressionen in Abhängigkeit des Tumorstadiums, Nodalstatus, Gradings und der Lokalisation

Anhand der Proteinexpressionsanalyse konnten Unterschiede der Expression in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter identifiziert und dargestellt werden. Für diese Analyse wurden die Patienten anhand der Proteinexpressionsstärke in eine Gruppe mit hoher versus eine Gruppe mit niedriger Expression anhand des Medians unterteilt. Diese Unterteilung wurde durchgeführt, um gleich große Gruppen zu bilden und den Effekt der Ausreißer zu minimieren. Für die Visualisierung wurden gruppierte Balkendiagramme gewählt. Diese geben im Wesentlichen die Ergebnisse von Kreuztabellen wieder. Für die Analyse des Einflusses der Proteinexpression war die Relation von Patienten mit hoher versus Patienten mit niedriger Expression interessant. Da es sich um Kreuztabellen handelte, war das absolute Vorkommen der Merkmalsausprägungen immer identisch und daher für diese Analyse nicht relevant.

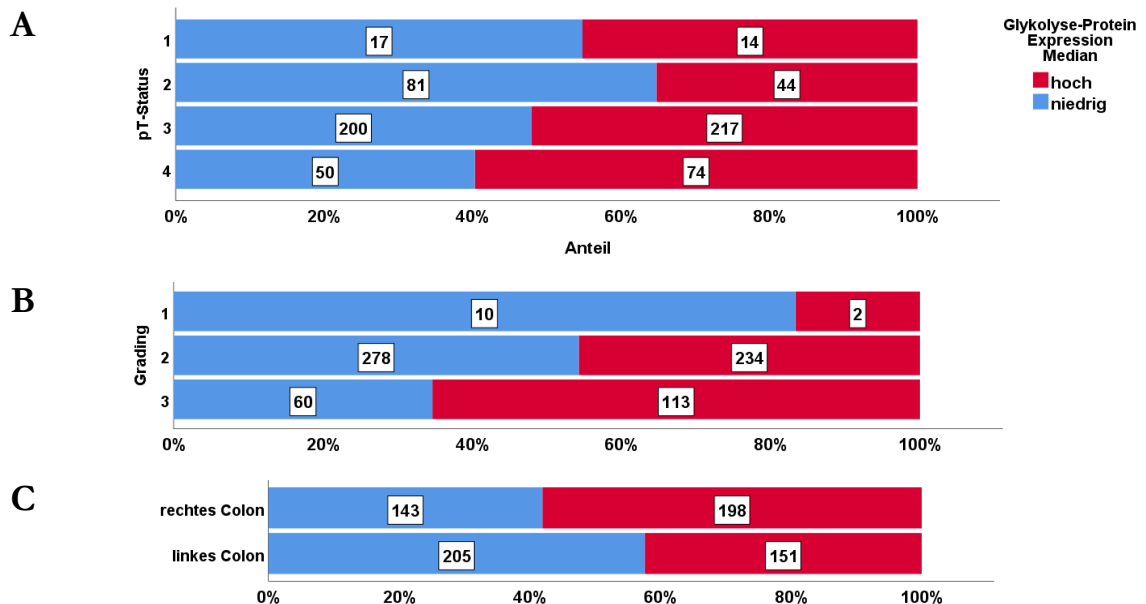


Abbildung 10. Balkendiagramme der Proteinexpression der metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums, des Gradings und der Lokalisation

Balkendiagramme (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) der Expression der metabolischen Proteine der Glykolyse (diese umfassen: ALDOA, ALDOB, ALDOC, ENO1, ENO2, GAPDH, GPI, HK1, HK2, HK3, PFKB2, PGAM1, PGAM5, PGK1, PGK2, PKLR, TPI1) mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl der **(A)** verschiedenen Tumorstadien (pT-Status) T1, T2, T3 und T4, des **(B)** Gradings G1, G2 und G3 und der **(C)** Tumorlokalisation rechtes Colon (gruppiert Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur, Colon transversum) und linkes Colon (gruppiert linke Flexur, Colon descendens, Sigma, Rektum) (n = 697)

Abbildung 10 zeigt, dass eine erhöhte Expression der metabolischen Proteine der Glykolyse bei höheren Tumorstadien, schlechterem Grading und in Abhängigkeit der Lokalisation (links versus rechts mit erhöhter Proteinexpression rechtsseitig) gefunden werden konnte. Ebenfalls

zeigte sich im untersuchten Datensatz, dass sich wie erwartet erhöhte Proteinexpressionen bei Vorliegen eines Nodalbefalles, einer Fernmetastasierung und entsprechend bei einem höheren pUICC-Stadium als Trends darstellen lassen konnten, ohne jedoch statistisch signifikante Unterschiede zu zeigen.

Es ist davon auszugehen, dass sich der Warburg-Effekt bestätigen lässt und dass schlechtere klinikopathologische Parameter im Sinne eines fortgeschritteneren Tumorstadiums, einer Entdifferenzierung und in Abhängigkeit der Lokalisation mit einer erhöhten Expression der metabolischen Proteine der Glykolyse einhergehen.

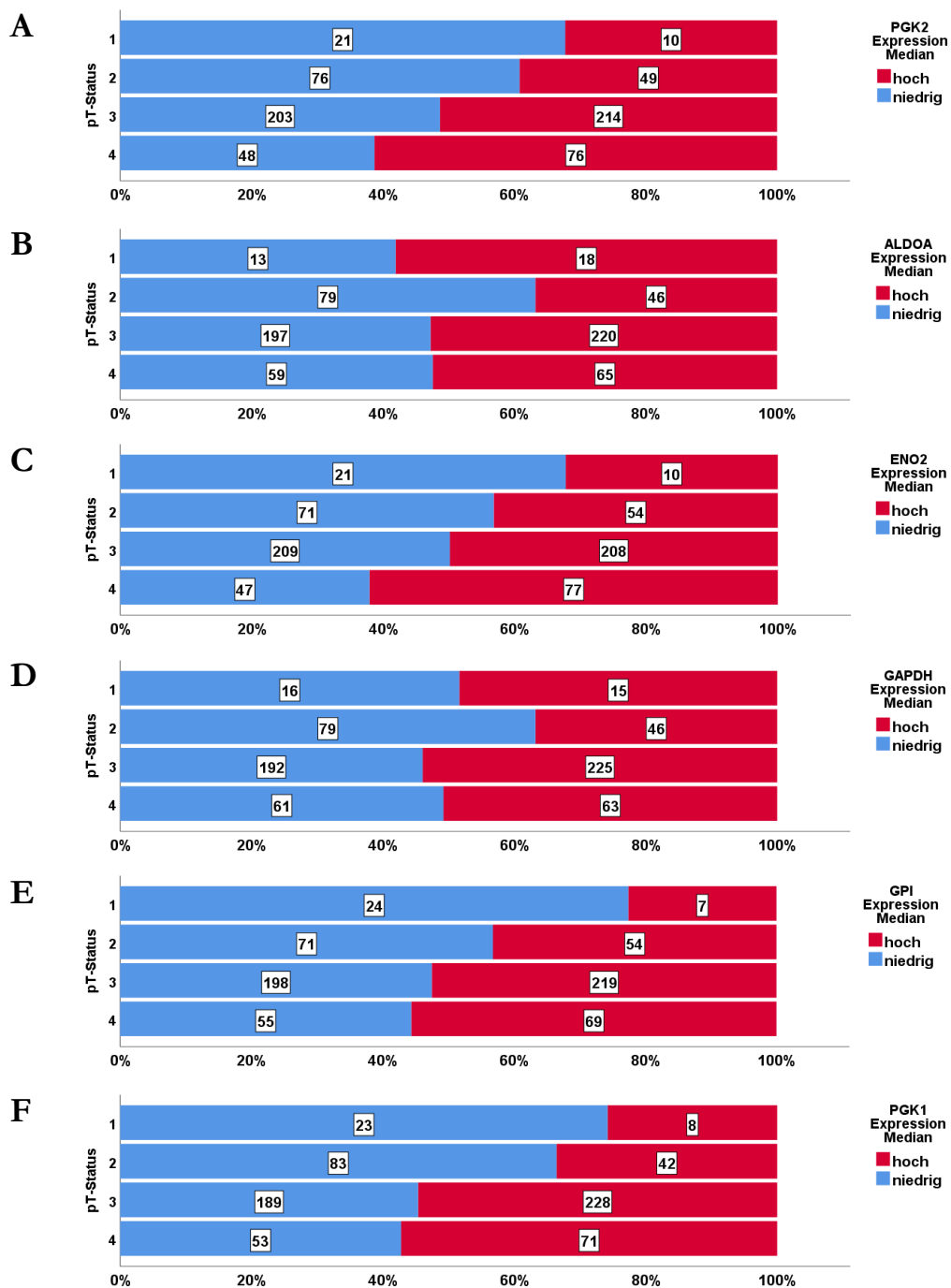


Abbildung 11. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Balkendiagramme (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) der unterschiedlichen Expressionsstärken der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit der verschiedenen Tumorstadien (pT-Status) T1, T2, T3 und T4; **(A)** PGK2, **(B)** ALDOA, **(C)** ENO2, **(D)** GAPDH, **(E)** GPI und **(F)** PGK1 (n = 697)

Signifikante Unterschiede in der Expressionsstärke konnten in der Betrachtung des Tumorstadiums hinsichtlich der Proteinen PGK2, ENO2, ALDOA, GAPDH, GPI und PGK1 gezeigt werden. Bei allen diesen Enzymen konnte in den Tumorstadium pT3 und pT4 eine statistisch signifikant erhöhte Expression nachgewiesen werden ($p < 0,01$), während diese in den Tumorstadien pT1 und pT2 nicht nachzuweisen war (Abbildung 11).

Am Beispiel des PGK2 Proteins sei erläutert, dass in der Gruppe der pT1-Tumoren insgesamt 31 Patienten vorkamen. Von diesen Tumoren zeigten 21 (67,7%) eine niedrige Expression, 10 eine hohe Expression (32,3%) der untersuchten Proteine. Die Gruppe der pT2/PGK2-Tumore umfasste insgesamt 125 Patienten, von diesen Tumoren zeigten 76 eine niedrige Expression (60,8%) und 49 eine hohe Expression (39,2%). In die Gruppe der pT3/PGK2-Tumore fielen insgesamt 417 Patienten, von diesen Tumoren zeigten 203 eine niedrige Expression (48,7%) und 214 eine hohe Expression (51,3%), während in die Gruppe pT4/PGK2-Tumore insgesamt 124 Patienten fielen, mit einer Verteilung von 38,7% Tumoren mit niedriger Expression (n = 48) und 61,3% mit hoher Expression (n = 76).

Es zeigte sich, dass sich das Verhältnis der Expression von PGK2 im Vergleich von pT1 bis pT4 weitestgehend umgekehrt hatte. Während etwa zwei Drittel der Tumore im Stadium pT1 eine *geringe* PGK2-Expression aufwiesen, waren es im Stadium pT4 etwa zwei Drittel der Tumore, die eine *hohe* PGK2-Expression vorwiesen. Dieser beobachtete Trend konnte durch den Cramers-V Wert von 0,153 ($p = 0,001$) belegt werden, welcher eine Korrelation bestätigte. Die in der Abbildung gezeigten Proteine sind jegliche Proteine, die einen signifikanten Cramers-V Wert hatten. Die stärkste Korrelation zeigte sich mit einem Cramers-V Wert von 0,197 bei dem Protein PGK1. Dies ließ sich durch einen Vergleich mit dem Balkendiagramm nachvollziehen.

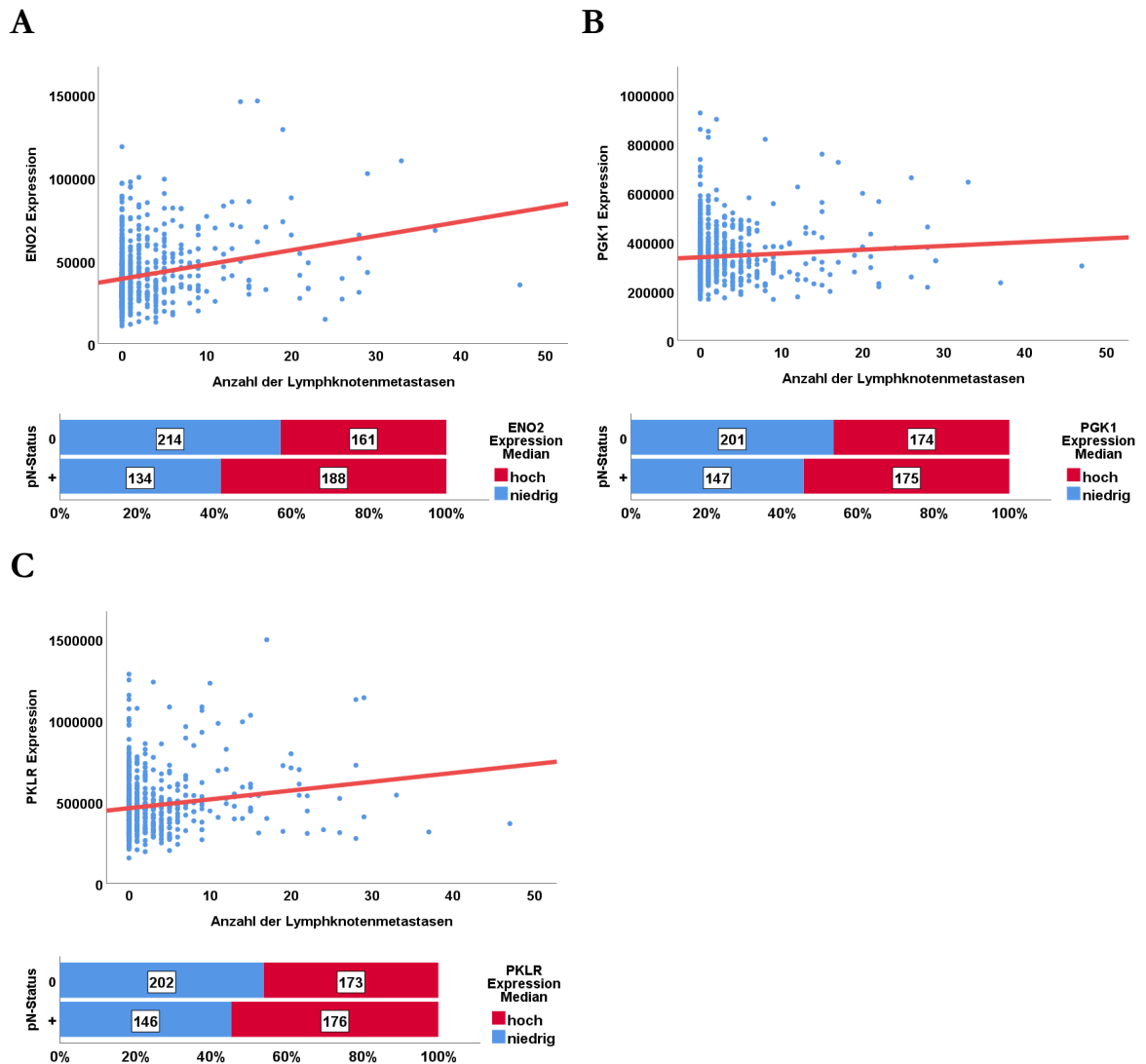


Abbildung 12. Kombinierte Darstellung von Streudiagramm nach Pearson und Balkendiagramm der Proteinexpression in Abhängigkeit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen je Protein
Kombinierte Darstellung von Streudiagramm nach Pearson mit linearem Zusammenhang von der Anzahl der Lymphknotenmetastasen je Protein, der Expressionsstärke und Balkendiagramm (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des Nodalstatus (pN-Status) N0 und N+ (gruppiert N1 und N2) der **(A)** ENO2, **(B)** PGK1 **(C)** PKLR

In Abbildung 12 wurden die Proteine ENO2, PGK1 und PKLR in Beziehung zum Nodalstatus der Erkrankten gesetzt. Am Beispiel des Proteins ENO2 hatten bei pN0 57,1% der Tumoren eine niedrige Expression von *ENO2*, während es bei N+ nur noch 41,6% waren. Dies ließ sich grafisch sehr gut ablesen und wurde bestätigt durch den Cramers-V-Wert von 0,154 ($p < 0,0005$). Diese Beziehung ließ sich nicht nur hinsichtlich der Unterscheidung N0 und N+ darstellen, sondern auch für die ENO2-Expression und die Anzahl der Lymphknotenmetastasen. Die Pearson-Korrelation betrug hier 0,246 oder $R^2 = 0,061$; bei $p < 0,0005$. Auch die Richtung der Korrelation stimmte mit dem Postulat überein, dass erkennbar sei, dass eine erhöhte ENO2-Expression mit einer höheren Anzahl von

Lymphknotenmetastasen assoziiert werden könne. Diese Beziehung ist in dem Streudiagramm mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen auf der Abszisse und der ENO2-Expression auf der Ordinate abzulesen.

Die gleichen Korrelationen konnten für die Proteine PGK1 und PKLR nachgewiesen werden, wenn auch weniger stark ausgeprägt und im Falle von PGK1 ohne Erreichen des statistischen Signifikanzniveaus ($p = 0,052$).

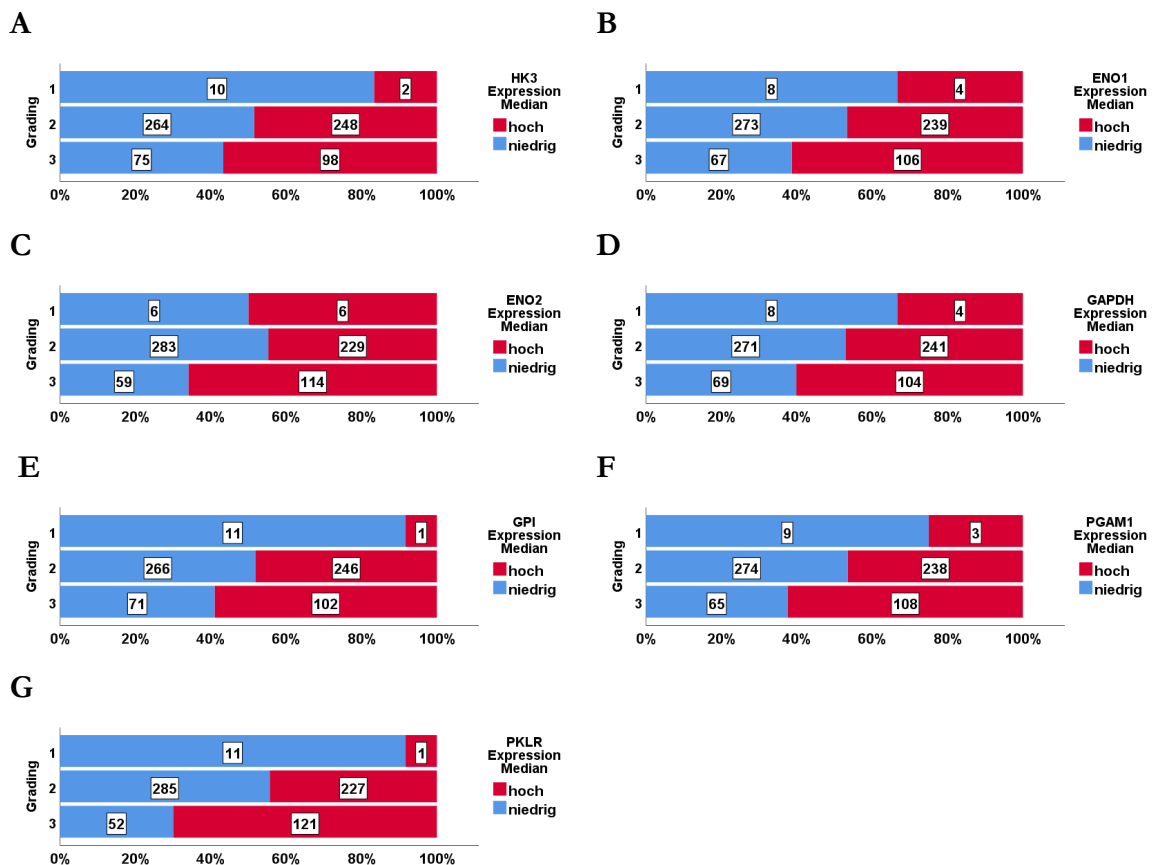


Abbildung 13. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit des Gradings

Balkendiagramme (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des Gradings G1, G2 und G3 in Abhängigkeit der Expressionsstärke der metabolischen Proteine der Glykolyse mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl; (A) HK3, (B) ENO1, (C) ENO2, (D) GAPDH, (E) GPI, (F) PGAM1 und (G) PKLR ($n = 697$)

Analog zu der Analyse des pT-Status in Abhängigkeit der Expression bestimmter Proteine, konnte bei 7 Proteinen eine signifikante Korrelation mit dem Grading des Tumors gezeigt werden (Abbildung 13). Die stärkste Korrelation gab es mit einem Cramers-V-Wert von 0,247 zwischen dem Protein PKLR und dem Grading. Während bei Patienten mit einem Grading 1 über 90% aus der Gruppe der Tumore mit niedriger PKLR-Expression entstammten, waren es bei Grading 3 lediglich noch 30%. Bei Grading 2 zeigte sich mit einer Verteilung von 55,7% mit hoher Expression zu 44,3% mit niedriger Expression ein etwa ausgeglichenes Verhältnis. Die

zweitstärkste Korrelation bestand zwischen dem Grading und dem Protein ENO2. Den schwächsten Cramers-V Wert zeigte das Protein HK3. Dies ließ sich am Balkendiagramm auch daran erkennen, dass der Ausschlag des roten Balkens im Vergleich zu dem blauen Balken am wenigsten stark ausgeprägt war.

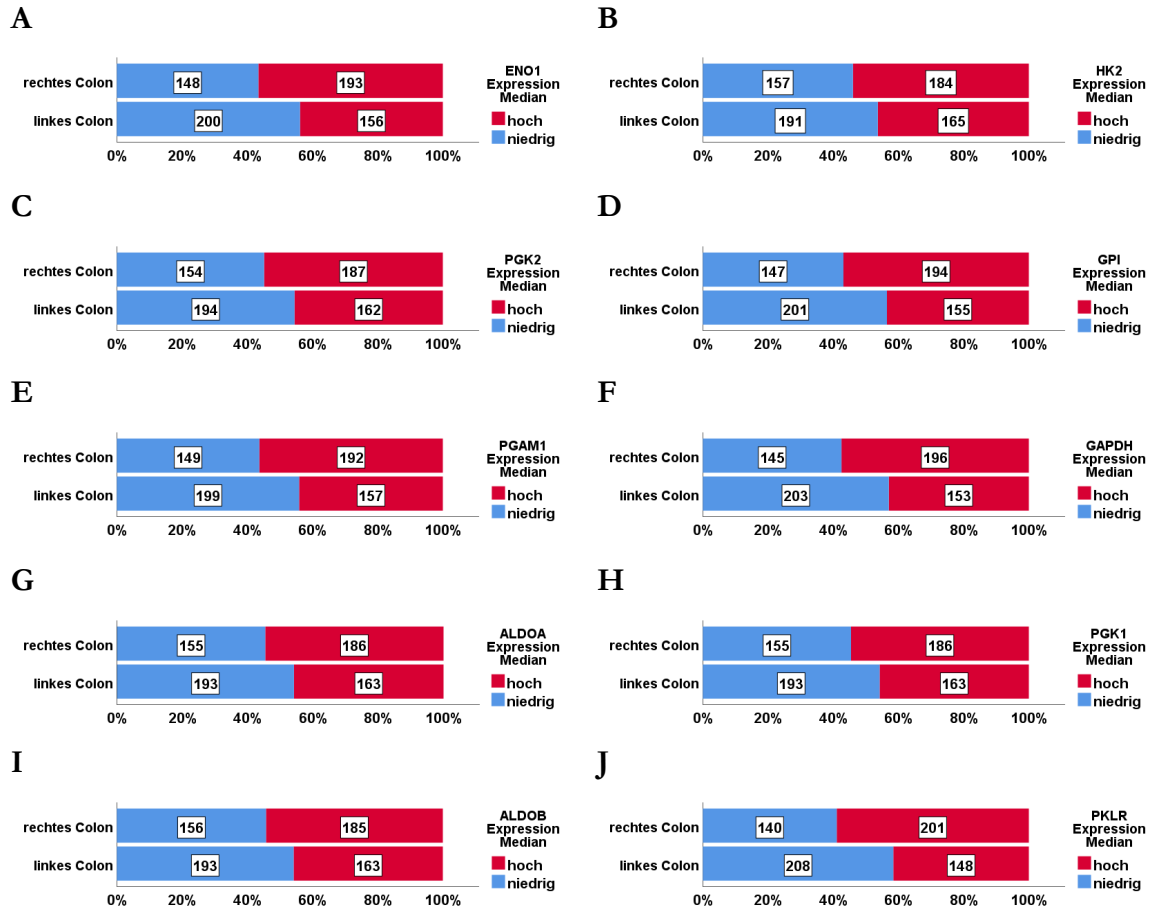


Abbildung 14. Balkendiagramme der Proteinexpression der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse in Abhängigkeit der Tumorlokalisation rechtes versus linkes Colon

Balkendiagramme (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) der Tumorlokalisation rechtes Colon (gruppiert Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur, Colon transversum) und linkes Colon (gruppiert linke Flexur, Colon descendens, Sigma, Rektum) mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse; **(A)** ENO1, **(B)** HK2, **(C)** PGK2, **(D)** GPI, **(E)** PGAM1, **(F)** GAPDH, **(G)** ALDOA, **(H)** PGK1, **(I)** ALDOB und **(J)** PKLR (n = 697)

In Abbildung 14 sind die 10 Proteine dargestellt, welche eine signifikante Korrelation mit der Lokalisation des Tumors zeigten. Signifikant bedeutet, dass der Cramers-V-Wert über 0,1 lag. Unterschieden wurde, wie vorangehend auch, zwischen linkem und rechtem Colon. Die stärkste Korrelation bestand optisch zwischen dem Protein *PKLR* und der Lokalisation und wurde bestätigt durch den stärksten Cramers-V-Wert von 0,174 bei $p < 0,0005$. Während bei Patienten mit einem Tumor im rechtsseitigen Colon 58,9% (n = 201) der Tumore eine erhöhte PKLR-Expression aufwiesen, lag bei einem Tumor im linken Colon in lediglich 41,6% (n = 148) eine

erhöhte Expression von PKLR vor. Alle 10 Proteine, welche einen Cramers-V-Wert von über 0,1 hatten, zeigten die gleiche Korrelation mit einer erhöhten Proteinexpression bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren auf.

Die Reihenfolge der Korrelationsstärke der 10 Proteine wird nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Tabelle 4. Reihenfolge Korrelationsstärke der metabolischen Proteine der Glykolyse

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PKLR	GAPDH	GPI	ENO1	PGAM1	PGK2	PGK1	ALDOA	ALDOB	HK2

Zudem zeigten alle weiteren Korrelationen, welche zwar statistisch signifikant unterschieden, aber einen zu schwachen Cramers-V-Wert hatten, so dass auch hier eine erhöhte Proteinexpression mit der rechtsseitigen Lokalisation zu korrelieren scheint.

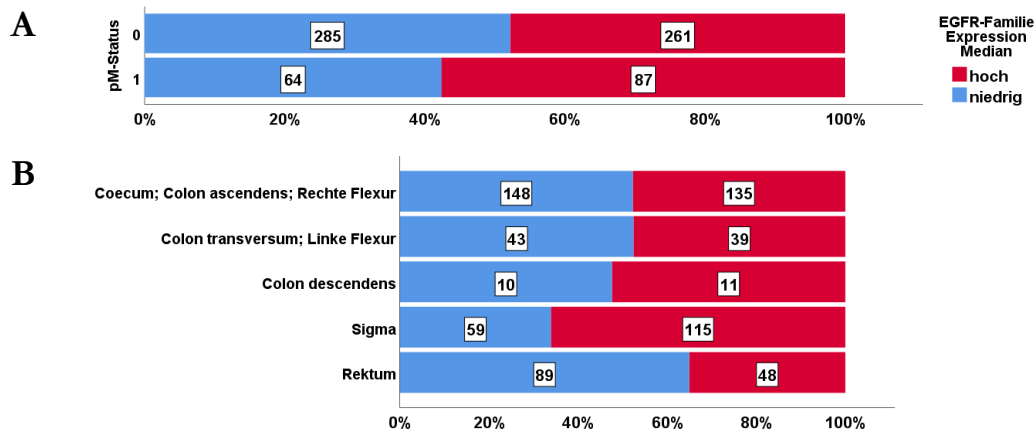


Abbildung 15. Balkendiagramme der Proteinexpression der Proteine der EGFR-Familie in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus und der Tumorlokalisation

Balkendiagramme (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) der Expressionsstärke der Proteine der EGFR-Familie (gruppiert EGFR, ERBB2, ERBB3) in Abhängigkeit des **(A)** Metastasierungsstatus (pM-Status) M0 und M1 und **(B)** der Tumorlokalisation [Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur (gruppiert); Colon transversum, linke Flexur (gruppiert); Colon descendens; Sigma; Rektum] mit zusätzlicher Angabe der absoluten Patientenzahl (n = 697)

Die Gesamtbetrachtung der Proteine der EGFR-Familie (Abbildung 15) zeigte, dass eine statistisch signifikant erhöhte Expression der Proteine bei Vorliegen einer Fernmetastasierung und in Abhängigkeit der Lokalisation nachweisbar war. Während bei den pM0-Tumoren 47,8% (261/546 Tumore) eine hohe Expression zeigten, lag eine erhöhte Proteinexpression bei pM1-Tumoren in 57,6% (87/151) der Fälle vor.

Für das Tumorstadium, den Nodalbefall, das Grading, das UICC-Stadium und in der Unterscheidung rechts versus links zeigten sich zwar ebenfalls die erwarteten Trends im Sinne einer erhöhten Proteinexpression, jedoch lagen die Ergebnisse auch hier unter dem

Signifikanzniveau, so dass diese ebenfalls zufällige Ergebnisse darstellen können und weiterer Untersuchungen bedürfen.

In der Gesamtbetrachtung der Proteinexpressionsstärke der EGFR-Proteine zeigt sich, dass ein statistisch signifikanter lokalisationsabhängiger Unterschied bei Tumoren des Colon descendens und des Sigmas vorhanden war, sich dieser in der zusammengefassten Betrachtung *linkes* versus *rechtes* Colon jedoch nicht statistisch signifikant bestätigen ließ. Keine signifikanten Unterschiede der Proteinexpression der EGFR-Proteine konnten in Abhängigkeit des Tumorstadiums und des Nodalbefalles in der Gesamtbetrachtung der Proteine gefunden werden. Gleiches ergab die Analyse hinsichtlich der Proteinexpression in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades und des UICC-Stadiums. Auch wenn sich wiederum die vermuteten Trends darstellen lassen konnten, lagen alle Werte knapp unter dem Signifikanzniveau.

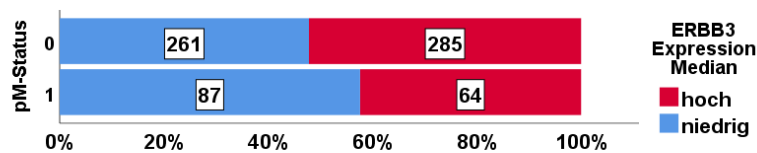


Abbildung 16. Balkendiagramm der Proteinexpression des EGFR-Proteins ERBB3 in Abhängigkeit des Metastisierungsstatus

Balkendiagramm (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) der Expressionsstärke des EGFR-Proteins ERBB3 in Abhängigkeit des Metastisierungsstatus (pM-Status) M0 und M1 (n = 697)

In der Einzelbetrachtung der Proteine aus der EGFR-Familie zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Expression von ERBB3 bei Vorliegen von Fernmetastasen (Abbildung 16). Die weitere Betrachtung der Proteine zeigte zwar die postulierten Trends, jedoch lagen die Ergebnisse der Analyse unter dem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$.

3.4. Disease-free-survival und Overall-survival in Korrelation zu den klinikopathologischen Parametern

Der vorliegende Datensatz wurde hinsichtlich des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter untersucht. Es zeigte sich, dass statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) in Korrelation zum pathologischen Tumorstadium, dem Nodalstatus, dem Metastasierungsstatus, dem Gradings sowie dem Auftreten von Lokalrezidiven nachzuweisen waren. Keine Ergebnisse mit statistisch signifikanten Unterschieden wurden bei der Betrachtung der Tumorlokalisation gefunden.

Die beobachteten Korrelationen entsprachen der Erwartung, dass ungünstige klinikopathologische Parameter im Sinne eines höheren Tumorstadiums, eines Nodalbefalles oder einer Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zu einer Verkürzung der Überlebensdauer führten. Grundlegend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, ob ein repräsentatives Patientenkollektiv vorliegt und ob sich die aus der Literatur bekannten Erkenntnisse der Stadien-abhängigen Prognosen anhand der erhobenen Daten umgekehrt ebenfalls bestätigen lassen.

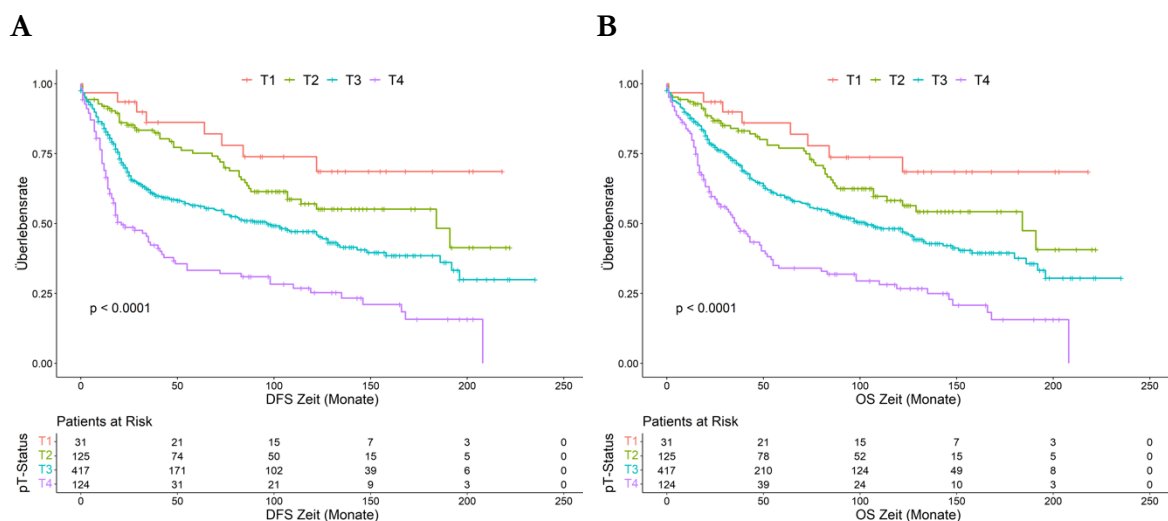


Abbildung 17. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* aufgeteilt nach Tumorstadien (pT-Status) T1, T2, T3 und T4 in Bezug zu **(A)** *DFS* und **(B)** *OS* ($p < 0,0001$, $n = 697$)

Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnte bei der Betrachtung des Tumorstadiums gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem pT1-Stadium die Überlebensrate nach 60 Monaten bei 67,7% (21/31) lag; bei pT4-Tumoren hingegen nur bei 23,4% (29/124). Die Kaplan-Meier-Kurven für die Tumorstadien pT2 und pT3 verliefen zwischen den beiden Kurven für pT1 und pT4 und bestätigten die Stadien-abhängige Verschlechterung der Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit.

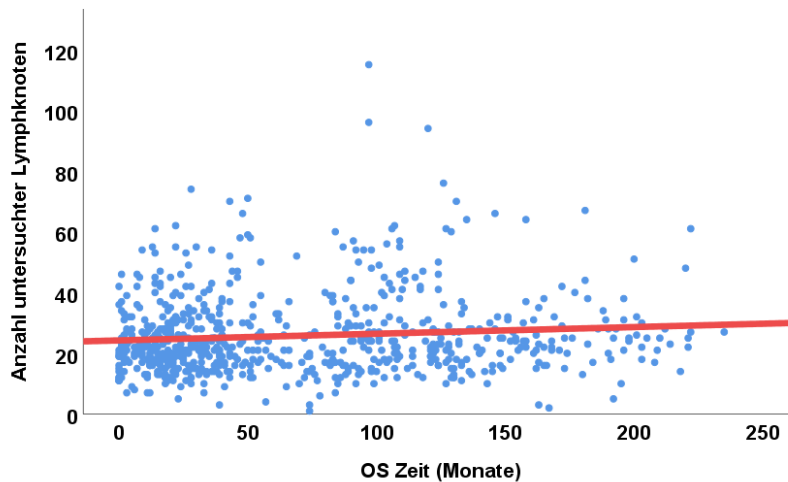


Abbildung 18. Streudiagramm nach Pearson des OS mit linearem Zusammenhang von Überlebenszeit und Anzahl der untersuchten Lymphknoten ($n = 697$)

Ein weiterer Zusammenhang konnte zwischen der Anzahl der untersuchten Lymphknoten und der Zeit des OS aufgezeigt werden (Abbildung 18). Tatsächlich war der Zusammenhang nach Pearson mit 0,95 positiv ($p = 0,012$) und erlaubte damit die Schlussfolgerung, dass eine höhere Anzahl an untersuchten Lymphknoten mit einer längeren Überlebensdauer assoziiert war.

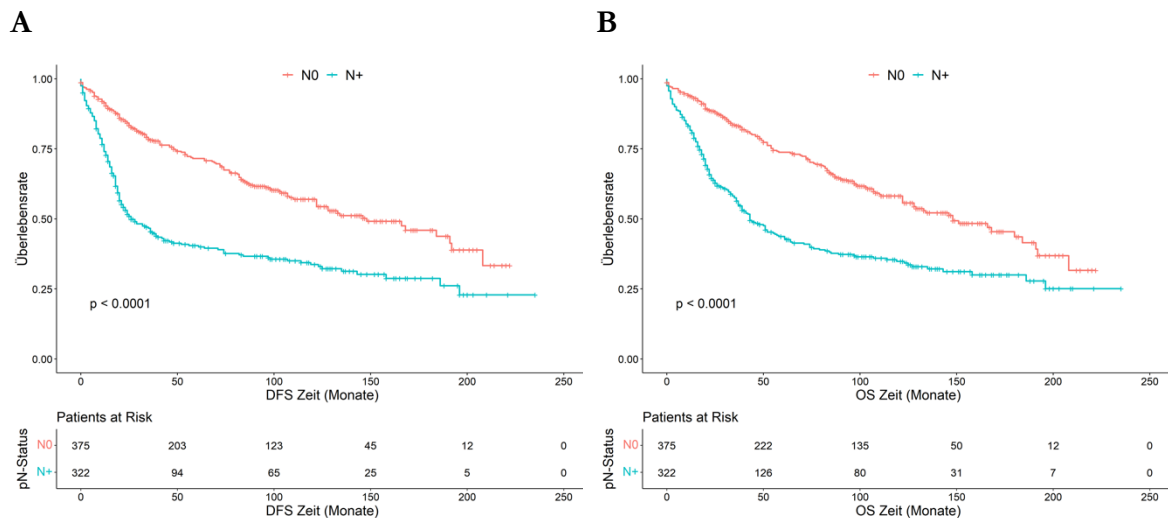


Abbildung 19. Kaplan-Meier-Schätzer des DFS und OS in Abhängigkeit des Nodalstatus

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit des Nodalstatus (pN-Status) N0 und N+ (gruppiert N1 und N2) des **(A)** DFS ($p < 0,0001$) und **(B)** OS ($p < 0,0001$, $n = 697$)

In der Betrachtung des Nodalstatus konnte gezeigt werden, dass befallene Lymphknoten die postoperative Überlebenszeit stark verkürzten und die Erkrankten im Vergleich zur pN0-Gruppe bereits deutlich früher verstarben. Die in Abbildung 19 dargestellten Kaplan-Meier-Kurven des DFS in der Betrachtung des Nodalstatus zeigten einen deutlich steileren Abfall als die Kurven des OS, woraus sich ableiten ließ, dass ein *positiver* Nodalstatus vor allem mit einer

Verkürzung der Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs, auch im Sinne einer Fernmetastase, assoziiert war.

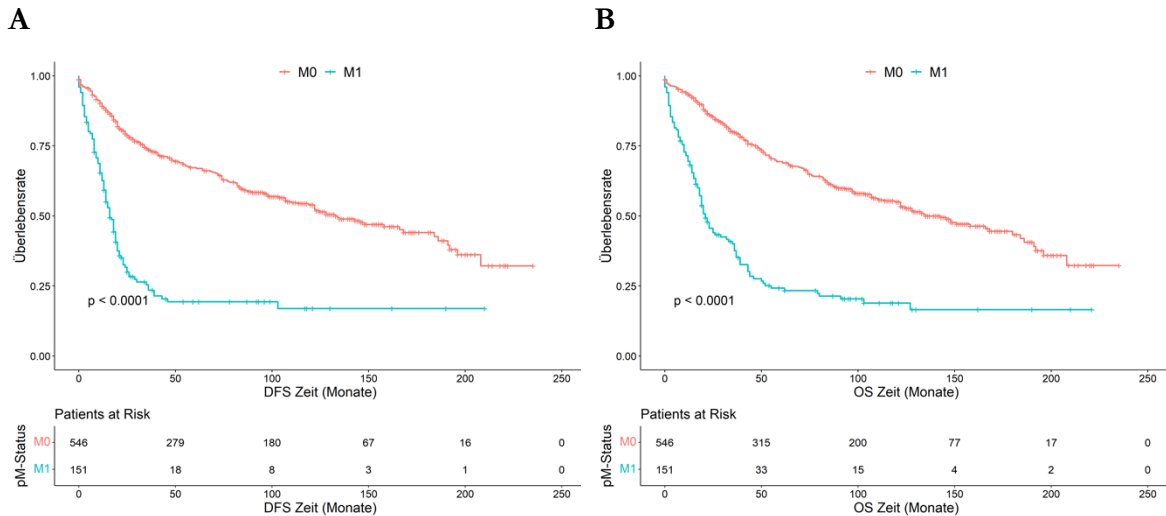


Abbildung 20. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus
Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus (pM-Status) M0 und M1 des **(A)** *DFS* ($p < 0,0001$) und **(B)** *OS* ($p < 0,0001$, $n = 697$)

Die stärkste Korrelation konnte zwischen dem Metastasierungsstatus und der Überlebenszeit aufgezeigt werden. Betrug die mittlere Überlebensrate nach 60 Monaten für M0-Stadien 48,5% (265/546), so lag sie bei M1-Tumoren bei nur 10,6% (16/151).

In der Gesamtbetrachtung der Kaplan-Meier-Kurven ließ sich erkennen, dass die Überlebensrate besonders in den ersten 60 Monaten nach Operation stark mit den klinikopathologischen Parametern korrelierte (Abbildung 20).

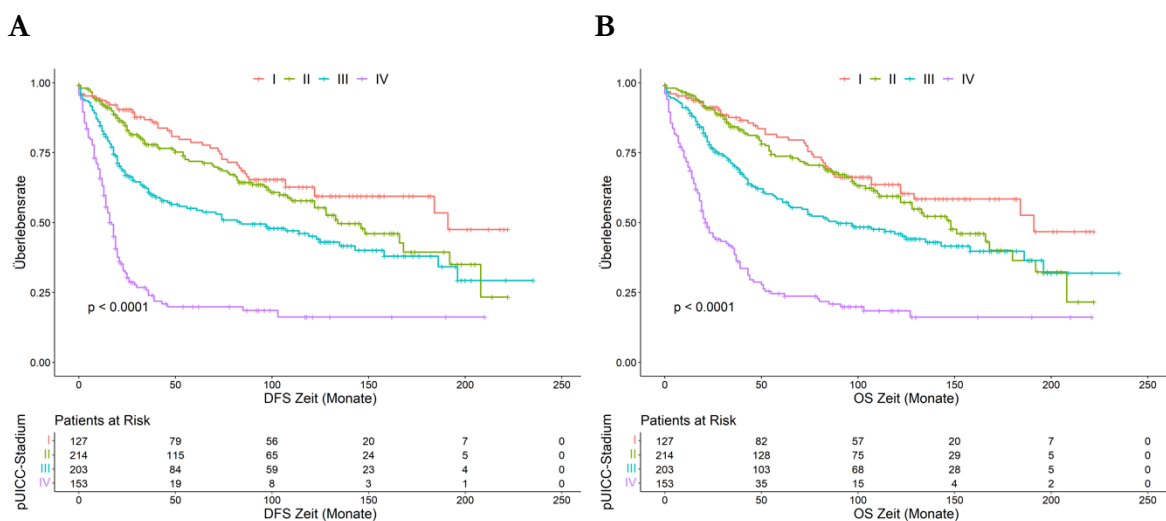


Abbildung 21. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit des UICC-Stadiums
Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit des UICC-Stadiums I, II, III, IV des **(A)** *DFS* und **(B)** *OS* ($p < 0,0001$, $n = 697$)

In der Betrachtung des pUICC-Stadiums wurde dies besonders deutlich. Während im pUICC-Stadium I nach 60 Monaten von 127 Patienten noch 77 (60,6%) und nach 120 Monaten noch 39 Patienten lebten (30,7%), war das Überleben im Stadium pUICC IV zu den gleichen Betrachtungszeitpunkten enorm vermindert (Abbildung 21). Von ursprünglich 153 Patienten lebten nach 60 Monaten lediglich 17 Patienten (11,1%), nach 120 Monaten überlebten nur noch 5 (3,26%). In den Kaplan-Meier-Kurven spiegelte sich dies durch einen starken initialen Abfall der Überlebensrate dar, welche im Verlauf abflachte und zeigte, dass insbesondere in den ersten 5 Jahren nach Operation das Risiko zu versterben am größten war.

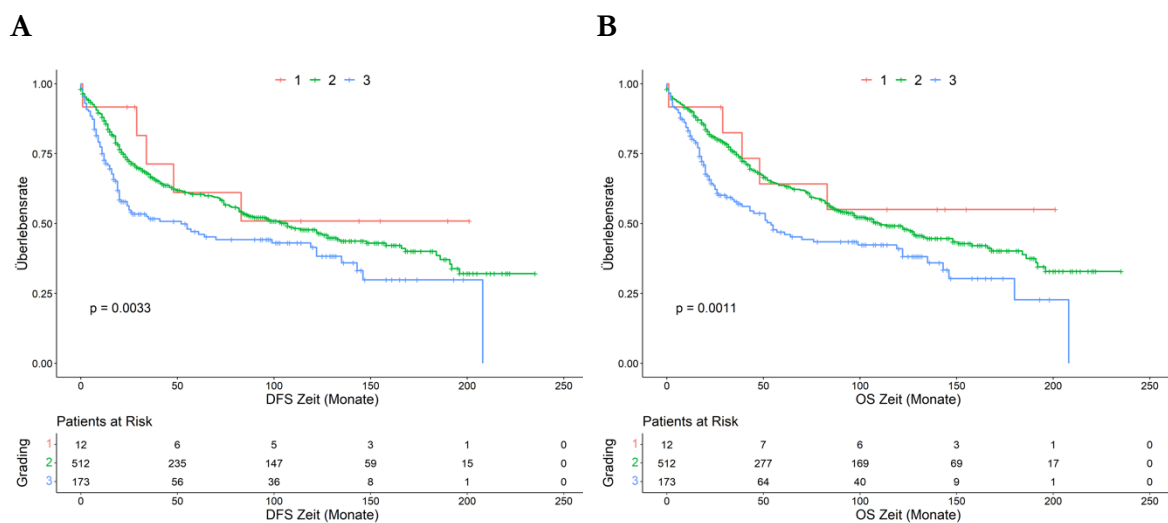


Abbildung 22. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit des Gradings

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit des Gradings G1, G2 und G3 des **(A)** *DFS* ($p < 0,0033$) und **(B)** *OS* ($p < 0,0011$) ($n = 697$)

Das Grading des Tumors zeigte im Vergleich zu den anderen Variablen eine eher schwache Korrelation mit der Überlebensrate insbesondere in den gut und mäßig differenzierten Tumoren (Abbildung 22). Unterschieden sich die Kaplan-Meier-Kurven für das Grading 1 und 2 in den ersten 120 Monaten nur gering voneinander, veränderten sich die Kurven nach 120 Monaten deutlich und es zeigte sich ein starker Abfall der Überlebensrate für Tumore des Gradings 2, womit das Grading im untersuchten Patientenkollektiv erst hinsichtlich des Langzeitüberlebens eine entscheidende Rolle einzunehmen schien. Das Grading 3, also undifferenzierte Karzinome, zeigte bereits in den frühen Monaten einen starken Abfall der Überlebensraten im Vergleich zu den besser differenzierten Tumoren.

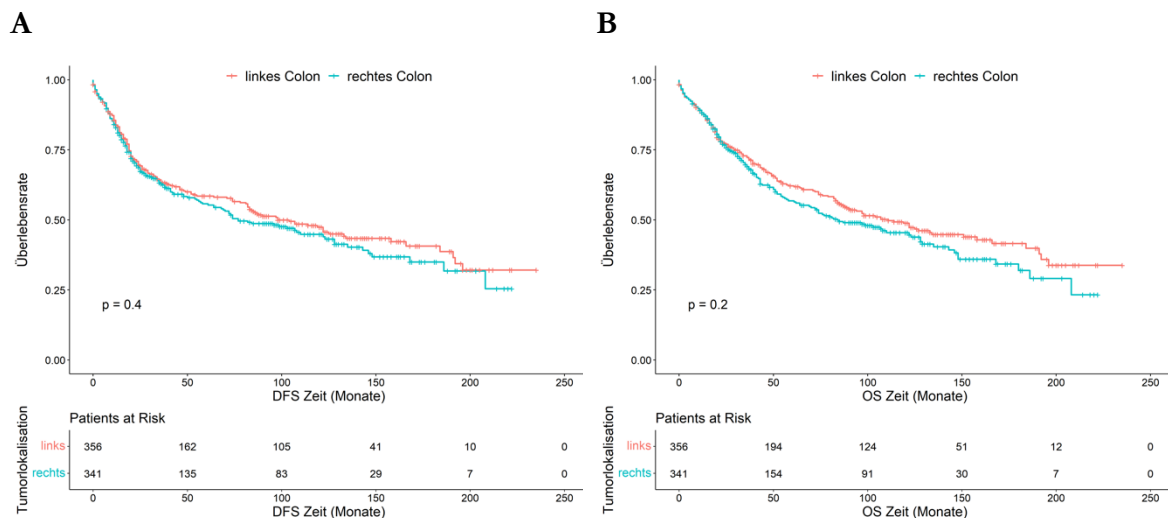


Abbildung 23. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Tumorlokalisation rechtes versus linkes Colon

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit der Tumorlokalisation rechtes Colon (gruppiert Coecum, Colon ascendens, rechte Flexur, Colon transversum) und linkes Colon (gruppiert linke Flexur, Colon descendens, Sigma, Rektum) des **(A)** *DFS* ($p < 0,4$) und **(B)** *OS* ($p < 0,2$) ($n = 697$)

Wie in Abbildungen 23 dargestellt, konnte zwischen der Lokalisation des Tumors (linkes Colon versus rechtes Colon) und der Überlebensrate nach 60 Monaten in den betrachteten Daten kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,4$) nachgewiesen werden. So lag das Überleben nach 60 Monaten bei rechtsseitigen Karzinomen bei 37,5% (128/341), während es bei linksseitigen Tumoren 33,6% (153/356) betrug. Das Überleben nach 120 Monaten lag bei den rechtsseitigen Tumoren bei 16,12% (55/341) lag, während es bei linksseitigen Tumoren 23,87% (85/356) betrug, auch wenn eine deutliche Divergenz erkennbar war, so lag diese mit $p = 0,2$ weiterhin unter dem Signifikanzniveau.

3.5. Disease-free-survival und Overall-survival in Abhängigkeit der Expression von Proteinen aus der Glykolyse und von EGFR-Proteinen

Die identifizierten Präparate wurden einer Proteinexpressionsanalyse unterzogen (s. Abschnitt 2.5). Es zeigten sich teils signifikante Unterschiede hinsichtlich *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Ausprägung der Proteinexpression. Die Darstellung erfolgte anhand von Kaplan-Meier-Kurven im Zeitintervall des Betrachtungszeitraumes (bis maximal 250 Monate) mit gleichzeitiger Darstellung der *Patients at Risk*. Die Grafiken stellen dar, wie viele Patienten zum beobachteten Zeitraum noch am Leben waren.

Um die Ergebnisse zu veranschaulichen, wurden die Patienten anhand der Stärke der Proteinexpression in zwei Gruppen aufgeteilt, in eine Gruppe von Tumoren mit niedriger und

in eine Gruppe mit hoher Proteinexpression. Als Grenze zur Unterteilung wurde der Median des jeweiligen Proteins gewählt. Hierdurch ließ sich ebenfalls eine gute Vergleichbarkeit der *Patients at Risk* tabellarisch darstellen, da zum Zeitpunkt 0 die Gruppen jeweils gleich groß waren.

Die untersuchten Proteine umfassen 18 metabolische Proteine der Glykolyse und 3 Proteine aus der EGFR-Familie (ERBB2, ERBB3 und EGFR). Bei den untersuchten metabolischen Proteinen der Glykolyse handelt es sich um:

ALDOA, ALDOB, ALDOC, ENO1, ENO2, GAPDH, GPI, HK1, HK2, HK3, PFKFB2, PFKFB4, PGAM1, PGAM5, PGK1, PGK2, PKLR und *TPI1*.

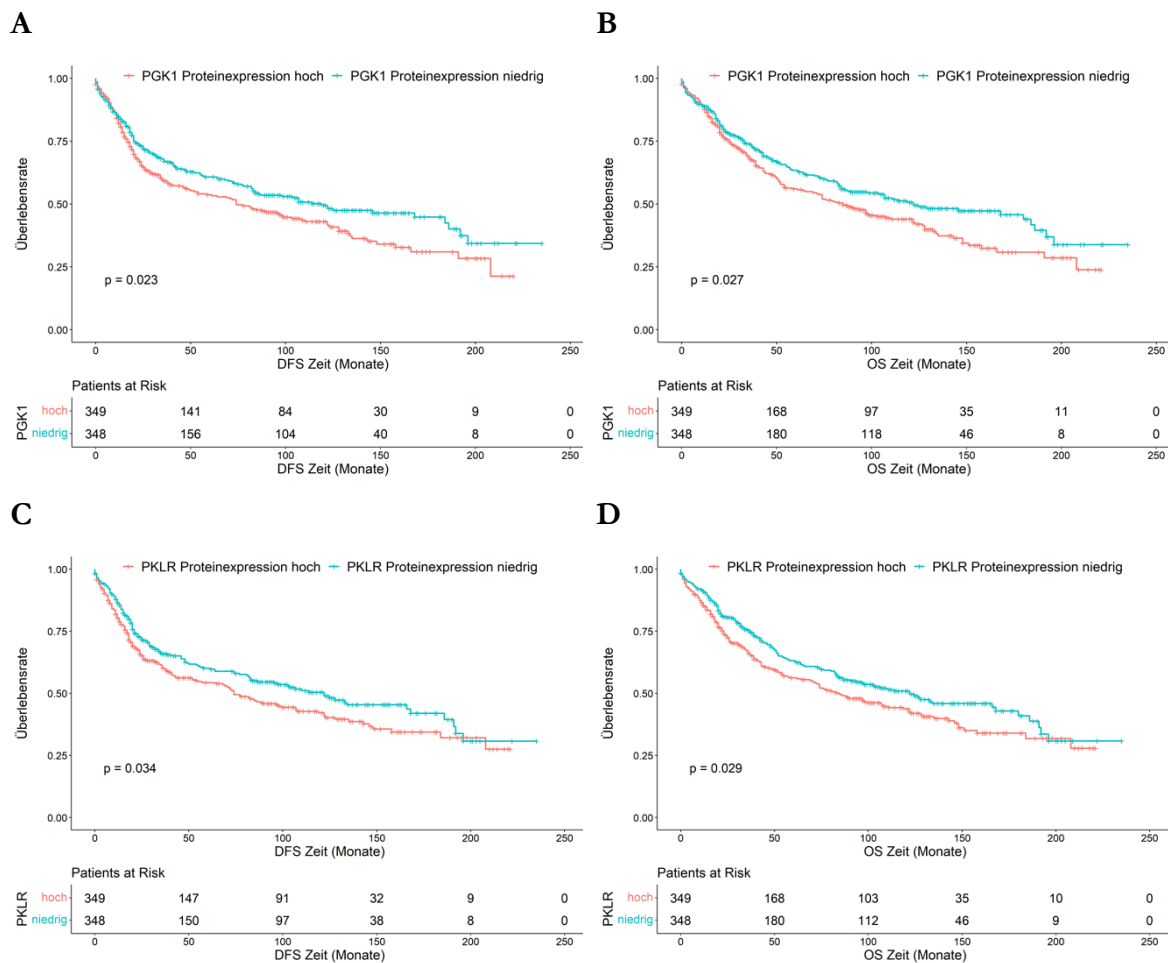


Abbildung 24. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine PGK1 und PKLR

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des **(A)** PGK1, *DFS* ($p < 0,0033$), **(B)** PGK1, *OS* ($p < 0,0011$), **(C)** PKLR, *DFS* ($p < 0,034$) und **(D)** PKLR, *OS* ($p < 0,029$) ($n = 697$)

Bei Betrachtung der einzelnen Proteine aus der Glykolysegruppe konnte bei den Proteinen PKLR, PGK1, HK1, HK3, ENO2 und ALDOB eine signifikante Korrelation der Proteinexpression mit dem *DFS* und *OS* belegt werden.

Der in Abbildung 24 dargestellte Zusammenhang war zwar nur schwach, aber dennoch statistisch signifikant nachweisbar und bestätigte den erwarteten Trend. Je höher die Expression der Proteine PKLR und PGK1, desto stärker sank die Überlebensrate im zeitlichen Verlauf. Weiterhin zeigte sich, dass die Kurven im voranschreitenden Betrachtungsintervall divergierten. Der Effekt der Proteinexpressionsstärke auf die Überlebensrate scheint sich daher besser für die langfristige als für die kurzfristige Prädiktion zu eignen, da vor allem zu Beginn die Kurven der jeweiligen Expressionsgruppen nahezu identisch verliefen und erst zu späteren Betrachtungszeitpunkten eine starke Divergenz zeigten.

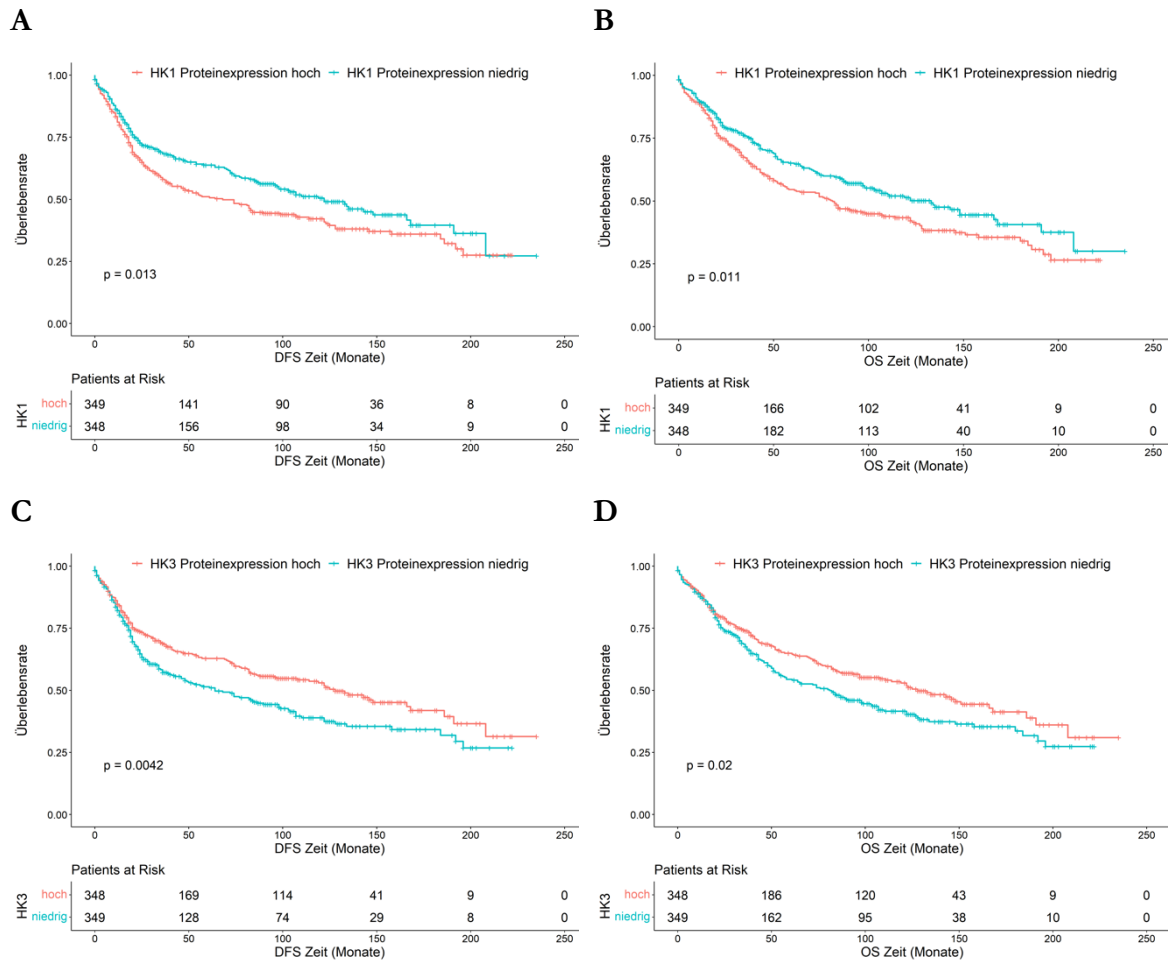


Abbildung 25. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine HK1 und HK3

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse (HK1 und HK3) (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des **(A)** *DFS* ($p < 0,013$), **(B)** *OS* ($p < 0,011$), **(C)** *DFS* ($p < 0,0042$) und **(D)** *OS* ($p < 0,02$) ($n = 697$)

Die Kurven für die Proteinexpression von HK1 und HK3 ähnelten stark den Kurven für die Proteine PKLR und PGK1. Auch hier zeigte sich, dass in den ersten 20 Monaten die Kurven für die hohe und die niedrige Proteinexpression nahezu identisch verliefen. Nach 20 Monaten divergierten die Kurven jedoch wiederum, sodass auch hier dargestellt werden konnte, dass eine erhöhte Proteinexpression von HK1 und HK3 mit einer Verkürzung der Überlebenszeit einherging und die Proteinexpressionsstärke somit möglicherweise als prognostischer Marker relevant werden könnte (Abbildung 25).

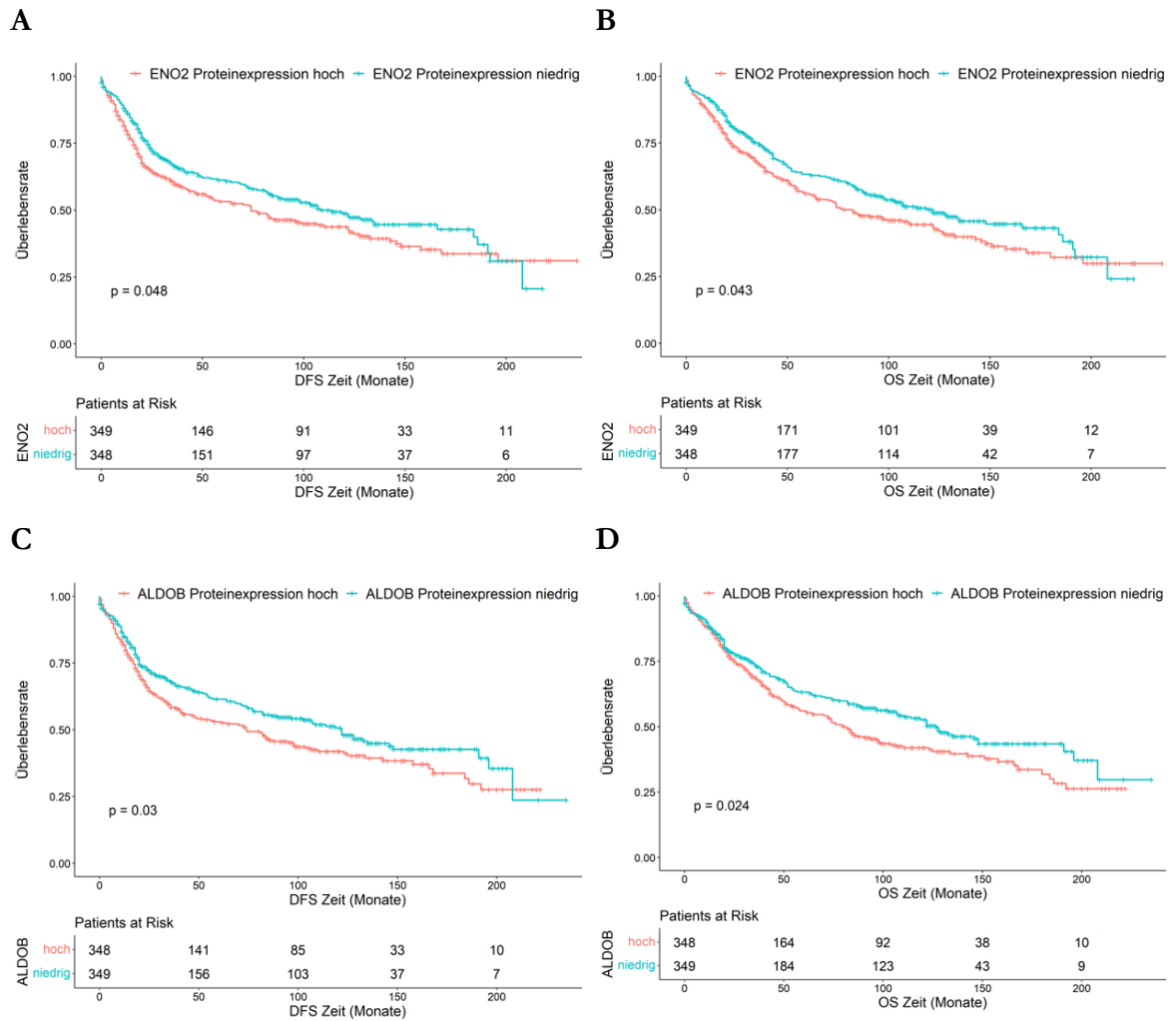


Abbildung 26. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der metabolischen Proteine ENO2 und ALDOB

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen metabolischen Proteine der Glykolyse (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des *DFS* (**A**) ($p < 0,048$) und des *OS* (**B**) für ENO2 ($p < 0,043$) sowie des *DFS* (**C**) ($p < 0,03$) und *OS* (**D**) für ALDOB ($p < 0,024$) ($n = 697$)

Auch die Proteine ALDOB und ENO2 zeigten einen signifikanten Zusammenhang der Überlebensrate mit der Nachbeobachtungszeit (Abbildung 26). Bei ENO2 war der Unterschied im Überleben in Abhängigkeit der Expressionsstärke eher marginal, wie die Darstellung der *Patients at Risk* zeigt. Insgesamt ähnelten sich die Kurven in allen Zeitintervallen sehr stark. Die Expressionsstärke ALDOB hatte einen nur geringfügig größeren Effekt auf die Überlebensrate. In der Gesamtbetrachtung der metabolischen Proteine der Glykolyse konnte keine statistisch signifikante Veränderung hinsichtlich des *DFS* und *OS* nachgewiesen werden.

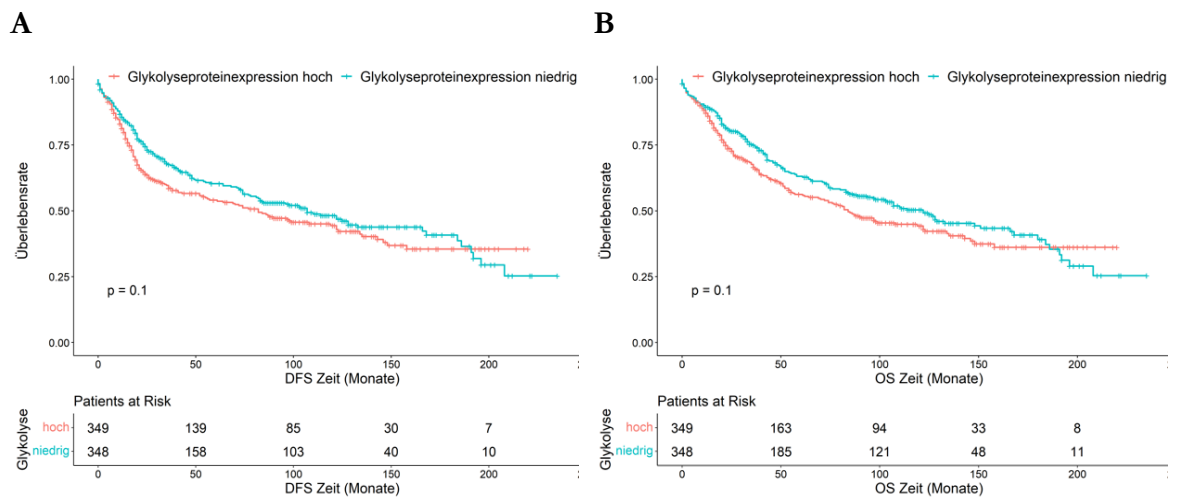


Abbildung 27. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der gesamten metabolischen Proteine der Glykolyse

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der metabolischen Proteine der Glykolyse gesamt (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des **(A)** *DFS* ($p = 0,1$) und **(B)** *OS* ($p = 0,1$) ($n = 697$)

Abbildung 27 zeigt eine Korrelation zwischen *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Expressionsstärke aller untersuchter metabolischer Proteine der Glykolyse und bestätigte damit den erwarteten Trend, dass eine erhöhte Expression der Proteine der Glykolyse mit einer Verringerung der Überlebensrate assoziiert ist. Die Korrelation war mit einem Log-Rang-Test Ergebnis von $p = 0,1$ jedoch nicht statistisch signifikant und zeigte entsprechend nur einen korrelativen Trend.

Bei den 3 untersuchten EGFR-Rezeptorproteinen handelt es sich um die Proteine: *EGFR*, *ERBB2* und *ERBB3*.

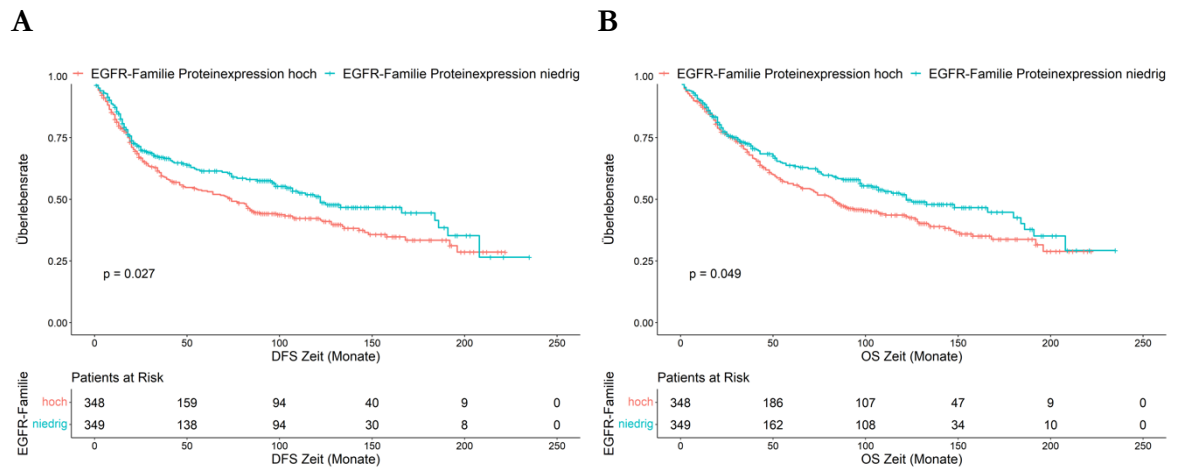


Abbildung 28. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der EGFR-Proteine

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at Risk* in Abhängigkeit Expressionsstärke der Proteine der EGFR-Familie-Gesamt (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des **(A)** *DFS* ($p = 0,027$) und des **(B)** *OS* ($p < 0,049$) ($n = 697$)

Wie in Abbildung 28 dargestellt konnte eine signifikante Veränderung des *DFS* und *OS* in der Gesamtbetrachtung der EGFR-Rezeptorproteine nachgewiesen werden (*DFS* $p = 0,027$; *OS* $p = 0,049$). Der Unterschied war schwach ausgeprägt, was insbesondere anhand der *Patients at Risk* Tabelle dargestellt wurde. Der Unterschied war aufgrund des Signifikanzniveaus jedoch nicht zufälliger Natur, sondern es lag eine statistisch signifikante Korrelation mit der Proteinexpression vor.

Der Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der Proteinexpressionsstärke in der Kaplan-Meier-Kurve ließ sich nur für die kumulierte Proteinexpressionsstärke aller drei EGFR-Proteine zeigen. Analysiert man die Proteine EGFR, ERBB2 und ERBB3 einzeln, so sind die Korrelationen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 29).

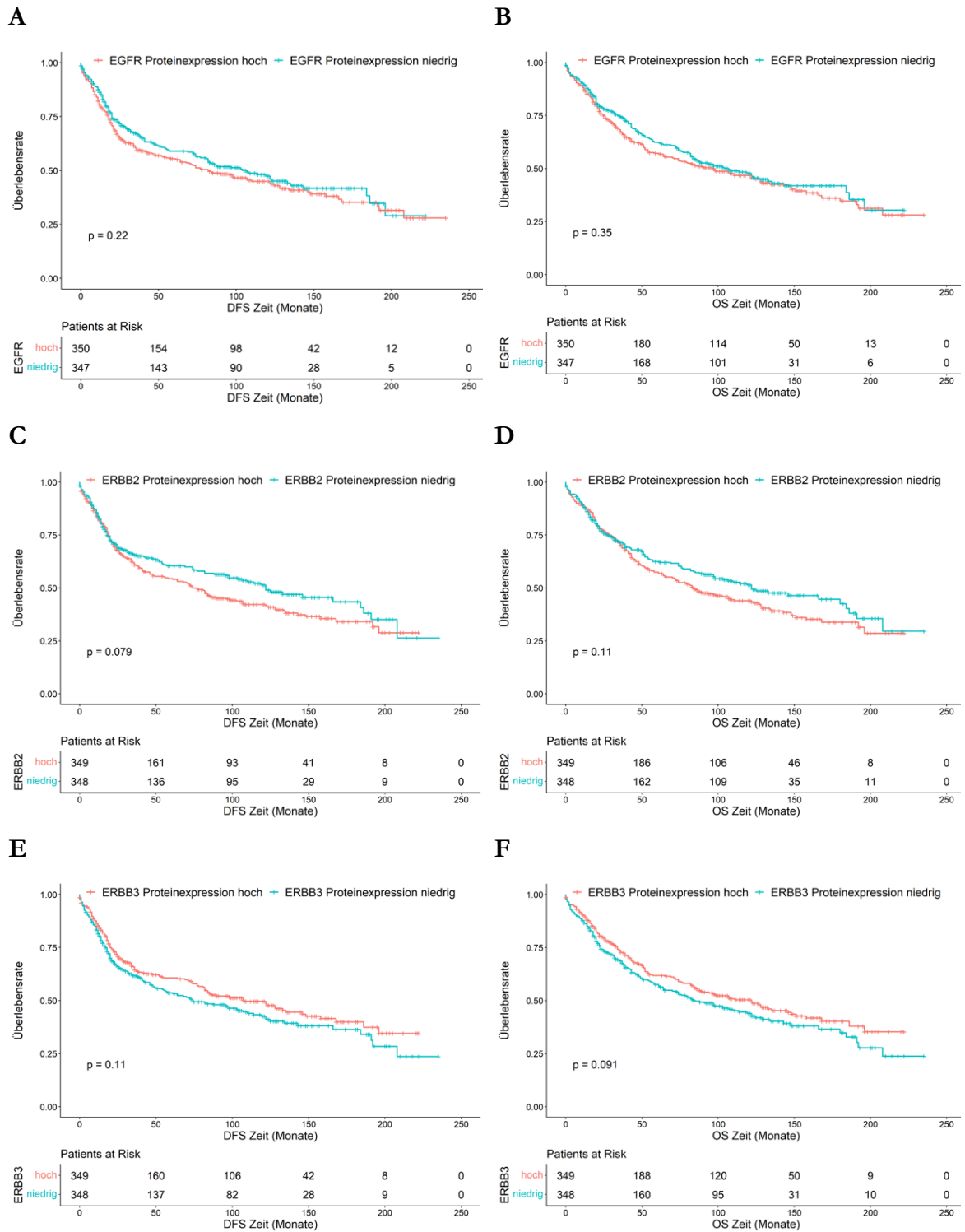


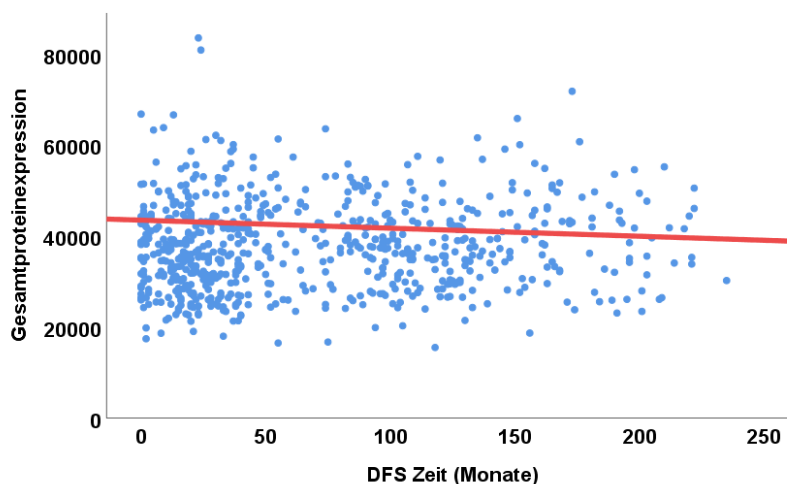
Abbildung 29. Kaplan-Meier-Schätzer des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der einzelnen Proteine der EGFR-Familie

Kaplan-Meier-Schätzer mit *Patients at risk* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen Proteine der EGFR-Familie (niedrige und hohe Proteinexpression, separiert durch Median) des **(A)** EGFR, *DFS* ($p = 0,22$), **(B)** EGFR, *OS* ($p < 0,35$), **(C)** ERBB2, *DFS* ($p < 0,079$), **(D)** ERBB2, *OS* ($p < 0,11$), **(E)** ERBB3, *DFS* ($p < 0,11$) und des **(F)** ERBB3, *OS* ($p < 0,091$) ($n = 697$)

Für die Proteine EGFR und ERBB2 ergab sich in der Kaplan-Meier-Kurve dennoch das zu erwartende Bild einer verkürzten Überlebensdauer bei erhöhter Proteinexpression. Das Protein ERBB3 wies diese Korrelation nicht auf.

Eine weitere Ableitung ließ die Analyse der metabolischen Proteine der Glykolyse- und der EGFR-Proteine zu. Anhand des vorhandenen Datensatzes korrelierten zwar nicht alle Proteine signifikant mit einer Verschlechterung der Überlebensrate, jedoch zeigten sich ebenfalls *keine signifikanten* Korrelationen, welche der Vermutung explizit widersprechen würden.

A



B

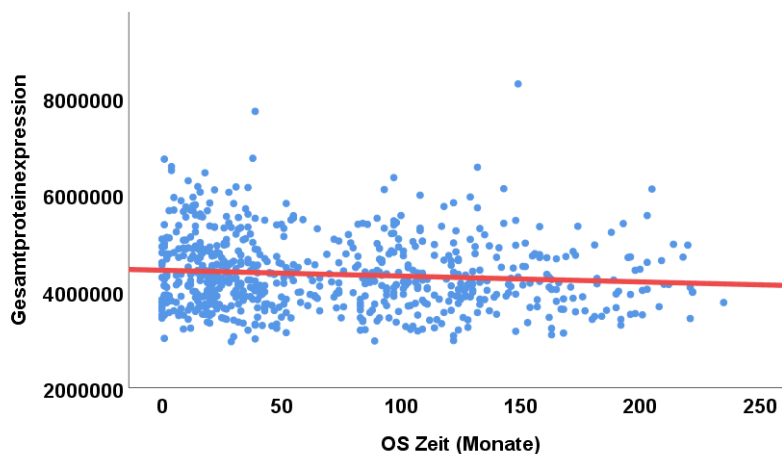


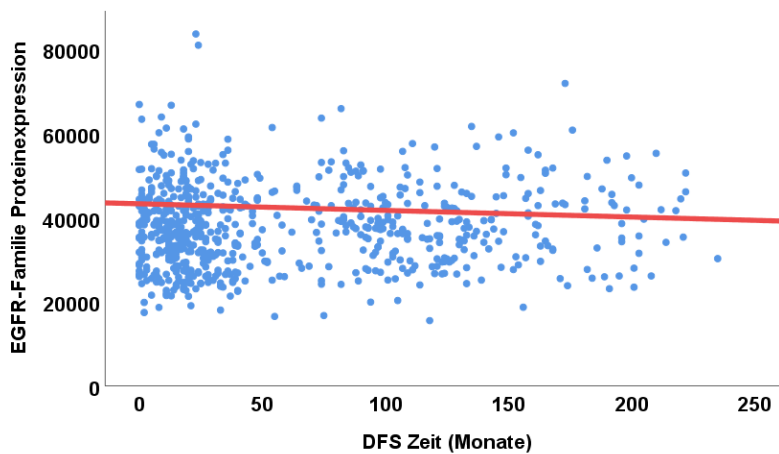
Abbildung 30. Streudiagramm nach Pearson des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression Glykolyse und EGFR-Familie

Streudiagramm nach Pearson mit linearem Zusammenhang von Überlebenszeitanalysen je Gesamtproteineexpression (gruppiert Glykolyse- und EGFR Proteine) des **(A)** *DFS* und des **(B)** *OS* ($n = 697$)

Die Vermutungen aus den Kaplan-Meier-Kurven wurden bestätigt durch metrische Korrelationen (Abbildung 30). Hier zeigte sich, dass zwischen dem *OS* und der Gesamtproteineexpression eine Pearson-Korrelation von $-0,95$ bestand ($p = 0,013$). Anhand des

Vorzeichens und der Steigung der Linie im Histogramm ließ sich postulieren, dass eine höhere Proteinexpression zu einer niedrigeren *OS*-Zeit führte.

A



B

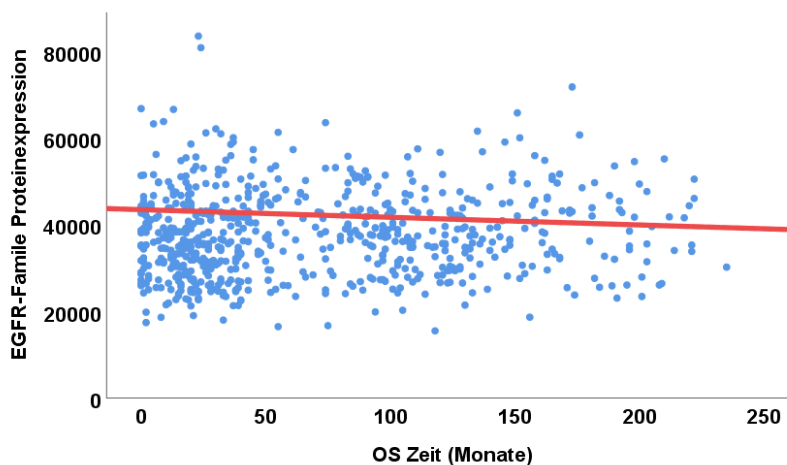


Abbildung 31. Streudiagramm nach Pearson des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression der EGFR-Proteine

Streudiagramm nach Pearson mit linearem Zusammenhang von Überlebenszeitanalysen der Expressionsstärke der Proteine der EGFR-Familie (gruppiert EGFR, ERBB2 und ERBB3) des **(A)** *DFS* und des **(B)** *OS* ($n = 697$)

Zwischen der Proteinexpression von EGFR-Proteinen und dem *OS* zeigte sich ebenfalls ein negativer Zusammenhang. Die Darstellung des Zusammenhanges konnte jedoch lediglich im *Plot* vollzogen werden, da er statistisch nicht signifikant war ($p = 0,512$) und daher als möglicherweise zufällig verworfen werden muss (Abbildung 31).

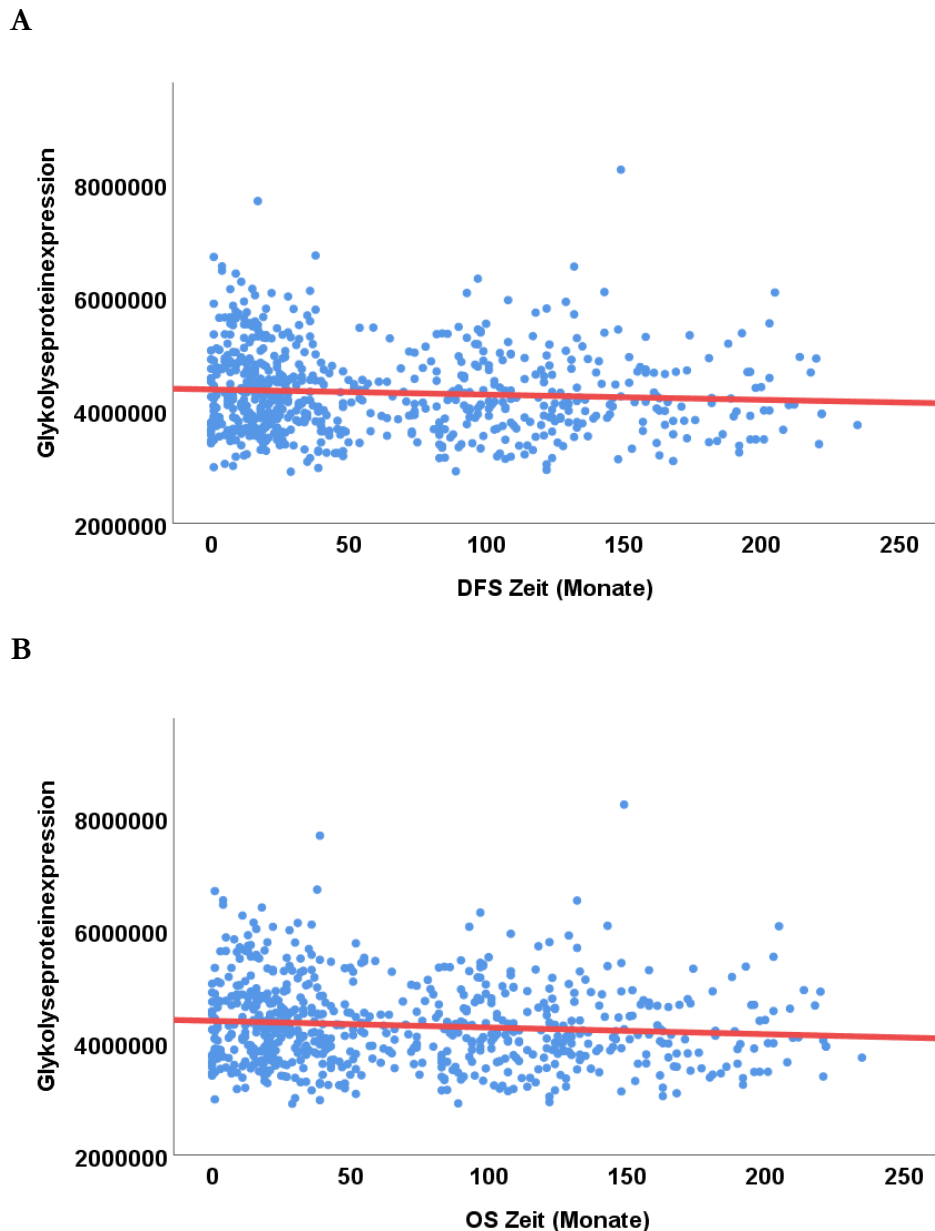


Abbildung 32. Streudiagramm nach Pearson des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression metabolischen Proteine der Glykolyse gesamt

Streudiagramm nach Pearson mit linearem Zusammenhang von Überlebenszeitanalysen der Expressionsstärke der Glykolyseproteine (gruppiert GAPDH, TPI1, PDLR, PGK1, PGAM1, ALDOA, ALDOB, ALDOC, ENO1, HK1, GPI, PGAM5, PGK2, HK2, ENO2, PFKFB2, HK3, PFKFB4) des **(A)** *DFS* und des **(B)** *OS* (n = 697)

Zwischen der Expressionsstärke der metabolischen Proteine der Glykolyse und dem *OS* konnte die vermutete Korrelation nachgewiesen werden (Abbildung 32). Tatsächlich erklärten die Glykolyse-Proteine mit einer Korrelation von -0,93 fast die gesamte Korrelation zwischen der Proteinexpression und der *Overall-Survival-Zeit* (-0,95). Wie durch die Analysen der Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, zeigte sich, dass die Proteine der Glykolyse einen stärker ausgeprägten prädiktiven Wert als die EGFR-Proteine aufwiesen.

4. Diskussion

Die erhobenen Datensätze der insgesamt 697 Patienten wurden zunächst hinsichtlich der klinikopathologischen Parameter zum Operationszeitpunkt und anschließend im Beobachtungszeitraum von maximal 20 Jahre zu definierten Zeitpunkten betrachtet und analysiert, mit dem Ziel ein valides und mit den aus der Literatur vorliegenden Daten kongruentes Patientenkollektiv zu beobachten, in dem eine weitere Analyse innerhalb des *Cancer-Scout*-Projektes möglich ist.

Im Vergleich der Dekaden 2000 - 2010 und 2010 - 2020 wurde betrachtet, ob sich anhand des untersuchten Kollektivs Unterschiede hinsichtlich der Effektivität der Vorsorgemaßnahme und der erweiterten Therapiekonzepte durch zielgerichtete Therapien im Sinne einer vermehrten Detektion der Tumore in früheren Tumorstadien und einer Verbesserung der Prognosen beispielsweise durch die Einführung der zielgerichteten Therapien mit monoklonalen Antikörpern wie *Cetuximab* und *Bevacizumab* abbilden ließen. Vor dem Hintergrund des seit 2002 in Deutschland etablierten Screenings zur Darmkrebsvorsorge und den neuen Therapieoptionen stellte sich die Frage, ob sich Veränderungen durch frühere Tumorstadien und in den Überlebenszeitkurven als Hinweise für die Effektivität der Therapien, darstellen lassen würden (Gemeinsamer Bundesausschuss 2022).

Um dies zu erreichen, wurden zunächst die klinikopathologischen Parameter des betrachteten Kollektivs in Form des Tumorstadium, des Nodalstatus, des Metastasierungsstatus, des UICC-Stadiums, des Grading sowie der Lokalisation analysiert (vgl. 3.4), dargestellt und mit den aus der Literatur bekannten Werten verglichen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Analyse der klinikopathologischen Parameter und die durch das Follow-Up erstellten Überlebenszeitanalysen betrachtet und in Bezug zur Literatur gesetzt und diskutiert werden.

In dem umfassenden und noch recht neuen Feld der *Proteomics* besteht ein weitergehender Forschungsbedarf (Aslam et al. 2017). Stand heute ist die Zahl der Studien zur Proteinexpressionsanalyse noch klein und große generalisierte Datensätze hinsichtlich der Expressionsmuster von Tumoren fehlen in vielen Fällen (Vasaikar et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die erhobenen Datensätze mit einer Proteinexpressionsanalyse der metabolischen Proteine der Glykolyse und der EGFR-Rezeptorproteine in Abhängigkeit von Tumorstadium, Nodalstatus, Metastasierungsstatus, Grading und Lokalisation untersucht, mit dem Ziel erhöhte Proteinexpressionen tumorabhängig zu identifizieren. Durch die anschließenden Betrachtungen des *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpressionsstärke wurde der Einfluss der Proteinexpression der Glykolyse- und EGFR-Proteine auf die Überlebenszeit analysiert und der Frage nachgegangen, ob prinzipiell ein therapeutischer Ansatz

an diesen Proteinen zu einer Veränderung der Prognose im Sinne einer Verlängerung der Überlebenszeit führen könnte beziehungsweise wie generell eine erhöhte Proteinexpression der Glykolyse und der EGFR-Proteine mit der Überlebenszeit korrelieren.

Es wird die Frage diskutiert, ob sich die im vorliegenden Datensatz erhobenen Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen vergleichen lassen und ob aufgrund der Proteinexpressionen mögliche neue Ansatzstellen für zukünftige diagnostische Instrumente und zielgerichtete Therapien zu überlegen sind und in welchen Fällen eine gezielte Diagnostik im Sinne einer *Proteomics*-Analyse sinnvoll und ökonomisch erscheint. Wiederum ist zu diskutieren inwiefern das Fehlen signifikanter Unterschiede zu erklären ist und wo weitergehend Ansatzpunkte für zukünftige Forschungsvorhaben resultieren und wie sich diese begründen.

4.1. Charakteristika des Patientenkollektivs

Das betrachtete Patientenkollektiv setzte sich weitestgehend analog zu den aus der Literatur bekannten weltweiten und deutschen Inzidenz- und Mortalitätsraten des KRK zusammen (Siegel et al. 2020).

Die Verteilung der Tumore auf die Geschlechter lag im betrachteten Datensatz mit einer Verteilung von 58,7% (n = 409) Männern zu 41,3% (n = 288) Frauen ähnlich zu der Geschlechterverteilung in Deutschland aus dem Jahr 2016, welche durch das Zentrum für Krebsregisterdaten publiziert wurde (altersstandardisierte Erkrankungsrate von 50,7/100.000 Einwohner bei Männern und 31,8/100.000 Einwohner bei Frauen) (Katalinic 2021).

Betrag im hier untersuchten Patientenkollektiv das mittlere Erkrankungsalter 68 Jahre, so lag dies gering unter dem mittleren Erkrankungsalter im Jahr 2016 von 76 Jahren bei Frauen und 72 Jahren bei männlichen Patienten. Ein Inzidenzschwerpunkt ließ sich im untersuchten Kollektiv entsprechend jenseits des 60. Lebensjahres finden, bei 61 untersuchten Patienten lag das Erkrankungsalter unter dem 50. Lebensjahr und in der Betrachtung der Patienten unter dem 60. Lebensjahr wurden 178 Fälle identifiziert. Keineswegs sollte angesichts einer Altersspanne zwischen dem 11. und 96. Lebensjahr folglich von einer reinen Erkrankung des Alters gesprochen werden. Angesichts dieser Verteilung und der durch Wong et al. 2021 beschriebenen steigenden Inzidenzraten vor allem bei jüngeren Patienten, gilt es zu überlegen, inwiefern die bereits bei Risikopatienten angewandten Screeningmaßnahmen, auf neue Patientengruppen in Abhängigkeit von Risikomarkern ausgeweitet werden sollten. Da zunehmend Lebensstil-assoziierte Risikofaktoren und Vorerkrankungen, wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, neben den familiären Prädispositionen oder genetischen Variationen das Auftreten von KRK bereits bei jüngeren Patienten zu begünstigen scheinen,

besteht ein Bedarf die Screeningmaßnahmen auf weitere Patientengruppen zu erweitern und bereits im jüngeren Alter zu beginnen (Mauri et al. 2019).

Der untersuchte Datensatz zeigte ebenfalls übereinstimmend mit der Literatur, dass die Karzinome vor allem in den frühen Stadien, d.h. ohne Vorliegen einer Fernmetastasierung, pUICC II 31% (n = 214) und pUICC III 29% (n = 203) diagnostiziert und operiert wurden, während im Jahr 2016 in Deutschland 54% aller KRK in den Stadien II und III, 27% im Stadium IV und 19% im Stadium I diagnostiziert wurden (Cardoso et al. 2021).

Dies scheint die Effektivität der Vorsorgealgorithmen zu bestätigen und die Prognose im Vergleich zu fortgeschritten diagnostizierten Tumoren entsprechend deutlich zu verbessern, auch wenn zeitgleich zusätzlich die Überlebenszeit in den fortgeschrittenen Stadien in den vergangenen Jahrzehnten durch die verbesserten und vielfältigen therapeutischen Optionen verlängert werden konnte (Siegel et al. 2021).

Ein Nodalbefall konnte im untersuchten Kollektiv zum Operationszeitpunkt in 54% der Fälle (n = 375) ausgeschlossen werden, während ein pN1-Befall in 24% (n = 165) und ein pN2-Befall in 23% (n = 157) vorlag. Im untersuchten Kollektiv konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der untersuchten Lymphknoten und der Überlebenszeit gezeigt werden ($p = 0,012$), so dass wiederum die auch in den Leitlinien empfohlene ausreichende Anzahl entnommener Lymphknoten als wichtiger prädiktiver Marker bestätigt wird, was so auch die *Intergroup*-Studie INT-0089 beschrieben hatte (Le Voyer et al. 2003).

Der Großteil der untersuchten Tumore war mit 73% der Fälle mittelgradig differenziert (n = 512), während entdifferenzierte Karzinome in 25% der Fälle (n = 173) vorlagen, was ebenso einen wichtigen prognostischen Faktor darzustellen scheint.

Zum Zeitpunkt der Operation lag in 19,6% der Fälle (n = 137) bereits eine Fernmetastasierung vor. Angesichts der therapeutischen Relevanz und des negativen prognostischen Wertes zeigt dies die weitere Notwendigkeit der frühzeitigen Vorsorge- und Screening-Maßnahmen zur Erkennung des KRK in frühen Stadien sowie die Notwendigkeit der Einführung neuer therapeutischer Optionen, um auch in diesen Fällen die Perspektiven hinsichtlich Überlebenszeit und Lebensqualität verbessern zu können und dies ebenfalls auch mit ökonomischer Effizienz im Sinne einer adäquaten Diagnostik und Therapie.

4.2. DFS und OS in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter

Das DFS und OS wurde anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und dieses in Abhängigkeit von Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Metastasierungsstatus, UICC-Stadium, des Gradings und der Lokalisation analysiert und betrachtet.

Es zeigte sich, dass wie angenommen vor allem ein höheres Tumorstadium mit einer verschlechterten Prognose im Sinne einer stark verkürzten Lebenszeit einherging. Insbesondere im Stadium pT4 wurde durch ein OS von lediglich 31% (39/124) zum Betrachtungszeitpunkt 50 Monate post operationem im Vergleich zu einer Überlebensrate von 68% (21/31) im Stadium pT1, 62,4% (78/125) bei pT2 und 50% (210/417) für pT3 Tumoren deutlich ($p < 0,0001$), dass insbesondere die Verkürzung der Überlebenszeit vor allem mit dem Vorliegen eines Lymphknotenbefalls oder einer Fernmetastasierung assoziiert war. Während in der Gruppe der pT1-Tumore ($n = 31$) das DFS und OS über den gesamten Betrachtungszeitraum von maximal 250 Monaten weitestgehend gleich verhielten und nur eine schwache und langsame Verkürzung der Überlebenszeit zeigten, konnte, analog zur Annahme der sich Stadien-abhängig verschlechternden Überlebenszeit, in den fortgeschrittenen Tumorstadien gezeigt werden, welche drastischen Verkürzungen des DFS und OS resultierten (Schmoll und Arnold 2006).

Weitestgehend analog zum OS verlief, wie erwartet, das DFS in den verschiedenen Stadien. Die Kurven des DFS zeigten im Vergleich zum OS bereits einen frühzeitigeren Abfall, was sich durch das Auftreten von Rezidiven, welche in Folge oftmals zum Versterben des Patienten führen, erklären lässt ($p < 0,0001$). Aus den Darstellungen des Grundes des Versterbens (tumorbedingt oder nicht), in der Betrachtung des Auftretens und des Auftrittszeitpunktes von Rezidiven ließ sich dies bestätigen.

Mit dem Nachweis einer lymphogenen Metastasierung, in der Analyse zusammengefasst als pN+ versus pN-, konnte gezeigt werden, dass ein Lymphknotenbefall bereits nach kurzer Zeit zu einer starken Verkürzung des Überlebenszeitraums führt, wobei ebenfalls zunächst vor allem ein Abfall im DFS zu verzeichnen ist. Das krankheitsfreie Überleben zum Betrachtungszeitpunkt nach 50 Monaten betrug bei Vorliegen eines Nodalbefalles 29,2% (94/322) während es ohne Lymphknotenbefall bei 54,1% (203/375) lag ($p < 0,0001$). Dies weist daraufhin, dass durch den Nodalbefall das Risiko für das Auftreten eines Rezidivs stark erhöht ist und dies auch mit einer entsprechenden Verschlechterung der Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit einher geht. Zum selben Betrachtungszeitpunkt waren in der Gruppe der Patienten mit Nodalbefall 39,1% am Leben, während es in der Gruppe der Patienten ohne Nodalbefall 59,2% (222/375) waren ($p < 0,0001$).

Umso wichtiger erscheint, auch in Betrachtung der Abhängigkeit der Überlebenszeit von der Anzahl der untersuchten Lymphknoten, die frühzeitige Detektion mit anschließender onkologischer Resektion des Tumors sowie der Lymphknoten. Angesichts der sich mit dem Vorliegen eines Lymphknotenbefalls stark verschlechternden Prognose und verkürzten Überlebenszeit stellt der Nodalbefall einen essenziellen prädiktiven Marker hinsichtlich der adäquaten Therapie dar (Caplin et al. 1998).

Hinsichtlich des Metastasierungsstatus zeigte sich, dass das Vorliegen einer Fernmetastasierung zum Operationszeitpunkt ($n = 151$) den negativsten prognostischen Marker für das krankheitsfreie Überleben und die Überlebenszeit darstellt. Konnte lediglich bei 11,9% (18/151) der Patienten mit Fernmetastasierung nach 50 Monaten ein krankheitsfreies Überleben gezeigt werden, so betrug dies in der Gruppe ohne synchrone Metastasierung 51,1% (279/546) ($p < 0,0001$). Zum selben Zeitpunkt waren in der Gruppe der Patienten mit Metastasierung 21,9% (33/151) der Patienten am Leben, im Vergleich zu 57,7% (315/546) der Patienten ohne Nachweis synchroner Metastasen ($p < 0,0001$). Entsprechend kann derzeit in diesen oftmals komplexen Situationen nur eine Verlängerung der Lebenszeit durch CTx, Konversionstherapie und nachfolgenden (Teil-)Resektionen im Sinne der Metastasen Chirurgie ermöglicht werden, auch wenn durch die sich weiterentwickelnden operativen Ansätze der Metastasen Chirurgie und Dank der personalisierten Therapien insgesamt eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit erzielt werden kann (Graeter und Friedel 2016).

Zur Unterscheidung ob eine adjuvante CTx, mit ihren möglichen Nebenwirkungen, indiziert ist, zeigte sich im untersuchten Kollektiv, dass sich sowohl das Krankheitsfreie- als auch das Gesamtüberleben in einer starken Abhängigkeit vom UICC-Stadium befinden. Während das DFS nach 50 Monaten in den Stadien I und II 62% (79/127) bzw. 53,7% (115/214) betrug, lag dies in den Stadien III und IV bei 41,3% (84/203) bzw. nur 12,4% (19/153) ($p < 0,0001$) und bestätigte ebenfalls, dass ein höheres Tumorstadium mit einem signifikant frühzeitigeren Auftreten von Rezidiven assoziiert ist und eine systemische Therapie in den pUICC III und IV indiziert erscheint (André et al. 2015).

Das frühere Auftreten von Rezidiven bedingte auch die Kurven des OS, welche sich wiederum weitestgehend analog zum DFS darstellten und damit ebenfalls eine starke Abhängigkeit vom Tumorstadium zeigten. Lag nach 50 Monaten das OS im Stadium I bei 64,5% (82/127), betrug es in den Stadien II, III und IV 59,8% (128/214), 50,7 (103/203) und 22,9% (35/153) ($p < 0,0001$) und zeigt wieder die insgesamt schlechtere Prognose der fortgeschrittenen Stadien und, dass weitergehend auch heute noch die Notwendigkeit zur Verbesserung und Erweiterung der therapeutischen Optionen von hohem Stellenwert ist (Ettrich und Seufferlein 2016).

Die Betrachtung der Differenzierungsgrade zeigte, dass sowohl gut als auch mittelgradig differenzierte Tumore vor allem in den ersten 100 Monaten nach Erstdiagnose ähnliche Verläufe in der Überlebenszeit zeigten und erst danach ein starker Abfall in der Überlebenszeit in der Gruppe der G2-Tumore nachweisbar war. Als Faktor kommt wiederum ein häufigeres Auftreten von Rezidiven infrage, welches möglicherweise aufgrund des Vorliegens einer Mikrometastasierung zu erklären und vor allem bei höhergradigen Tumorstadien anzunehmen ist (Nieroda et al. 1998).

Entdifferenzierte Tumoren haben insgesamt eine sehr schlechte Prognose, was sich in den vorliegenden Ergebnissen der Analysen statistisch signifikant und als frühzeitig abfallende Kaplan-Meier-Kurven des *DFS* ($p < 0,003$) und *OS* ($p < 0,001$) darstellen ließ, so dass im untersuchten Kollektiv nach 50 Monaten nur noch 37% der Patienten mit entdifferenzierten Tumoren (64/173) am Leben waren, während die Überlebenszeit (*OS*) bei gut differenzierten Tumoren 58% (7/12) und bei mittelgradig differenzierten Tumoren 54% (277/512) betrug.

Im Gegensatz dazu, dass vor allem rechtsseitig lokalisierte Tumore, häufig aufgrund von BRAF-Mutationen und MSI-H, mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, konnte im beobachteten Kollektiv ($p = 0,4$) keine lokalisationsabhängige Verschlechterung der Prognosen beobachtet werden (Lo et al. 2016). Zwar zeigte sich, dass sich die vermuteten Trends auch in den Graphen darstellen ließen, alle Werte lagen jedoch unter dem Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

Im untersuchten Kollektiv konnten die Empfehlungen der Leitlinien und Publikationen nachvollzogen werden. Umgekehrt scheinen die analysierten Werte das Ergebnis der standardisierten Vorsorgealgorithmen und der erweiterten therapeutischen Möglichkeiten zu sein, was sich durch die Mehrzahl, der in den pUICC-Stadien II und III diagnostizierten Tumoren widerspiegelt. Zu welchen Teilen die mitunter signifikanten Verbesserungen des *DFS* und *OS* in den vergangenen Jahrzehnten durch das intensiviertere und verbesserte Vorsorgescreening oder durch die vielseitigen modernen Therapieoptionen zurückzuführen ist, kann möglicherweise nur in einem größeren Kollektiv oder in einem erweiterten Betrachtungszeitraum, nämlich im Vergleich vor Einführung der Anwendung von *Cetuximab* und *Bevacizumab*, beurteilt werden.

4.3. Proteinexpression in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter

Angesichts der heute zur Verfügung stehenden Methoden in der *Proteomics*-Diagnostik wurden die Tumorproben des vorliegenden Datensatzes durch eine Proteinexpressionsanalyse im Sinne einer *Untargeted Proteomics* untersucht, wobei die Tumore dabei einer umfassenden Analyse aller nachweisbaren Proteine unterzogen wurden. Da die *Proteomics* ein noch junges Forschungsfeld darstellt, fehlen mitunter bis heute große Datensätze, so dass zum einen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der Proteinexpression und zum anderen das Erstellen von Vergleichswerten an Relevanz gewinnt. Ein Vergleich mit der Literatur ist derzeit aufgrund der fehlenden Daten kaum möglich.

Insgesamt konnten an den 1000 untersuchten Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Präparaten 8.602 Proteine, 109.190 Peptide und 198.248 Peptideisenvarianten detektiert, 7.611 Proteine, 99.822 Peptide und 179.949 Peptideisenvarianten quantifiziert und folglich die Proteinexpressionsstärke dargestellt werden. Die Expressionsdaten der 697 Patienten des nachbeobachteten Kollektivs wurden systematisch analysiert und für jeden klinikopathologischen Parameter jeweils eine Gruppe mit niedriger und eine mit hoher Proteinexpression untersucht und dargestellt.

Wie vorhergehend beschrieben, wurden im Rahmen dieser Analyse gezielt 3 Proteine aus der Familie der EGFR-Rezeptorproteine sowie 18 in der Glykolyse relevante Proteine untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Stärke der Proteinexpressionen in Abhängigkeit der betrachteten Parameter signifikant unterscheidet.

In der Gesamtbetrachtung der Glykolyseproteine zeigte sich, dass eine erhöhte Proteinexpression in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter statistisch signifikant für das Tumorstadium, das Grading und die Lokalisation links versus rechts nachweisbar war und mit einer Verkürzung des *DFS* und *OS* assoziiert war. Für den Nodalbefall, den Metastasierungsstatus und das pUICC-Stadium konnten zwar die vermuteten Trends, dass ein fortgeschritteneres Stadium zu einer Verkürzung von *DFS* und *OS* führt, dargestellt werden, jedoch war der Zusammenhang nicht statistisch signifikant ($p = 0,1$). Dies bestätigt die These des Warburg-Effektes, dass bei fortgeschrittenen Tumoren eine erhöhte Aktivität der anaeroben Glykolyse vorzufinden ist, da hier eine erhöhte Expression der Glykolyseproteine nachweisbar ist (Altenberg und Greulich 2004).

Analog konnte in der Untersuchung der gesamten EGFR-Proteine eine erhöhte Proteinexpression bei Tumoren des Sigmas und des Colon descendens gezeigt werden, während im Lokalisationsvergleich linkes versus rechtes Colon keine statistisch signifikant erhöhte Proteinexpression nachweisbar war. Eine erhöhte Proteinexpression der gesamten EGFR-

Proteine konnte für das Tumorstadium, den Nodalbefall, das Grading und das UICC-Stadium zwar als Trends dargestellt werden, statistisch signifikante Unterschiede konnten sich jedoch nicht nachweisen lassen.

In der Analyse der einzelnen Proteine der Glykolyse zeigte sich, dass eine große Varianz in der Expressionsstärke in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter nachgewiesen werden konnte. Die Analyse zeigte, dass bei den Proteinen PGK2, ENO2, ALDOA, GAPDH, GPI und PGK1 in den Tumorstadien pT3 und pT4 eine erhöhte Expression nachweisbar war ($p < 0,01$), während diese in den Tumorstadien pT1 und pT2 nicht vorlag. Wie durch den Warburg-Effekt beschrieben, bestätigt sich die Annahme, dass eine erhöhte Expression von metabolischen Proteinen der (anaeroben) Glykolyse in fortgeschrittenen Tumorstadien nachweisbar ist und als mögliches Ziel für zukünftige Therapeutika untersucht werden sollte.

In Korrelation mit dem Nodalstatus zeigte sich, dass bei Vorliegen eines Nodalbefalls, zusammengefasst als pN+, eine erhöhte Expression von ENO2, PGK1 und PKLR nachweisbar war ($p < 0,036$), während sich keine erhöhte Expression der Proteine bei fehlendem Nodalbefall pN0 zeigte. Dies lässt diese Proteine ebenfalls als mögliches Therapieziel bei Tumoren mit Nodalbefall in Frage kommen.

In der Untersuchung der Proteinexpression in Abhängigkeit des Vorliegens einer Fernmetastasierung pM1 versus pM0 konnten keine statistisch signifikant erhöhten Proteinexpressionen nachgewiesen werden.

Hinsichtlich des Gradings zeigte sich, dass erhöhte Proteinexpressionen der Proteine ENO1, ENO2, GAPDH, GPI, HK3, PGAM1 und PKLR bei entdifferenzierten Tumoren nachweisbar waren. Während keine verstärkten Proteinexpressionen bei den gut- und mäßig-differenzierten Tumoren nachweisbar war, ließen sich bei entdifferenzierten Tumoren signifikant erhöhte Expressionen der Proteine nachweisen ($p < 0,012$).

Weitergehend wurden die Proteinexpressionen in Abhängigkeit der Tumorlokalisation betrachtet, wobei zwischen linkem und rechtem Colon unterschieden wurde. Bei den zehn Proteinen ALDOA, ALDOB, ENO1, HK2, GAPDH, GPI, PGAM1, PGK1, PGK2 und PKLR konnten bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren erhöhte Proteinexpressionen nachgewiesen werden ($p < 0,005$), während sich keine erhöhten Expressionsstärken bei linksseitigen Tumoren finden lassen konnten.

In der Analyse der einzelnen Proteine aus der EGFR-Familie zeigte sich lediglich für ERBB3 in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus eine negative statistisch signifikante Korrelation, so dass auch umgekehrt erniedrigte Expressionen von Proteinen in fortgeschrittenem Tumorstadium prinzipiell als denkbar gelten können.

Betrachtet man zusammenfassend die Proteinexpression in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter, lässt sich feststellen, dass insbesondere rechtsseitige Tumoren mit einem Tumorstadium $>pT2$, einem Nodalbefall und einer Entdifferenzierung erhöhte Expression einzelner Proteine der Glykolyse aufweisen.

4.4. *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Proteinexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezielt die Proteine der metabolischen Enzyme der Glykolyse und der EGFR-Rezeptorfamilie betrachtet und die Expressionsstärken in Korrelation mit den klinikopathologischen Parametern und hinsichtlich des *DFS* und *OS* analysiert. Es zeigte sich, dass in Abhängigkeit der Expressionsstärke und der klinikopathologischen Parameter eine Verkürzung der (krankheitsfreien) Überlebenszeit nachgewiesen werden konnte. Vor dem Hintergrund, dass eine erhöhte Proteinexpression dadurch einen prognostischen Wert erlangt, ist zu diskutieren, ob Patienten mit entsprechenden Tumoren von einer gezielten Therapie mit antimetabolischen oder anti-EGFR-Substanzen profitieren könnten.

In der Untersuchung der Proteinexpressionsstärke der Proteine der Glykolyse bestätigte sich die Korrelation des *OS* mit der Expressionsstärke der Proteine und es zeigte sich hier der insgesamt stärkste Effekt, so dass in der gemeinsamen Betrachtung der Glykolyse- und EGFR-Proteine davon auszugehen ist, dass die Expressionsstärke der Proteine der metabolischen Enzyme der Glykolyse den bestimmenden Faktor darstellen.

In der Analyse der Proteinexpressionen zeigte sich, dass in der Gesamtbetrachtung der Proteine der Glykolyse keine signifikanten Veränderungen von *DFS* ($p = 0,1$) und *OS* ($p = 0,1$) dargestellt werden konnten, auch wenn ein Trend zwischen den Tumoren mit hoher und mit niedriger Proteinexpression zu den Betrachtungszeitpunkten nach 50 und nach 100 Monaten sowohl im *DFS* (50 Monate 39,8% krankheitsfreies Überleben (139/349) versus 45,4% (158/348); 100 Monate 24,3% (85/349) versus 29,6% (103/348)) als auch im *OS* (50 Monate 46,7% lebende Patienten (163/349) versus 53,2% (163/348); 100 Monate 26,9% (94/349) versus 34,8% (121/348)) erkennbar war.

In der Gesamtbetrachtung der EGFR-Proteine konnten statistisch signifikante Unterschiede der Tumore mit hoher und mit niedriger Proteinexpression hinsichtlich des *DFS* ($p = 0,027$) und *OS* ($p = 0,049$) gezeigt werden. In der Einzelbetrachtung der Kaplan-Meyer-Kurven der untersuchten EGFR-Proteine ließ sich dieser Zusammenhang für die Proteine EGFR und ERBB2 zwar darstellen, war statistisch jedoch nicht signifikant. Für das Protein ERBB3 konnten weder signifikante Unterschiede noch ein Trend in den Kaplan-Meyer-Kurven dargestellt werden.

Die Untersuchung der Proteinexpressionsstärke der drei EGFR-Proteine im Streudiagramm zeigte zwar ebenfalls einen negativen Zusammenhang, doch auch dieser war in der Korrelation nach Pearson ($p = 0,512$) nicht signifikant.

In der Betrachtung der Expressionsstärke einzelner Proteine der Glykolyse und der EGFR-Proteine konnten statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Aus der Familie der Glykolyse gelang dies für die Proteine ALDOB, ENO2, HK1, HK3, PGK1 und PKLR. Alle Proteine zeigten signifikante Unterschiede in Betrachtung der Tumore mit hoher und niedriger Proteinexpression hinsichtlich des *DFS* und *OS*, so dass es sinnvoll erscheint diese Proteine weitergehend zu erforschen, um sie als Zielstrukturen in der Diagnostik und in neuen Therapiekonzepten zugänglich zu machen. Die stärksten statistisch signifikanten Unterschiede konnten dabei bei den Proteinen HK1 (*DFS* $p = 0,011$; *OS* $p = 0,013$), HK3 (*DFS* $p = 0,02$; *OS* $p = 0,004$), PGK1 (*DFS* $p = 0,027$; *OS* $p = 0,023$) und PKLR (*DFS* $p = 0,029$; *OS* $p = 0,034$) nachgewiesen werden, so dass anhand der vorliegenden Daten insbesondere diese Proteine als wichtige Ansatzstellen imponieren.

Bereits heute stehen mit *Cetuximab* und *Panitumumab* monoklonale Antikörper gegen den EGFR-Rezeptor zur Verfügung, welche in der Therapie des fortgeschrittenen KRK angewandt werden (Nöpel-Dünnebacke et al. 2020). Eine Anwendung der Therapie mit HER-2-Antikörpern wie *Trastuzumab* und *Pertuzumab* scheint angesichts des verkürzten *DFS* und *OS* (Vgl. 3.5) bei erhöhter Expression von ERBB2 in Erwägung zu ziehen zu sein und wurde durch die *HERAKLES*-Studie untersucht (Okamoto et al. 2021). Untersuchungen zeigten, dass sich eine *Overall response rate (ORR)* von 30% unter der Kombination von *Trastuzumab* und *Lapatinib* und eine *ORR* von 38% bei der dualen Blockade mit *Trastuzumab* und *Pertuzumab* nachgewiesen werden konnte (Conradi et al. 2019).

Angesichts der nachgewiesenen Verkürzung von *DFS* und *OS* bei erhöhter Proteinexpression stellen die Proteine der Glykolyse wichtige Zielstrukturen für potenziell therapeutische Substanzen dar. Experimentelle Untersuchungen durch Mathupala et al. (2009) zeigten, dass *in vitro* eine Hemmung von Glykolyseproteinen, insbesondere der Hexokinase-2 (HK2), zu einer Verlangsamung des Tumormetabolismus führen kann. Die antimetabolischen Substanzen zeigten eine hohe Toxizität, so dass bis heute noch keine direkte Inhibition in Anwendung ist. Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) könnten jedoch neue Möglichkeiten der zielgerichteten immunvermittelten Inhibition ermöglichen (Holzinger und Abken 2021)

Eine *Proteomics*-Analyse könnte zukünftig angesichts der unterschiedlichen Expressionsstärken der Proteine in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter und der sich dadurch in Abhängigkeit verkürzenden Überlebenszeit von prognostischer Relevanz sein und hinsichtlich

einer gezielten Therapie mit antimetabolischen und anti-EGFR-Substanzen geeignete Tumore identifizieren.

5. Zusammenfassung

Angesichts der hohen Inzidenz und Mortalität des KRK ist trotz sich stets weiterentwickelnder und prognoseverbessernder Diagnostik und Therapieoptionen eine Intensivierung und Verbreitung der diagnostischen und therapeutischen Optionen von großer Bedeutung. Um die Prognosen zu verbessern und die Inzidenzraten zu senken und damit die Bedrohung der Gesundheit von Individuen durch das KRK zu senken, bedarf es einer weiteren intensiven Erforschung der Tumorbilogie zur Detektion neuer diagnostischer und therapeutischer Instrumente.

Durch die großen Fortschritte im Bereich der molekularen Pathologie, der Gensequenzierung und der *Proteomics*-Analytik konnten in den vergangenen Jahrzehnten diverse spezifische Schlüsselstellen in der Tumorbilogie aufgedeckt werden. Durch diese Analytik können bereits heute Patienten detektiert werden, welche von einer zielgerichteten Therapie profitieren und umgekehrt Patienten von nicht erfolgsversprechenden Therapien verschont werden, so dass zum einen eine Verbesserung der Prognose, der Lebensqualität und zum anderen eine Ökonomisierung durch die zielgerichteten personalisierten Therapien bereits erzielt werden konnte.

Es stellt sich die Frage welche weiteren Schlüsselstellen in der Biologie der Tumoren in Zukunft identifiziert und ob neue zielstrukturspezifische Wirkstoffe entwickelt werden können.

Vor dem Hintergrund des *Cancer-Scout*-Projektes wurden im Rahmen dieser Arbeit die klinikopathologischen Parameter von 697 KRK-Präparaten und ein dazugehöriges *Follow-Up* der Patienten erhoben. Die Tumorpräparate wurden einer *Proteomics*-Analyse unterzogen und die Stärke der Proteinexpressionen mit den klinikopathologischen Parametern und *Follow-Up*-Daten in Form einer Überlebenszeitanalyse ausgewertet.

Die Mehrzahl der untersuchten KRK lagen zum Operationszeitpunkt im Stadium II vor. Dies könnte Ausdruck dafür sein, dass die Vorsorge und Screeningmaßnahmen in Deutschland erfreulicherweise zu einer Detektion vor allem früher Karzinome zu führen scheint und insbesondere auch die Betrachtung einer Risiko-/ der Familienanamnese, mit entsprechender Intensivierung der Vorsorge, eine Diagnostik bereits in frühen Stadien erlaubt und bedingt.

Die Überlebenszeit der Patienten ist stark von den klinikopathologischen Parametern abhängig. Insbesondere das Vorliegen eines höheren Tumorstadiums, eine lymphogene oder Fernmetastasierung und entdifferenzierte Tumoren verkürzen das Überleben signifikant.

Die Untersuchung der Expressionsstärke der Proteine in den Tumoren in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter zeigte signifikante Unterschiede. Statistisch signifikant erhöhte Proteinexpressionen konnten für die Enzyme der Glykolyse in Abhängigkeit von Tumorstadium, Grading und der Lokalisation nachgewiesen werden, was als bestätigend für die

These des Warburg-Effektes interpretiert werden kann. Die Untersuchung der EGFR-Proteine zeigte, dass eine erhöhte Proteinexpression bei Tumoren des Sigmas und des Colon descendens nachgewiesen werden konnte und, dass sich in Abhängigkeit des Tumorstadiums, des Nodalbefalles, des Gradings und des UICC-Stadiums erhöhte Proteinexpressionen als Trends darstellen ließen. In der Betrachtung einzelner Enzyme der Glykolyse zeigte sich eine große Varianz der Proteinexpressionsstärke in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter. Eine erhöhte Expression der Proteine PGK2, ENO2, ALDOA, GAPDH, GPI und PGK1 konnte in den Tumorstadien pT3 und pT4 nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Bei Vorliegen eines Nodalbefalles war eine statistisch signifikant erhöhte Expression von ENO2, PGK1 und PKLR nachweisbar ($p < 0,036$), während diese bei fehlendem Nodalbefall nicht vorhanden waren. In Abhängigkeit des Differenzierungsgrades konnten erhöhte Expressionen von ENO1, ENO2, GAPDH, GPI, HK3, PGAM1 und PKLR bei entdifferenzierten Tumoren nachgewiesen werden, während keine verstärkten Proteinexpressionen bei den gut- und mäßig-differenzierten Tumoren nachweisbar waren ($p < 0,012$). Kein Unterschied in der Proteinexpressionen der metabolischen Enzyme der Glykolyse konnte in Abhängigkeit des Metastasierungsstatus gefunden werden. Für die Proteine ALDOA, ALDOB, ENO1, HK2, GAPDH, GPI, PGAM1, PGK1, PGK2 und PKLR konnte eine erhöhte Proteinexpression bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren nachgewiesen werden ($p < 0,005$), während sich keine erhöhten Expressionsstärken bei linksseitigen Tumoren finden lassen konnten. In der Analyse der EGFR-Rezeptorproteine konnte lediglich eine verminderte Expression von ERBB3 bei vorliegender Fernmetastasierung statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Daten der Proteinexpressionsstärken in Abhängigkeit der klinikopathologischen Parameter wurden mit den Daten des *Follow-Ups* korreliert, um eine Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit der Proteinexpression zu erhalten. In der Analyse zeigte sich, dass signifikante Verkürzungen von *DFS* und *OS* in Abhängigkeit der Expressionsstärke der metabolischen Enzymen ALDOB, ENO2, HK1, HK3, PGK1 und PKLR sowie in der Gesamtbetrachtung der EGFR-Proteine vorlag.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse der Analysen des vorliegenden Datensatzes scheint eine weitergehende Erforschung der Proteinexpressionen und folgend auch der neuen Ansatzstellen für zukünftige Therapieoptionen und diagnostische Instrumente sehr vielversprechend. Diese Ansatzstellen werden bereits heute im Sinne einer zielgerichteten Therapie, durch Substanzen wie *Cetuximab* und *Panitumumab* als EGFR-Antikörper, *Bevacizumab* als VEGF-Antikörper, *Trastuzumab*, *Pertuzumab* und *Lapatinib* als Antikörper gegen HER2 oder *Pembrolizumab* als Checkpointinhibitor, genutzt oder dienen als prädiktive Marker hinsichtlich der Effektivität einer zielgerichteten Therapie. Die sich immer breiter aufstellenden und

mitunter inzwischen stark zielgerichteten und personalisierten Therapiekonzepte konnten in den vergangenen Jahren die Prognosen insbesondere bei fernmetastasierten KRK deutlich verbessern und Patienten selektieren, welche von spezifischen Therapieoptionen profitieren und umgekehrt Patienten von Therapien ausschließen, die von diesen nicht profitiert und im Gegenteil eine starke Einschränkung der Lebensqualität bei fehlender Verlängerung der Lebenszeit erlebt hätten.

Die erhobenen Daten und Analysen zeigen, dass eine detaillierte Untersuchung der klinikopathologischen Parameter und der Tumorbiologie auch durch *Proteomics* sowohl hinsichtlich des therapeutischen Vorgehens im Sinne von Operation, neoadjuvanter und adjuvanter systemischer Therapie, als auch für die Entwicklung neuer gezielter Therapieansätze von grundlegender Bedeutung ist, um die Gefahr einer inadäquaten Therapie der Patienten zu reduzieren.

Die Auswertung der Proteinexpressionsanalysen zeigte dabei, dass durch das umfassende Gebiet der *Proteomics* eine wichtige Grundlage für das weitergehende Verständnis der Tumorbiologie besteht und, dass in der Erforschung der Proteinexpression großes Potential für die zukünftige weitere Verbesserung und Personalisierung der Behandlung von KRK und generell für Tumore aller Art zu sehen ist.

6. Literaturverzeichnis

Aaltonen LA, Peltomaki P, Jä H, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, Sistonen P, Hamilton SR, Kinzler KW, et al. (1994): Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients'.

Abdelkhalek M, Setit A, Bianco F, Belli A, Denewer A, Youssef TF, Falato A, Romano GM (2018): Complete Mesocolic Excision With Central Vascular Ligation in Comparison With Conventional Surgery for Patients With Colon Cancer – The Experiences at Two Centers. *Ann Coloproctol* 34, 180-186

Aggarwal N, Quaglia A, McPhail MJW, Monahan KJ (2021): Systematic review and meta-analysis of tumour microsatellite-instability status as a predictor of response to fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 37, 35-46

Altenberg B, Greulich KO (2004): Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014-1020

André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, et al. (2020): Pembrolizumab in Microsatellite–Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 383, 2207-2218

André T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, Scirva A, Hickish T, Tabernero J, Van Laethem JL, et al. (2015): Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 33, 4176-4187

Aretz S (2010): The Differential Diagnosis and Early Detection of Hereditary Gastrointestinal Polyposis Syndromes. *Dtsch Arztebl Int* 107, 163-173

Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH (2017): Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* 55, 182-196

Caplin S, Cerottini J-P, Bosman FT, Constanda MT, Givel J-C (1998): For patients with dukes' B (TNM stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is Related to poor prognosis. *Cancer* 83, 666-672

Cardoso R, Zhu A, Guo F, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H (2021): Incidence and mortality of proximal and distal colorectal cancer in Germany—trends in the era of screening colonoscopy. *Dtsch Arztebl Int* 118, 281-287

Cleff T: Deskriptive Statistik und moderne Datenanalyse: Eine computergestützte Einführung mit Excel, SPSS und STATA; Gabler Verlag, Wiesbaden 2008

Cleff T: Bivariate Zusammenhänge. Deskriptive Statistik und Explorative Datenanalyse: Eine computergestützte Einführung mit Excel, SPSS und STATA. Gabler Verlag, Wiesbaden 2015, 73-133

Conradi L-C, Spitzner M, Metzger A-L, Kisly M, Middel P, Bohnenberger H, Gaedcke J, Ghadimi MB, Liersch T, Rüschoff J, et al. (2019): Combined targeting of HER-2 and HER-3 represents a promising therapeutic strategy in colorectal cancer. *BMC Cancer* 19, 880-880

-
- Copija A, Waniczek D, Witkoś A, Walkiewicz K, Nowakowska-Zajdel E (2017): Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 18, 107
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, et al. (2004): Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345
- Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J (2015): Personalizing Colon Cancer Adjuvant Therapy: Selecting Optimal Treatments for Individual Patients. *J Clin Oncol* 33, 1787-1796
- Dietmaier W (2010): Mikrosatelliteninstabilität: Ein neuer prädiktiver Marker (?). *Pathologe* 31, 268-273
- Dietmaier W, Büttner R, Rüschoff J (2019): Mikrosatelliteninstabilität: Aktueller Überblick über Methoden und Anwendungen. *Pathologe* 40, 313-327
- Ettrich TJ, Seufferlein T (2016): Metastasiertes kolorektales Karzinom: Moderne Therapiekonzepte zwischen Heute und Morgen. *Onkologe* 22, 109-114
- Forsch S, Klauschen F, Hufnagl P, Roth W (2021): Artificial Intelligence in Pathology. *Dtsch Arztebl Int* 118, 194-204
- Gemeinsamer Bundesausschuss: Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme; Gemeinsamer Bundesausschuss, Berlin 2022
- Graeter T, Friedel G (2016): Pulmonale Metastasen Chirurgie des kolorektalen Karzinoms. *Zentralbl Chir* 141, 341-354
- Gröne J (2016): Chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms: Gibt es noch Fortschritte? *Onkologe* 22, 98-108
- Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, et al. (2015): The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med* 21, 1350-1356
- Haroske G, Zwönitzer R, Hufnagl P: Leitfaden Digitale Pathologie; Bundesverband Deutscher Pathologen e.V., Berlin 2018
- Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S (2009): Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation – technical notes and outcome. *Colorectal Disease* 11, 354-364
- Holzinger A, Abken H (2021): Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) – universelle Werkzeuge in der zellulären Immuntherapie. *Der Internist* 62, 583-588
- Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M (2009): The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer* 125, 171-180
- Katalinic A: Krebs in Deutschland für 2017/2018; Robert Koch Institut, Berlin 2021

-
- Kather JN, Pearson AT, Halama N, Jäger D, Krause J, Loosen SH, Marx A, Boor P, Tacke F, Neumann UP, et al. (2019): Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. *Nat Med* 25, 1054-1056
- Klingbiel D, Tejpar S (2016): Microsatellite Instability and BRAF and KRAS Mutations in Stage III Colon Cancer: Requirements for Accurate Prognosis Assessment. *JAMA Oncol* 2, 653-654
- Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M (2008): Molekulare Pathogenese: Ihre Bedeutung für die zielgerichtete Therapie beim kolorektalen Karzinom. *Pathologie* 29, 196-199
- Knudson AG (1971): Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823
- Kohn W, Öztürk R: Häufigkeitsfunktion. *Statistik für Ökonomen: Datenanalyse mit R und SPSS*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2017, 27-34
- Kopetz S, Guthrie KA, Morris VK, Lenz H-J, Magliocco AM, Maru D, Yan Y, Lanman R, Manyam G, Hong DS, et al. (2021): Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol* 39, 285-294
- Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, Wasan H, Ciardiello F, Loupakis F, Hong YS, et al. (2019): Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 381, 1632-1643
- Kraeft A-L, Stein A, Modest D, Fichtner-Feigl S, Tannapfel A, Reinacher-Schick A (2021): (Neo)adjuvante Behandlung beim frühen Kolonkarzinom: Gesichertes, Kontroversen, Zukünftiges. *Onkologe* 27, 245-258
- Kreis ME (2016): Algorithmus-Management des Kolonkarzinoms. *Onkologe* 22, 83-83
- Kromrey H: Methoden und Modelle der deskriptiven Statistik. *Empirische Sozialforschung: Modelle und Methoden der standardisierten Datenerhebung und Datenauswertung*. VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden 2002, 405-514
- Kuckartz U, Rädiker S, Ebert T, Schehl J: Kreuztabelle, Chi-Quadrat und Zusammenhangsmaße. *Statistik: Eine verständliche Einführung*. VS Verlag für Sozialwissenschaften, Wiesbaden 2010, 81-102
- Kurreck A, Modest DP, von Einem J, Stintzing S (2021): Systemische Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms: Strategien in der Kombinations- und Sequenztherapie. *Onkologe* 27, 259-266
- Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG (2003): Colon Cancer Survival Is Associated With Increasing Number of Lymph Nodes Analyzed: A Secondary Survey of Intergroup Trial INT-0089. *Journal of Clinical Oncology* 21, 2912-2919
- Lenz H-J, Van Cutsem E, Luisa Limon M, Wong KYM, Hendlisz A, Aglietta M, García-Alfonso P, Neyns B, Luppi G, Cardin DB, et al. (2021): First-Line Nivolumab Plus Low-Dose

Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol* 40, 161-170

Lo L, Price T, Young J, Townsend A: BRAF Mutation in Colorectal Cancer (Colorectal Cancer - From Pathogenesis to Treatment); IntechOpen, London 2016

Loree JM, Bailey AM, Johnson AM, Yu Y, Wu W, Bristow CA, Davis JS, Shaw KR, Broaddus R, Banks KC, et al. (2018): Molecular Landscape of ERBB2/ERBB3 Mutated Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 110, 1409-1417

Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, et al. (2014): Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 371, 1609-1618

Mann HB, Whitney DR (1947): On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18, 50-60, 11

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL (2009): Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* 19, 17-24

Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S (2019): Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol* 13, 109-131

Modest DP, von Bergwelt-Baildon M (2019): Onkologische Therapiekonzepte bei systemischer Metastasierung des kolorektalen Karzinoms. *Zentralbl Chir* 144, 252-258

Möslein G (2016): Risikogruppen mit einer erblichen Disposition für familiäre (polygene) kolorektale Karzinome: Update zu Diagnose, Prävention und Therapie. *Onkologie* 22, 84-97

Muto T, Bussey HJR, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36, 2251-2270

Nieroda CA, Arnold MW, Barbera-Guillem E, Martin EW (1998): Lymphadenektomie beim colorektalen Carcinom. *Chirurg* 69, 717-724

Nöpel-Dünnebacke S, Conradi L-C, Reinacher-Schick A, Ghadimi M (2020): Therapeutische Relevanz molekularer Marker beim kolorektalen Karzinom. *Onkologie* 26, 685-697

Okamoto W, Nakamura Y, Kato T, Esaki T, Komoda M, Kato K, Komatsu Y, Masuishi T, Nishina T, Sawada K, et al. (2021): Pertuzumab plus trastuzumab and real-world standard of care (SOC) for patients (pts) with treatment refractory metastatic colorectal cancer (mCRC) with HER2 (ERBB2) amplification (amp) confirmed by tumor tissue or ctDNA analysis (TRIUMPH, EPOC1602). *J Clin Oncol* 39, 3555-3555

Piazza I, Beaton N, Bruderer R, Knobloch T, Barbisan C, Chandat L, Sudau A, Siepe I, Rinner O, de Souza N, et al. (2020): A machine learning-based chemoproteomic approach to identify drug targets and binding sites in complex proteomes. *Nat Commun* 11, 4200

Potter M, Newport E, Morten KJ (2016): The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans* 44, 1499-1505

Ribic CM, Sargent DJ, Thibodeau SN, Hamilton SR, Gryfe R, Redston M (2003): Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med* 349, 247-257

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Srivastava S, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Smyrk T, Perucho M, et al. (1997): A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89, 1758-1762

Schendera CF: Regressionsanalyse mit SPSS; De Gruyter Oldenbourg 2014

Schmiegel W, Pox C, et al.: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Langversion 2.1. hrsg. Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe AWMF 2019

Schmoll HJ, Arnold D: Kolorektales Karzinom. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (Hrsg): Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie. Springer Berlin, Heidelberg 2006, 5968-6000

Schneider C, Schneider R, Möslein G (2013): Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität beim kolorektalen Karzinom. *DZO* 45, 48-54

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020): Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 7-30

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2021): Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 71, 7-33

Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, Miller KD, Ma J, Rosenberg PS, Jemal A (2017): Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974–2013. *J Natl Cancer Inst* 109

Stintzing S, Heinemann V, Jung A, Moosmann N, Hiddemann W, Kirchner T (2009): The Treatment of Colorectal Carcinoma With Monoclonal Antibodies - The Importance of KRAS Mutation Analysis and EGFR Status. *Dtsch Arztebl Int* 106, 202-206

The Cancer Genome Atlas N (2012): Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330-337

Timischl W: Angewandte Statistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner; Springer Wien 2013

Ulm K (2011): Primary endpoints in cancer trials. *J Thorac Dis* 3, 82-83

<https://pathologie.umg.eu/forschung/kuenstliche-intelligenz-zur-vorhersage-von-mutationen-in-tumoren> Zugriff am 11.08.2021

Vasaikar S, Huang C, Wang X, Petyuk VA, Savage SR, Wen B, Dou Y, Zhang Y, Shi Z, Arshad OA, et al. (2019): Proteogenomic Analysis of Human Colon Cancer Reveals New Therapeutic Opportunities. *Cell* 177, 1035-1049

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Smits AMM, Bos JL (1988): Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med* 319, 525-532

von Heesen M, Ghadimi M (2021): Chirurgische Resektion: offen, laparoskopisch, robotisch: State-of-the-Art in der chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms. *Onkologie* 27, 234-244

West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P (2010): Complete Mesocolic Excision With Central Vascular Ligation Produces an Oncologically Superior Specimen Compared With Standard Surgery for Carcinoma of the Colon. *J Clin Oncol* 28, 272-278

Wild CP WE, Stewart BW: World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention; IARC Publ, Lyon 2020

Williamson DF, Parker RA, Kendrick JS (1989): The Box Plot: A Simple Visual Method to Interpret Data. *Ann Intern Med* 110, 916-921

Wittekind C, Brierley JD, Gospodarowicz MK: TNM Klassifikation maligner Tumoren, Weinheim 2020

Wong MCS, Huang J, Lok V, Wang J, Fung F, Ding H, Zheng Z-J (2021): Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. *Clin Gastroenterol Hepatol* 19, 955-966

Wright P, Haynes A, Markovic M (2020): secuTrialR: Seamless interaction with clinical trial databases in R. *J. Open Source Softw.* 5, 2816

Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, Chambers MC, Zimmerman LJ, Shaddox KF, Kim S, et al. (2014): Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513, 382-387

Zhu J, Wang S, Bai H, Wang K, Hao J, Zhang J, Li J (2021): Identification of Five Glycolysis-Related Gene Signature and Risk Score Model for Colorectal Cancer. *Front Oncol* 11, 588811

Zwiener I, Blettner M, Hommel G (2011): Survival Analysis. *Dtsch Arztebl Int* 108, 163-169

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt

Frau Dr. Dr. med. Lena-Christin Conradi

Herrn Prof. Dr. med. Ströbel

Herrn Dr. med. Hanibal Bohnenberger

Frau Birgit Jünemann

Herrn Dr. med. Tiago De Oliveira

Herrn Prof. Dr. med. Ralf Gold

Herrn Dr. med. Dietrich Kulenkampff

Herrn Prof. Dr. Dr. med. Alexander T. Teichmann

Herrn Leon-Frederik Rosen

Fraun Anke-Benette Rosen

Frau Maren Rosen

Herrn Alexander Müller

Herrn Dr. med. Thorsten Rosen

Frau Viktoria Schambach

Frau Ingeborg Klara Rosen

Frau Petra Rodeck

Herrn Ulrich Rodeck

Frau Emmalie Rodeck

Herrn Michael Theuerkauf

Herrn Dr. Philipp Alexander Nelis

Herrn Dr. Christoph Stiehm

Herrn Ansgar Brede Edmund Ridder

Herrn Juan Francisco Del Hierro

Frau Manja Trutzenberg Del Hierro

Frau Esther Rehmann

Frau Esther Felicia Frank

Frau Marlene Gründel

Frau Gina Wilder

Meinen Arbeitskolleginnen

Dem gesamten Laborteam

Lebenslauf

Am 08. August 1990 wurde ich, Linde-Allegra Rosen, als viertes Kind von Anke-Benette Rosen (Hebamme) und Dr. Ulrich Rosen (Frauenarzt, verstorben 2015) in Göttingen geboren.

Als Familie zogen wir von Niedersachsen, über Bayern und Nordrhein-Westfalen nach Spanien, Palma De Mallorca. Dort verbrachte ich den größten Teil meiner Kindheit und besuchte bis 2004 die internationale Schule, The Academy, in Marratxi.

Meine allgemeine Hochschulreife erreichte ich 2009 in Schermbeck, einer Kleinstadt, am Rande des Ruhrgebietes.

Anschließend arbeitete ich in der überörtlichen gynäkologischen Gemeinschaftspraxis meiner Eltern.

Im Frühling 2011 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in meiner Geburtsstadt Göttingen.

Während meines Studiums absolvierte ich spannende und lehrreiche Famulaturen im In- und Ausland. Meine Wege führten mich nach Rostock, Mecklenburg-Vorpommern (Klinik für Orthopädie und Praxis für Allgemeinmedizin), auf die Fidschi-Inseln, Südpazifik (Klinik für Ophthalmologie), Dorsten, Nordrhein-Westfalen (Abteilung für Anästhesiologie) und nach Galle, Sri Lanka (Klinik für Geburtshilfe).

Während dieser Zeit arbeitete ich als Laborassistentin in der Getreide AG Rostock und als studentische Pflegekraft auf den verschiedenen Stationen der medizinischen Universitätsklinik Göttingen.

Im Juni 2018 erhielt ich die Approbation als Ärztin. Seither bin ich als Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus Neu Bethlehem (Direktor: Dr. med. D. Kulenkampff) tätig. Die Arbeit als Ärztin in einem Fachbereich, welcher eine große Spannweite zwischen Chirurgie, Diagnostik und Geburtshilfe bietet, lässt mich diesen Beruf jeden Tag mit Neugierde, Freude und Leidenschaft ausüben.

Im April 2020 hatte ich das Glück, Frau Dr. Lena Conradi kennenzulernen und arbeitete fortan unter Ihrer stets freundlich zugewandten und fachlich professionellen Betreuung an meiner vorliegenden Dissertation.

Voller Freude erwarten mein Lebensgefährte und ich, im Juli diesen Jahres, die Geburt unseres ersten Kindes.