

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle  
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Seufferlein)

**Genefec 2 -  
Studie zur Beurteilung von Sensitivität und Spezifität DNA-basierter Stuhl  
Screening Methoden für das kolorektale Karzinom**

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sonja Kristina Hiemer

geboren am 14.03.1979 in München

Gutachter: Prof. Dr. med. D. Vordermark, Prof. Dr. med. D. Arnold, Prof. Dr. med. M. Geißler  
Verteidigung: 18.05.2011

**Meiner Mutter**

## Referat

Darmkrebs ist mit 35.000 Todesfällen pro Jahr die zweithäufigste Todesursache infolge von Krebserkrankungen in Deutschland. Die maligne Entartung eines gutartigen Adenoms dauert bis zu 10 Jahre. Es ist wichtig, die Erkrankung in einem gutartigen Stadium zu entdecken, Polypen endoskopisch zu entfernen und so den Ausbruch der Krebserkrankung zu verhindern. Dies ist eine derzeit erfolgsversprechende Möglichkeit, die Mortalität an Darmkrebs zu senken. In Deutschland werden der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) und die Koloskopie als Früherkennungsmethoden empfohlen. Da Sensitivität und Spezifität des FOBT nicht sehr hoch sind, und eine Koloskopie von vielen der Berechtigten nicht genutzt wird, ist die Suche nach innovativen, nicht invasiven und kosteneffektiven Screeningmethoden berechtigt und sinnvoll. Molekulare Tumormarker in Form von Stuhltests sind möglicherweise eine sinnvolle Erweiterung in der Präventionsdiagnostik des kolorektalen Karzinoms. Die Genefec-2 Studie untersucht, in wieweit molekulare Stuhltests eine weitere Alternative darstellen. Die Gene K-ras, p53, B-raf und long DNA wurden aus abgeschilferten Darmepithelzellen, die sich im Stuhl finden, isoliert, mittels PCR quantifiziert und auf Mutationen untersucht. Es nahmen 626 Patienten an der Studie teil und es erfolgte eine Einteilung in 6 Gruppen, bezüglich ihrer histologischen Diagnose. Unsere Studie ermittelte Sensitivität und Spezifität von FOBT, Tumor M2-PK und Genefec-2. Alle Patienten wurden koloskopiert. Die Ergebnisse der einzelnen Stuhltests wurden statistisch miteinander verglichen, wobei sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumor M2-PK Test und Genefec-2 zeigte. Die Sensitivität der Tumor M2-PK war mit 77,8% am höchsten, die Gesamtspezifität war mit 50,34% jedoch sehr gering. Auf Grund der geringen Spezifität des Tumor M2-PK Tests führten wir eine kombinierte Analyse nur für Genefec-2 und FOBT durch. Diese Kombination konnte die Sensitivität von 66,7% (FOBT) bzw. 51,9% (Genefec) auf 80,4% anheben, wobei die Gesamtspezifität 83% betrug. Die Resultate bei kombiniertem FOBT und Genefec-2 sind vielversprechend, sie stellen jedoch keine Alternative zur Koloskopie dar. Inwieweit sich molekulare Tumormarker zum Screening eignen, muss in weiteren Studien getestet werden.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Tumorgenese	2
1.2 Benigne Tumoren des Kolons	4
1.3 Das kolorektale Karzinom	5
1.3.1 Risikofaktoren und Ätiologie	6
1.3.2 Tumorprogressions Modelle	7
1.3.3 Klassifikation und Stadieneinteilung	8
1.3.4 Symptomatik, klinisches Bild und Prognose	9
1.3.5 Therapiemöglichkeiten	10
1.3.6 Differenzialdiagnosen des KRK	11
1.3.7 Diagnostische Möglichkeiten	12
1.4 Screening Methoden	14
1.4.1 Test auf okkultes Blut im Stuhl	14
1.4.2 Sigmoidoskopie und Koloskopie	15
1.4.3 Tumor M2 Pyruvat Kinase	17
1.5 Störung des Zellzyklus	19
2. Zielstellung	20
3. Patienten, Material und Methoden	21
3.1 Studienablauf und Materialgewinnung	22
3.2 Studienzentren	24
3.3 Patientenkollektiv	26
3.4 Endoskopisches Screening	29
3.5 Genefec-2 Stuhl Test	30
3.5.1 K-ras	30
3.5.2 p53	30
3.5.3 long DNA	31
3.5.4 B-raf	31
3.5.5 Methodik von Genefec-2	32
3.6. Methodik der statistischen Auswertung	34
3.6.1 Sensitivität und Spezifität	34
3.6.2 Prädiktion	34
3.6.3 Vorzeichentest nach Mc Nemar	35

4. Ergebnisse	37
4.1 Auswertung des Fragebogens	38
4.1.1 Geschlecht	39
4.1.2 Alter	40
4.1.3 Ernährungsgewohnheiten	40
4.2 Statistische Auswertung der Stuhltests	42
4.2.1 Ergebnisse des FOBT	42
4.2.2 Ergebnisse des Tumor M2-PK Tests	43
4.2.3 Ergebnisse von Genefec-2	45
4.3 Vergleich der einzelnen Tests	46
4.3.1 Genefec-2 und FOBT	48
4.3.2 Genefec-2 und Tumor M2-PK Test	50
4.3.3 FOBT und Tumor M2-PK Test	51
4.4 Kombination von Genefec-2 und FOBT	51
5 Diskussion	53
5.1 FOBT	53
5.2 Tumor M2-PK	55
5.3 Genefec-2	56
5.4 Kombination von FOBT und Genefec-2	58
6. Schlussfolgerungen	60
7. Zusammenfassung	62
8. Literaturverzeichnis	63
9. Thesen	71

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

CED: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

CU: Colitis Ulcerosa

DNA: Desoxyribonucleinacid

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FAP: Familiäre adenomatöse Polyposis

FAS: Full Analyse Set

FOBT: Fecal occult blood test

FN: Falsch Negative

FP: Falsch Positive

GIT: Gastro Intestinal Trakt

GDP: Guanin Di Phosphat

GTP: Guanin Tri Phosphat

HNPCC: Hereditäres nicht polypöses Kolorektales Karzinom

5-JÜR: 5-Jahres Überlebensrate

KI: Konfidenzintervall

KRK: Kolorektales Karzinom

MAP-Kinase: Mitogen activated protein-Kinase

MC: Morbus Crohn

MRT: Magnetresonanztomographie

MSI: Mikrosatelliteninstabilität

PCR: Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)

RDS: Reizdarm Syndrom

RN: Richtig Positive

T-M2-PK: Tumor-M2-Pyruvat Kinase

# 1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 50.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Es ist mit ca. 35.000 Todesfällen pro Jahr die zweithäufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen und zählt zu den drei häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit. Seine Inzidenz hat sich von 1960 bis 1980 verdoppelt (8). Für erblich Belastete besteht ein erhöhtes Risiko. 90% der Kolonkarzinome finden sich bei den über 50-Jährigen. Die Inzidenz weist erhebliche geographische Unterschiede auf, besonders häufig tritt die Erkrankung in den westlichen Industrienationen auf (28), und steigt hier in Abhängigkeit vom Alter logarithmisch an. KRK sind vor dem 40. Lebensjahr mit < 5% ausgesprochen selten (20). Die EPIC Studie hat gezeigt, dass das sporadische Auftreten eines Kolonkarzinoms von äußeren Faktoren wie z.B. den Ernährungsgewohnheiten beeinflusst wird. Der Verzehr von Fleisch insgesamt schien nicht mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert zu sein, und der Konsum von Fisch stand in umgekehrtem Verhältnis zum Darmkrebsrisiko. Die Studie zeigte auch, dass keiner der Ballaststoffträger eine signifikant größere protektive Wirkung gegen das Darmkrebsrisiko hatte als die anderen (9).

Neben den sporadischen Fällen, die 85% bis 90% (40) ausmachen, gibt es hereditäre Formen des Kolonkarzinoms. Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht adenomatöse kolorektale Karzinom (HNPCC) haben wesentliche genetische Einblicke in die Tumorentstehung ermöglicht (61). Langjährige Erkrankung an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhen ebenfalls das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.

Um die Mortalität und Morbidität zu senken ist eine frühzeitige Entdeckung des entarteten Gewebes wichtig. Noch effektiver ist es, die Entstehung eines Malignoms durch präventive Maßnahmen zu verhindern.

Das Kolonkarzinom wird zumeist erst bei bestehenden klinischen Symptomen diagnostiziert, die mit einem bereits fortgeschrittenem Stadium korrelieren. Eine kurative Resektion ist dann nicht mehr möglich. Die Früherkennung durch geeignete Screeningverfahren hat somit eine große Bedeutung. In Deutschland sind der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT), sowie die rektale Untersuchung in das Krebsfrüherkennungsprogramm aufgenommen worden. Seit Oktober 2002 sieht die gesetzliche Früherkennung eine Früherkennungskoloskopie ab dem 55. Lebensjahr vor, die bei unauffälligem Befund nach 10 Jahren wiederholt werden kann (26). Die Koloskopie erreicht hinsichtlich Spezifität und Sensitivität die besten Ergebnisse. Auf Grund des langsamen Übergangs von Polypen zum Karzinom

erscheint es sinnvoll, eine Screeningkoloskopie durchzuführen (64). Da sie aufgrund der vorbereitenden Maßnahmen wie der Darmreinigung und der Invasivität, in Deutschland jedoch nur von rund 11 Prozent der berechtigten Männer und 13 Prozent der berechtigten Frauen genutzt wird (17), ist es sinnvoll nach nicht invasiven Alternativen zu suchen. Die Kolonkontrastdarstellung ist nach heutigen Erkenntnissen keine Alternative zur Koloskopie und sollte somit Ausnahmefällen vorbehalten sein. Eine virtuelle Koloskopie mittels Computertomographie oder MRT ist noch nicht ausgereift, und auch aufgrund der hohen Kosten nicht geeignet. Stuhltests als Screeningmethoden sind ein vielversprechender Ansatz. Sie benötigen keine aufwendige Vorbereitung und sind einfach durchzuführen. Der Tumor M2-PK Test ist auf dem Markt erhältlich, wird jedoch von den Kassen nicht bezahlt. Herkömmliche Tumormarker eignen sich nicht zum Screening, sondern sind nur zur Verlaufskontrolle nach chirurgischer Therapie indiziert. Unsere Studie testet, in wieweit sich molekulare Tumormarker in Form von Stuhl Tests eignen, indem sie mit bereits gängigen Tests wie dem FOBT und dem Tumor M2-PK-Test verglichen wurden

## **1.1 Allgemeine Tumorgenese**

In der Tumorphologie werden die Begriffe Tumor, Geschwulst und Neoplasie synonym verwendet. Man unterscheidet nach der Dignität eines Tumors gutartige und bösartige Tumore.

Gutartige (benigne) Neoplasien sind lokalisiert und umschrieben, ferner siedeln sie sich nicht in andere Körperregionen ab und neigen nicht zu Rezidiven. Sie wachsen langsam und verdrängend und bilden gewöhnlich bindegewebige Kapseln.

Malignome sind als genetisch bedingte Krankheit definiert, welche primär auf Mutationen beruht, durch die ihrerseits Onkogene oder Regulatorproteine des Zellzyklus inadäquat aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden (55).

Es kommt zu unkontrolliertem, diffusen und invasiven Zellwachstum sowie zur Ausbreitung im Körper, was letztendlich unbehandelt, oft aber auch behandelt zum Tode führt. Karzinome wachsen charakteristischerweise schnell, infiltrativ, und zerstören die histologische Ordnung ihrer Umgebung. Sie neigen dazu, sich über Lymph- und/oder Blutgefäße auszubreiten. So werden sie in andere Organe verschleppt (Metastasierung), wo sie zu Tochtergeschwülsten heranwachsen. Klinische Symptome treten oft erst im fortgeschrittenen Stadium auf.

Krebs beruht damit auf der Zerstörung der regulierten und kontrollierten Entwicklung und Vermehrung von Zellen. Eine große Rolle spielen dabei die unkontrollierte Aktivierung von Onkogenen und der Verlust bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Bei der Entstehung sind Faktoren beteiligt, welche bei der Embryogenese und bei der Regeneration den Proliferations- und Differenzierungsstoffwechsel steuern (55):

- Zellkommunikationsstörung:

Zellen, die sich gegenseitig berühren stoppen ihr Wachstum. Sie heften sich über Adhäsionsmoleküle an die Nachbarzelle an, und kommunizieren mit ihnen über Haftorganellen. Diese Zellkommunikation ist bei der Tumorgenese gestört und aufgehoben. Es erklärt, warum sich Tumorzellen ungehemmt vermehrt teilen, und aus einem Gewebsverband „ausbrechen“ können.

- Proliferationsenthemmung:

Durch genetische Schäden bricht die koordinierte Steuerung der Genexpression auseinander. Eine große Rolle spielen Wachstumsfaktoren und Protoonkogene, Cykline und Tumorsuppressorgene. Der Zusammenhang der Wachstumsfaktoren mit den Protoonkogenen wird aus der Tatsache ersichtlich, dass die Wachstumsfaktoren selbst, oder deren Rezeptoren von Protoonkogenen kodiert werden. In Tumorzellen kann die Rezeptorzahl abnorm hochreguliert sein oder die Bildung von Wachstumshormonen völlig enthemmt ablaufen.

- Protoonkogene:

Sie steuern über die Kodierung ihrer Proteine, die an der Signalaufnahme, der Übermittlung und der Umsetzung beteiligt sind, die Zellvermehrung. Diese sind dominante Gene, bei welchen die Mutation nur eines Allels ausreicht, um eine ungebremste oder überschüssige Genexpression auszulösen (34). Durch Mutation, Vermehrung oder Dysregulation werden sie zu Onkogenen. Es sind verschiedene Mechanismen der Genveränderungen bekannt, die zur Bildung von Onkoproteinen mit transformierendem Potential führen.

- Tumorsuppressorgene:

Ihre wichtigste Funktion ist die Inhibition der Zellvermehrung. Ihr Ausfall kommt erst dann zur Geltung, wenn beide Allele von einer Mutation betroffen sind (34). Die wohl wichtigsten Vertreter sind das Retinoblastomprotein, dessen Genprodukt den Übergang von der G1 in die

S-Phase steuert, und der Transkriptionsfaktor p53, der auch als „Wächter des Zellzyklus“ bezeichnet wird. Bei einem DNA Schaden steigt seine Konzentration an, und zwingt die Zelle, im G1-Stadium zu verharren. Kann der Fehler nicht behoben werden, induziert er die Apoptose. So werden Proliferation und Differenzierung überwacht. Ein weiteres Tumorsuppressorgen ist das APC-Gen (Adenomatöses Polyposis-coli Gen). Eine Mutation bewirkt eine Dauerproliferation. Sie ist ausschlaggebend für die „familiäre Polyposis coli“.

Auch Störungen des Immunsystems können der Auslöser einer Krebserkrankung sein. Eine wichtige Aufgabe dessen ist es, körperfremde Zellen als solche zu erkennen und zu eliminieren. Hierfür sind zytotoxische T-Zellen spezialisiert, die fremde Zellen und veränderte körpereigene Zellen wie Tumorzellen über veränderte Membranantigene erkennen und vernichten. Aber auch natürliche Killerzellen sind dafür geeignet.

Aus klinischen Beobachtungen weiß man, dass Patienten mit einem Immundefekt einem erhöhtem Tumorrisiko ausgesetzt sind.

Tumorantigene sind von Krebszellen gebildete Antigene. Diese Onkofetalproteine sind bei menschlichen Tumoren so häufig vorhanden, dass sich einige davon als Tumormarker eignen.

Diese Marker sind nicht tumorspezifisch und können auch bei anderen Erkrankungen auftreten. Sie eignen sich vor allem zur Verlaufskontrolle nach operativer Therapie. Es gibt außerdem noch eine Reihe anderer Faktoren, die bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielen. Es zeigt sich zum Beispiel in einigen Fällen eine familiäre Häufung von Krebserkrankungen, vor allem beim Mammakarzinom und beim kolorektalen Karzinom. Des Weiteren sollten auch hormonelle Faktoren, das Lebensalter, die Ernährung sowie individuelle Lebensgewohnheiten nicht vernachlässigt werden.

## **1.2 Benigne Tumoren des Kolons**

Als Polyp wird jede makroskopisch erkennbare Gewebsvermehrung bezeichnet, die sich über das Schleimhautniveau erhebt und somit ins Darmlumen hineinragt.

Im Kolon unterscheidet man entzündliche und hyperplastische Polypen, Adenome und Hamartome.

Die WHO klassifiziert die Polypen in sechs verschiedene Formen:

- nicht neoplastischer Polyp

- neoplastischer Polyp
- Adenom
- Adenom mit hochgradiger Dysplasie
- serratierte Adenome
- Adenom mit Karzinom
- andere neoplastische Polypen

Entzündliche und hyperplastische Polypen sind kleine, oft auf Falten spitzen sitzende gutartige Veränderungen der Schleimhaut.

Neoplastische Polypen haben einen tumorösen Charakter und werden deshalb auch als „kolorektale Adenome“ bezeichnet. Adenome sind benigne Tumoren, die auf das Epithel der Darmschleimhaut zurückgehen, und verschiedene dysplastische Veränderungen aufweisen können. Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus solchen Adenomen. Um dies möglichst zu verhindern, sollten Adenome, die bei einer Koloskopie entdeckt werden, entfernt werden. Ursache für das Vorkommen von kolorektalen Adenomen ist, sowohl bei den sporadischen als auch bei den familiären Formen, ein Verlust des FAP-Gens auf Chromosom 5q21, einem sogenannten Tumorsuppressorgen.

### **1.3 Das kolorektale Karzinom**

Im Allgemeinen gehen kolorektale Adenome mit einem Entartungsrisiko von 50 - 60% einher (55). Patienten mit positiver Familienanamnese haben ein zwei-bis dreimal höheres Risiko. Die Entwicklung eines Karzinoms verläuft in mehreren Schritten. Sie geht vom normalen Gewebe über gering-, mittel-, und hochgradige Dysplasie (55), welche noch als Vorstufe des Karzinoms angesehen wird. Ein invasives Karzinom liegt vor, wenn das Wachstum die lamina muscularis mucosae infiltriert. In diesem Stadium kann eine Metastasierung erfolgen. Das Kolonkarzinom ist ein maligner Tumor des Dickdarms und nach dem Bronchialkarzinom beim Mann und nach Mammakarzinom bei der Frau die zweithäufigste maligne Erkrankung. Die Inzidenz hat sich für beide Geschlechter in den letzten 20 Jahren verdoppelt. 90% der kolorektalen Karzinome finden sich nach dem 50. Lebensjahr.

### Häufigkeitsverteilung KRK im Kolon

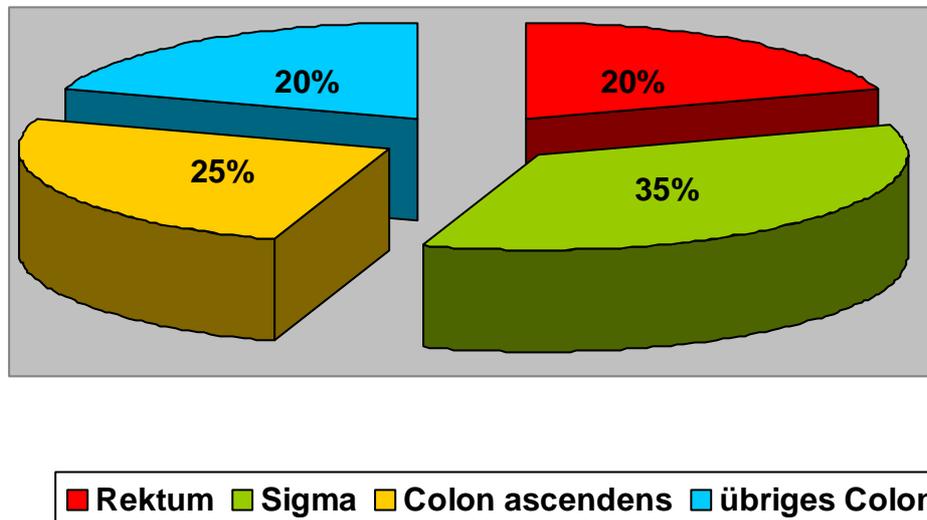


Abb. 1: Häufigkeitsverteilung hinsichtlich der Lokalisation (53)

#### 1.3.1 Risikofaktoren und Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Das Karzinomrisiko in der Normalbevölkerung der über 40-jährigen beträgt 6%.

Dies ist in den jeweiligen Risikogruppen deutlich erhöht:

tubuläres Adenom: 1-10%

tubulo-villöses Adenom: bis 20- 50%

villöses Adenom: bis 20-50%

Verwandte 1. Grades eines KRK – Patienten (>60J.): 10%

Verwandte 1. Grades eines KRK – Patienten (<60J.): 30%

Patienten mit Colitis Ulcerosa: bis 15%

Patienten mit HNPCC: 75%

Patienten mit FAP: 100% (25)

In der Ätiologie spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle. So ist zum Beispiel die familiäre adenomatöse Polyposis eine obligate Präkanzerose. Ursächlich sind Mutationen im APC-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 5q21. Das HNPCC (hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom Syndrom) ist ebenfalls autosomal dominant erblich. Es sind mehrere DNA-Reparaturgene mit dem Auftreten typischer Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) mutiert. Bei Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kommt es zu Längenveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen als

Folge defekter DNA-Reparaturproteine. Als weitere Risikofaktoren zählen ballaststoffarme, fleischreiche und fettreiche Kost, sowie langjähriges Zigarettenrauchen und Alkoholkonsum (47).

### 1.3.2 Tumorprogressions Modell zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Die Tumorgenese des Kolonkarzinoms ist durch eine histologische und makroskopische Progression gekennzeichnet (Adenom-Karzinom Sequenz) (30). Diese Progression vom normalen Gewebe über Adenome hin zum Karzinom dauert um die fünf bis zehn Jahre. Dieser vieljährige Prozess führt über morphologisch determinierte Zwischenstufen (Dysplasien) zum Karzinom. Es wird durch die Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen (55) von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verursacht.

An der Tumorprogression sind ein dominantes Onkogen (K-ras) sowie drei verschiedene Tumorsuppressorgene (APC; DCC; p53) regelmäßig beteiligt. Abbildung 2 zeigt das Modell der Karzinomentstehung nach Vogelberg.

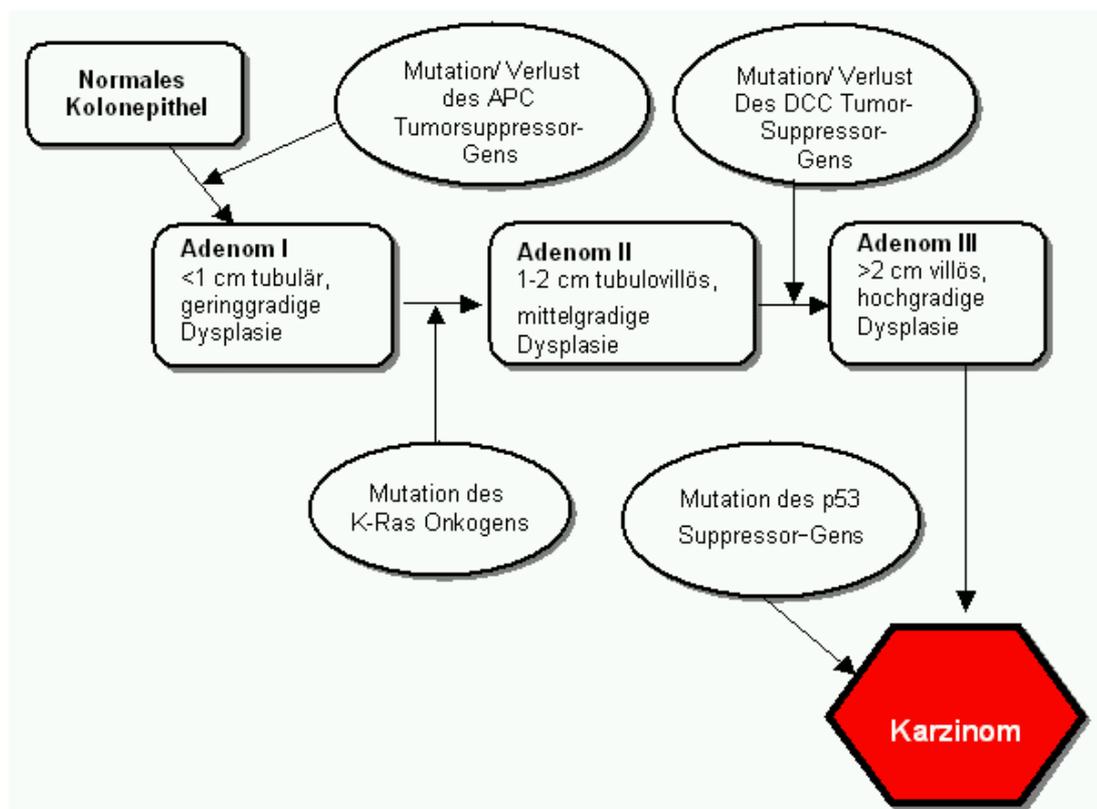


Abb. 2: Chromosomeninstabilitäts-Pathway (25)

Neben diesem Modell existiert eine weitere Form, die der Mikrosatelliteninstabilität, wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, die über das ganze Genom verteilt sind und aufgrund ihrer inter-individuellen Variabilität breite molekulargenetische Anwendung, u.a. beim Vaterschaftsnachweis, der Knochenmarkstypisierung und der Kopplungsanalyse, finden. Die DNA-Polymerase ist aufgrund der repetitiven Sequenzen der Mikrosatelliten sehr anfällig für Fehler an diesen Orten und kann einen «repeat» zuviel oder zuwenig einbauen. Dieser Fehler wird in Tumoren mit defizienter DNA-Reparatur nicht mehr korrigiert und das Auftreten von neuen Allellängen im Tumor – verglichen zum Normalgewebe – wird deshalb als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet (29).

Damit der MSI-Test eine zuverlässige Aussage erlaubt, sollte der Tumoranteil  $\geq 70\%$  betragen und mindestens ein Panel von fünf Mikrosatellitenmarkern untersucht werden.

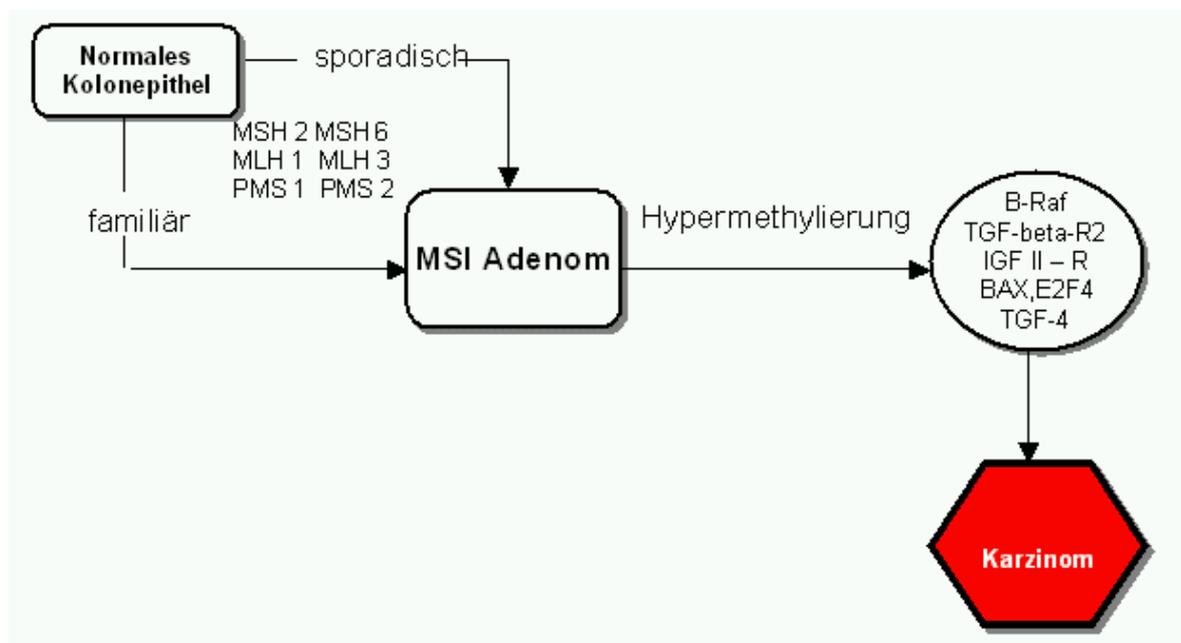


Abb. 3: Mikrosatelliteninstabilitäts-Pathway (6)

### 1.3.3 Klassifikation und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Die folgende Tabelle zeigt die von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) weltweit festgelegte TNM-Klassifikation (2002) zur Stadieneinteilung von malignen kolorektalen Tumoren, sowie die etwas ältere Einteilung nach Dukes, die eine geringere klinische Relevanz aufweist.

**Tab. 1:** Stadieneinteilung des KRK

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

In der pathologischen TNM-Klassifikation werden die histopathologisch gewonnenen Erkenntnisse berücksichtigt. Einzelheiten können der Tabelle 2 entnommen werden.

**Tab. 2:** pTNM-Klassifikation der UICC (2002)

Tis	Sog. präinvasives Karzinom: intraepithelial oder mit Infiltration der lamina propria mucosae
T1	Tumor erstreckt sich in die Submukosa
T2	Tumor erstreckt sich in die Muscularis propria
T3	Tumor erstreckt sich bis in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes, perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor durchschreitet das viscerale Peritoneum oder erstreckt sich direkt in andere Nachbarorgane oder Gewebe
N0	Keine Lymphknotenmetastase; Aussage nur erlaubt, wenn mind. 12 LK untersucht wurden
N1	Befall von bis zu 3 regionären parakolischen oder perirektalen LK
N2	Befall von 4 oder mehr regionären parakolischen oder perirektalen LK
NX	Keine Beurteilung der LK möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

### 1.3.4 Symptomatik, klinisches Bild, Prognose des kolorektalen Karzinoms

Die klinischen Symptome beim Kolonkarzinom sind meist sehr uncharakteristisch. Es gibt keine zuverlässigen Frühsymptome. Ein Hinweis kann Blutbeimischung im Stuhl sein. Des Weiteren sollte jede plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheiten abgeklärt werden. Ferner können auch Leistungsminderung, Müdigkeit, Nachtschweiß, Gewichtsverlust oder unklare abdominelle Schmerzen auf eine

Krebserkrankung hinweisen. Hinzu kommen laborchemische Zeichen einer Eisenmangelanämie. Spätsymptome können Ileuserscheinungen, Schmerzen und evtl. ein tastbarer Tumor sein.

Die Metastasierung kann lymphogen aber auch hämatogen erfolgen. Am häufigsten ist die Leber betroffen, gefolgt von der Lunge; erst danach folgen andere Organe.

Bei 25% der Patienten werden zum Zeitpunkt der Diagnose Lebermetastasen gefunden; über 50% aller KRK Patienten entwickeln während des Krankheitsverlaufs Lebermetastasen. Die Metastasensuche erfolgt mittels Röntgen-Thorax, Sonografie, sowie bei Verdacht, ein CT der Leber.

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms verschlechtert sich in Abhängigkeit des UICC Stadiums. Wird die Diagnose im Stadium I gestellt, beträgt die durchschnittliche 5-JÜR bis zu 95%. Wird die Krankheit in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, verschlechtert sich die Prognose zunehmend, was in Abbildung 4 gezeigt wird.

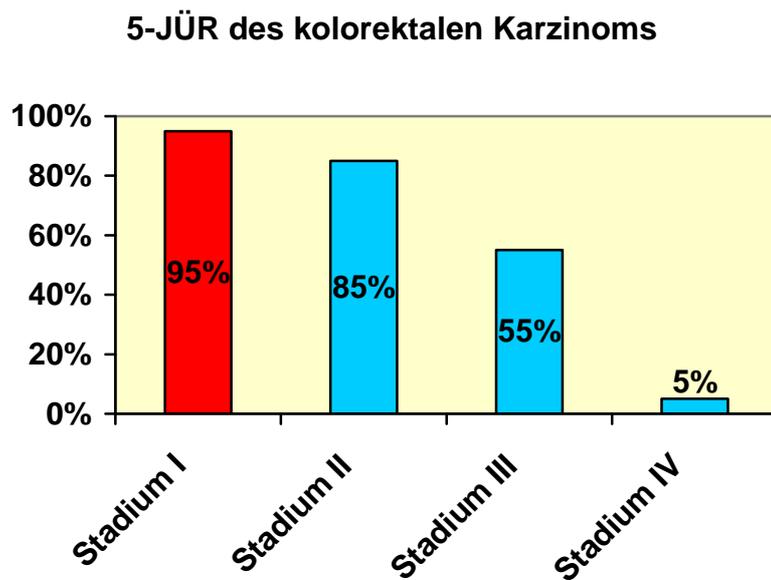


Abb. 4: (modifiziert nach 55)

### 1.3.5 Therapiemöglichkeiten

Das therapeutische Vorgehen beim kolorektalen Karzinom ist im Wesentlichen vom Stadium der Erkrankung abhängig. Grundsätzlich gibt es die Möglichkeit der (radikal) chirurgischen, endoskopischen, strahlen- und/oder chemotherapeutischen, medikamentösen und interventionell radiologischen Maßnahme. In der kurativen chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms wird je nach Tumorlokalisation zwischen rechter und linker Hemikolektomie, sowie der

Transversumresektion unterschieden. Beim Rektumkarzinom erfolgen in der Regel eine Tumorresektion im Gesunden und eine partielle oder totale En-bloc-Resektion des Mesorektums und des regionären Lymphabflussgebietes (22). Als neoadjuvante Tumorthherapie beim Rektumkarzinom wird die simultane Radiochemotherapie empfohlen, da hier die Möglichkeit einer Verkleinerung des Tumors gegeben ist, und somit ein primär nicht resezierbarer Tumor operabel wird. Die Voraussetzung einer adjuvanten Chemotherapie ist eine R0-Resektion des Primärtumors. Die Basis der Chemotherapie besteht im wesentlichen aus einer Kombination von 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin (62). In der palliativen Therapie kann die Passage durch lokale Tumorbehandlung, eine Umleitungsoperation oder eine Stomaanlage erhalten, bzw. wiederhergestellt werden. Goldstandard in der palliativen Situation ist derzeit ein Chemotherapie Protokoll nach FOLFOX oder FOLFIRI (43).

### 1.3.6 Differenzialdiagnosen des kolorektalen Karzinoms

#### Reizdarmsyndrom (RDS):

50% aller Patienten mit Magen- Darmbeschwerden haben ein Reizdarmsyndrom. Psychische Belastungsfaktoren spielen in der Ätiologie der Krankheit eine große Rolle. Der Darm wird dabei als psychomotorisches Belastungsfeld gesehen. Die Beschwerden treten verstärkt nach Ärger und Stress auf. Die Diagnose bezieht sich auf die ROM-III Kriterien von 2006.

#### **Tab 3.:** Diagnostische Kriterien des RDS nach ROM-III-Kriterien

Für mindestens drei Tage pro Monat während der vergangenen drei Monate rezidivierende abdominelle Schmerzen oder abdominelles Unwohlsein in Assoziation mit mindestens zwei der folgenden Faktoren:

1	Besserung der Beschwerden nach der Defäkation.
2	Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlfrequenz.
3	Beginn der Beschwerden in Assoziation mit einer Änderung der Stuhlkonsistenz.

Die Kriterien müssen für die vergangenen drei Monate erfüllt sein, und die Symptome müssen mindestens sechs Monate vor Diagnosestellung begonnen haben (18).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen:

Unter dem Begriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ werden die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn zusammengefasst. Die Ätiologie beider Krankheiten ist unbekannt.

Die Colitis ulcerosa ist eine entzündliche Dickdarmerkrankung mit kontinuierlicher Ausbreitung und Ausbildung von Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhaut. Der Dünndarm ist nie mit betroffen, die Colitis bleibt auf das Kolon beschränkt. Bei langjährigem Verlauf der Krankheit ist das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken signifikant erhöht. Das Krebsrisiko korreliert mit Ausmaß und Dauer der Erkrankung.

Morbus Crohn ist eine diskontinuierlich, segmental auftretende Entzündung auch der tiefen Wandschichten des gesamten GIT, mit häufigster Beteiligung des terminalen Ileum und proximalen Kolon. 50% der Betroffenen tragen eine Mutation des CARD15- Gens auf Chromosom 16. Die Krankheit verläuft schubweise. Anders als bei der Colitis Ulzerosa führt eine komplette Darmresektion nicht zur Heilung der Krankheit. Das Risiko für kolorektale Karzinome ist geringer als bei der Colitis ulcerosa, bei langjährigem Verlauf dennoch erhöht, weswegen regelmäßige Kontrollkoloskopien indiziert sind.

Hyperplastische Polypen:

Sie zählen zu den häufigsten pathologischen Veränderungen des Kolons und werden normalerweise als harmlose Befunde betrachtet, die wenig oder kein Potential aufweisen, sich zu einem kolorektalen Karzinom zu entwickeln. Allerdings legt aktuelle Literatur nahe, dass einige dieser Polypen morphologisch und genetisch auffällig sind und zu Mikrosatelliten-instabilen kolorektalen Karzinomen führen können. Es stellten sich hyperplastische Polypen als pathologisch-anatomisch nicht vollkommen homogene Gruppe heraus, und wurden eher mit KRK in Verbindung gebracht.

### **1.3.7 Diagnostische Möglichkeiten**

Laut der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten stehen folgende Präventionsuntersuchungen zur Verfügung:

- |                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| - FOBT                         | - CT-Kolonographie              |
| - Immunologische Testverfahren | - MRT-Kolonographie             |
| - Sigmoidoskopie               | - Molekulare Screeningverfahren |
| - Sigmoidoskopie + FOBT        | - Koloskopie                    |

Zur Diagnostik des kolorektalen Karzinoms gehören in jedem Fall eine ausführliche (Familien)anamnese, eine rektale Austastung und der FOBT, welcher Stuhlproben auf versteckte Blutbeimischung untersucht. Bei der Sigmoidoskopie handelt es sich um eine "kleine" Darmspiegelung, bei der nur das letzte Viertel des Dickdarmes von innen begutachtet wird. Die Koloskopie ist ein invasives Verfahren mit hoher Sensitivität bis zu 98% (57), das Diagnostik und therapeutische Polypektomie kombiniert.

Bei Patienten, die auf Grund eines stenosierenden Karzinoms nicht komplett koloskopiert werden können, empfehlen sich präoperativ zusätzlich Untersuchungen mittels Spiral-Computertomographie oder MRT (62). Die virtuelle Koloskopie ist eine Untersuchung mit dem Computer-Tomographen. Für die Untersuchung ist keine Kontrastmittelapplikation notwendig. Es muss jedoch ebenso wie bei der endoskopischen Koloskopie der Darm mit Abführmittel komplett gereinigt werden. Auf Grund der fortgeschrittenen Technik mit mehrzeiligen Spiral CT Geräten ist es heutzutage möglich, mittels geeigneter Computersoftware aus zweidimensionalen Schichtbildern dreidimensionale Bilder zu erstellen. Auf diese Weise kann das Darminnere virtuell dargestellt und begutachtet werden. Die Patienten sind dabei allerdings einer Strahlenexposition ausgesetzt. Die Untersuchung wird in Low-Dose Technik durchgeführt, was eine Strahlenbelastung von 1,2 mSv (60) bedeutet. Diagnostische Probleme bei der CT-Kolonografie können Stuhlreste und eine schlechte Entfaltung des Darmlumens bereiten. Die Detektion flacher, eingesenkter und kleiner Polypen ist schwieriger als die prominenter Polypen. Aufgrund mangelnder Standardisierung sind die Ergebnisse derzeit stark zentrenabhängig (62). Da es sich um ein nicht invasives Verfahren handelt, kann während der Untersuchung keine Biopsie entnommen werden. Bei verdächtigen Läsionen muss in jedem Fall eine klassische Koloskopie erfolgen. Die virtuelle Koloskopie kann zur Früherkennung von Darmkrebs eingesetzt werden. Ihr Vorteil ist, dass auch die umliegenden Bauchorgane erfasst und beurteilt werden können. Sie ist derzeit von den Fachgesellschaften nicht außerhalb von Studien zum Screening empfohlen. Sie ist jedoch indiziert, wenn die Durchführung einer Koloskopie unmöglich ist.

Die Kernspin-Tomographie ist ein Verfahren, das im Gegensatz zu einer CT-Untersuchung nicht mit Röntgenstrahlen, sondern mit Magnetfeldern und Radiowellen arbeitet. Bei diesem Verfahren entstehen ebenfalls Schichtbilder, die in dreidimensionale Bilder umgerechnet werden können. Bei der MR-Kolonographie

ist eine Patientenvorbereitung entsprechend der für die konventionelle Koloskopie erforderlich. Zur Darstellung des Darms benötigt man die Anwendung von Kontrastmitteln. Diese wird entweder über einen rektal eingeführten Katheter oder oral appliziert. Außerdem muss ein Spasmolytikum i.v. verabreicht werden, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Aus dem Quelldatensatz wird dann mit der entsprechenden Software die virtuell endoskopische Ansicht erstellt (59). Sie ist als „Suchmethode“ und zur Demonstration der Befunde geeignet. Das Verfahren ist jedoch hinsichtlich der Bildqualität der CT-Kolonographie noch unterlegen.

## 1.4 Screening Methoden

Im Verlauf unserer Studie wurden der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT), die Koloskopie, der Schebo Test und der Genefec Test als Screeningmethoden angewandt.

### 1.4.1 Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT, Hämoccult)

Da kolorektale Polypen und Karzinome häufiger zu Blutungen neigen als die gesunde Darmschleimhaut, vermag der FOBT bei regelmäßiger Durchführung die Mortalität an kolorektalen Karzinomen signifikant zu senken.(62) Dieses klinische Symptom tritt jedoch auch gehäuft bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf, so dass der Test nicht tumorspezifisch ist. Die Sensitivität hängt stark von der ordnungsgemäßen Durchführung ab. Der Test auf okkultes Blut im Stuhl beruht auf der Guaiak Methode. Es wird die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins nachgewiesen. Hämoglobin kann ein Sauerstoff Atom von einem O<sub>2</sub> Donator (Hydrogen Peroxidase) auf ein Chromogen wie zum Beispiel Guaiak Säure übertragen. In seiner reduzierten Form ist das Chromogen farblos, im oxidierten Zustand jedoch wird es farbig. Ein mit Guaiak-Harz imprägniertes Filterpapier verfärbt sich in Anwesenheit von Hb blau, wenn Wasserstoff- Peroxidase hinzugefügt wird. Der FOBT besteht aus drei Streifen mit jeweils zwei Fenster für die Stuhlproben. Das Sammeln der Stuhlproben sollte von drei aufeinanderfolgenden Stuhlgängen erfolgen. Der Hämoccult gilt als positiv zu bewerten, wenn sich einer der Streifen verfärbt. Der Test ist einfach und kostengünstig durchzuführen. Eine mangelhafte Sensitivität des Haemoccult®-Test lies sich anhand von Daten aus acht verschiedenen Studien aufzeigen. (3; 5; 16; 23; 42; 44; 45; 61) Insgesamt waren nur 41 (26 %) von 159 kolorektalen Karzinomen und 36 (12 %) von 302 großen Adenomen im Haemoccult® positiv (2).

Der physiologische Blutverlust im Stuhl beträgt 0,5 – 1,5 ml/d. Der FOBT reagiert in >50% positiv bei Blutverlusten > 20 ml/d. Polypen und Karzinome mit geringeren Blutverlusten werden nicht erfasst. Im Falle eines positiven FOBT Ergebnisses ist eine Untersuchung des gesamten Darms mittels Koloskopie angezeigt.

#### **1.4.2 Sigmoidoskopie und Koloskopie**

Die flexible Sigmoidoskopie bietet wie die komplette Koloskopie die Möglichkeit von Diagnose und therapeutischem Entfernen der Polypen. Die Untersuchungsvorbereitungen sind nicht so aufwendig, weshalb sie von vielen Patienten besser toleriert wird wie die Koloskopie. Ein Nachteil der Sigmoidoskopie ist, dass eben nicht das gesamte Kolon untersucht werden kann, wodurch bis zu 50% aller Polypen übersehen werden (51). Die komplette Koloskopie stellt den Goldstandard in der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms dar und sollte bei jeder perianalen Mikro- und Makroblutung zur Tumorsuche erfolgen. Ferner ist sie bei unklarer Anämie, Stuhlnregelmäßigkeiten, Obstipation und in der Tumornachsorge indiziert. Sie dient jedoch auch bei asymptomatischen Patienten als Krebs Vorsorgeuntersuchung und wird ab dem 55. Lebensjahr empfohlen (61). Zur Durchführung muss der Dickdarm des Patienten vorbereitet werden, da die Aussagekraft bei sauberem, entleertem Darm steigt. Hierfür eignet sich am besten das Trinken von drei Liter Natriumsulfat oder Polyäthylenglycol. Das Kolon kann alternativ auch mit Sennapräparaten oder Bisacodyl gereinigt werden, was von vielen, meist älteren Patienten, als unangenehm empfunden wird. Deshalb empfiehlt sich eine sedierende Prämedikation, bestehend aus einer Kombination von Midazolam und Tramadol, bzw. Propofol. Danach darf für 24 Stunden nicht aktiv am Straßenverkehr teilgenommen werden. Die Untersuchung kann im Rahmen eines stationären Aufenthalts oder ambulant durchgeführt werden. Heute werden Video-Koloskope verwendet, die an der Spitze einen Videochip besitzen und das Bild auf einen Monitor übertragen. So ist es möglich, dass der Patient die Untersuchung mit verfolgt. Das Koloskop ist mit einer Absaugvorrichtung ausgerüstet um flüssige Stuhlreste und Spülflüssigkeit absaugen zu können. Ein Arbeitskanal ermöglicht das Einführen von kleinen Instrumenten (Zangen und Schlingen) mit denen kleine Gewebeproben bzw. Polypen entnommen werden können.

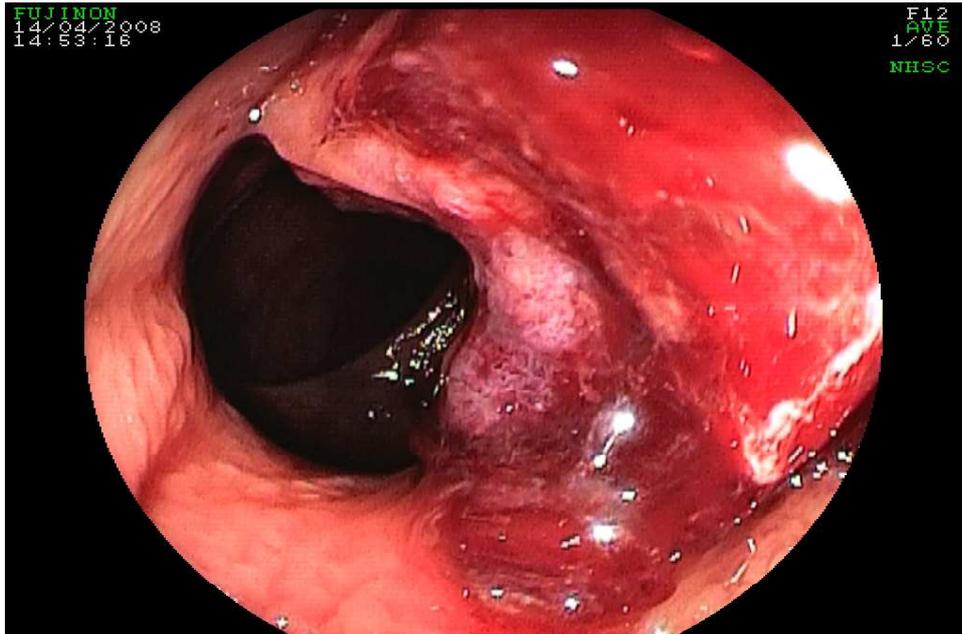


Abb.5: Koloskopiebefund eines KRK (UKH)

Die Koloskopie ist diagnostisch und therapeutisch aus der Gastroenterologie nicht mehr wegzudenken. Sie ermöglicht das therapeutische Verfahren der endoskopischen Polypektomie. Da ein Polyp als ein wesentlicher Vorläufer für ein kolorektales Karzinom gilt und ab einer Größe von einem Zentimeter mit 1% Wahrscheinlichkeit ein T1-Karzinom trägt, sollte jeder Polyp mit einer Größe > 5mm endoskopisch entfernt werden. Durch eine vollständige Rektosigmoidoskopie mit bedarfsweiser Entfernung vorhandener Polypen kann bei einem 55jährigen Patienten das Risiko, innerhalb der nächsten 10 Jahre an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, bis zu 80% reduziert werden. Die komplette Koloskopie liefert die besten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität bei der Diagnosestellung des kolorektalen Karzinoms oder Adenoms. Gleichzeitig beinhaltet sie den Vorteil von Diagnosestellung und Therapie, da kleine Polypen oder Polypknospen bei der Untersuchung entfernt werden können. Die Koloskopie ist somit derzeit das Standardverfahren in der kolorektalen Krebsvorsorge. In unserer Studie diente die Koloskopie als Referenztest, um Patienten mit kolorektalem Karzinom von Patienten ohne Karzinom zu unterscheiden, und die Patienten in eine der 6 Gruppen einzuteilen.

### 1.4.3 Tumor M2 Pyruvat Kinase

Die Pyruvatkinase ist ein Schlüsselenzym des Glukosestoffwechsels, das Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse (unter Gewinnung eines Moleküls ATP) dephosphoryliert. Sie kommt in unterschiedlichen Geweben in

vier unterschiedlichen Isoformen vor. Die M2-PK ist ein für die Lunge spezifisches Enzym. In ihrer aktiven Form sind alle vier Isoenzyme Tetramere. Bei der Tumorentstehung beobachtet man einen Verlust des gewebespezifischen Isoenzym. Es wird die eigentlich lungenspezifische M2-PK gebildet. Seine Up-Regulation wird von HIF-1 und ras- Proteinen kontrolliert. Beide sind bei GIT-Tumoren häufig mutiert. Das Isoenzym zerfällt in die weniger aktive dimere Form. Diese wird spezifisch von Krebszellen sezerniert und heißt deswegen Tumor-M2-PK. Sie ist mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im ELISA Verfahren nachweisbar, und kann mittlerweile auch aus Stuhlproben der Patienten detektiert werden. Der Richtwert im Stuhl liegt bei  $< 4$  U/ml. Die Sandwich ELISA Methode basiert auf zwei monoklonalen Antikörper, die mit den „gesunden“ Isoenzymen nicht kreuzreagieren. Die T-M2-PK ermöglicht einen Einblick in die metabolische Situation, oder den Aktivitätszustand der Tumorzellen. Sie ist tumor- ,jedoch nicht organspezifisch, wodurch ein krebskranker Patient von einem nicht krebskranken unterschieden werden kann.

**Methodik (Empfehlung des Herstellers):**

100 mg Stuhl wird mit 2 ml Extraktionspuffer vermischt, dann 1:20 verdünnt und auf der mit tumor-M2-PK-spezifischen Antikörpern beschichteten Platte inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Antikörpers (tumor-M2-PK-spezifisch). Der Test differenzierte trotz der noch kleinen Fallzahl hochsignifikant zwischen Kontrollpersonen und Karzinompatienten ( $p < 0,01$ ), sowie zwischen Patienten mit Polypen und Kontrollpatienten.

**ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay):**

Es ist eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen, Hormonen, Vitaminen, Pharmaka, Krankheitserregern u.a. (Nachweisgrenze im Picogramm-Bereich [10-12 g]).

Eine sehr schwache immunologische Reaktion wird durch Zugabe eines hochempfindlichen Indikators (Enzym, Multiplikationseffekt) sichtbar.

Der eigentlich Nachweis der Testsubstanz erfolgt durch die Antigen-Antikörper-Reaktion (hohe Spezifität). In unserem Fall ist die ELISA-Platte mit einem monoklonalen Antikörper, der nur das Tumor spezifische Isoenzym der humanen Pyruvatkinase (Tumor M2-PK) erkennt, beschichtet. Tumor M2-PK aus Stuhlproben wird durch Bindung am Antikörper immobilisiert, darauf folgt eine Inkubation mit einem zweiten mAk gegen die Tumor M2-PK. Dieser Antikörper ist mit Biotin

markiert und reagiert in der nächsten Inkubation mit dem Konjugat von POD (Peroxidase) und Streptavidin. Die Peroxidase oxidiert ein Substrat (2,2-Azino-bis-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure), was anschließend photometrisch bestimmt wird. Auf Grund der hohen Inzidenz des Kolonkarzinoms in den Industriestaaten sind innovative Screeningmethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität sinnvoll, um die Erkrankung in frühen Stadien zu diagnostizieren, und somit die Heilungschancen zu erhöhen. Darüber hinaus sollen diese Methoden kosteneffektiv und ohne große Belastung für die Personen sein. Unter dem Begriff Tumormarker werden Substanzen zusammengefasst, die bei der Tumorsuche, der Identifizierung, der Prognosebeurteilung und der Therapiekontrolle hilfreich sein können. Tumormarker sind für ein Screening asymptomatischer Personengruppen nicht geeignet, da hierfür sowohl Spezifität, wie auch Sensitivität zu gering sind. Dagegen ist ein Screening symptomatischer Personen oder bestimmter Risikogruppen mit folgenden Tumormarkern möglich: AFP bei Patienten mit Leberzirrhosen und somit erhöhtem Risiko für ein primäres Leberzellkarzinom, Calcitonin bei familiär vorbelasteten Personen für ein Schilddrüsen C-Zellkarzinom, PSA bei Männern über 50 Jahren in Verbindung mit rektaler Untersuchung. Zur Ausschlussdiagnostik eines Phäochromozytoms bei arterieller Hypertonie eignet sich die Katecholaminbestimmung im Urin. Beim CRC werden Tumormarker momentan vor allem zur Verlaufskontrolle nach chirurgischer Entfernung oder nach Chemotherapie verwendet. Tumormarker sind meist tumorassoziierte Signalsubstanzen des Tumorgeschehens von Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratcharakter, die in oder auf Tumorzellen vorkommen. Einige von ihnen sind als zirkulierende Antigene im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten (Aszites, Pleuraflüssigkeit) messbar. Ihre Konzentration resultiert aus der Summe von TM-Expression, -Synthese, -Freisetzung, -Katabolismus, -Exkretion sowie der Tumorblutversorgung. Sie kann mit der Entstehung, Ausbreitung und therapiebedingten Tumorverkleinerung korrelieren. Nach ihrer Herkunft handelt es sich z.B. um Vorstufen normaler Antigene wie Blutgruppensubstanzen (z.B. CA 19-9), ektopisch gebildeter Hormone, Enzyme oder karzinofetale Antigene (z.B. AFP, CEA). Ihre Bestimmung ist heute durch hochempfindliche kommerziell verfügbare radio- oder enzymimmunologische Tests unter Verwendung poly- wie monoklonaler Antikörper reproduzierbar und standardisiert. Die Genprodukte von Onkogenen sind in Signalketten zu finden, die von Wachstumsfaktoren angestoßen werden. Tumorsuppressorgene kommen bei der Regulation des Zellzyklus vor.

## 1.5 Störung des Zellzyklus

Beim Übergang von G1 zur S- Phase einer Zelle ist der „Wächter“ p53 von großer inhibitorischer Bedeutung (34). Etwa 50% aller humanen Tumoren tragen eine Mutation in den p53 Allelen. Bei der Entstehung des Kolonkarzinoms sind mehrere mutierte Gene beteiligt. Die bekanntesten sind apc (adenomatous polyposis coli), K-ras, und das Tumorsuppressor Gen p53. In unserer Studie wurden aus Stuhlproben gewonnene Darmepithelzellen auf eine Mutation im K-ras, B-raf, p53 Gen und long DNA untersucht. Es wurde getestet, in wie weit sich solche fäkalen Tests zum Screening als Früherkennungsmaßnahme eignen. Hinsichtlich des in Abbildung 2 dargestellten Tumor Progressions Modells wären das DCC Gen sowie das APC Gen interessante Faktoren um sie im Stuhl nachzuweisen.

## **2 Zielstellung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Evaluierung von Tumormarkern in Form eines Stuhl Tests (Genefec) als Screeningmethode für das kolorektale Karzinom. In einer klinischen Studie werden mit primärer Zielstellung Sensitivität und Spezifität des Genefec Tests ermittelt, und mit sekundärer Zielstellung die Ergebnisse mit den Ergebnissen des FOBT bzw. des Tumor-M2-PK Tests verglichen.

### 3 Patienten, Material und Methoden

Die Genefec Studie testete molekulare Tumormarker (K-ras, p53, B-raf, long DNA) in Form von Stuhl Tests hinsichtlich Sensitivität und Spezifität bezüglich ihrer Aussagekraft beim kolorektalen Karzinom. Die molekularen Tumormarker wurden mit bereits gängigen Verfahren, die zur Darmkrebsvorsorge verwendet werden, dem Test auf okkultes Blut im Stuhl und dem Tumor-M2 Pyruvatkinase Test verglichen. Tabelle 4 zeigt eine kurze Zusammenfassung der Studie.

**Tab. 4:** Zusammenfassung der Studie

<b>Zielstellung</b>	Sensitivität und Spezifität von Genefec-2 im Vergleich zu FOBT und Tumor M2-PK
<b>Studiendesign</b>	Phase II Studie an 734 Patienten, die zur Diagnosestellung oder zum Screening koloskopiert wurden. Einteilung in 6 Gruppen aufgrund ihrer Histologie.
<b>Einschlusskriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indikation zur Koloskopie, unabhängig von der Studie</li> <li>- unterschriebene Einverständniserklärung für die Koloskopie</li> <li>- Frauen und Männer im Alter zwischen 40 und 80 Jahren</li> <li>- unterschriebene Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie</li> <li>- normale Blutstillung, sowie normale Thrombozytenzahlen</li> </ul>
<b>Ausschlusskriterien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Patienten mit FAP oder HNPCC</li> <li>- bekanntes malignes Tumorleiden in den letzten 5 Jahren</li> <li>- Patienten mit Kontraindikationen für eine Koloskopie</li> <li>- Patienten, die Vitamin K Antagonisten einnehmen (orale Antikoagulantien)</li> <li>- Schwangere oder stillende Frauen</li> <li>- deutlich mangelnde Patientencompliance</li> </ul>
<b>Studienzentren</b>	- 18 Kliniken bzw. Praxen in Sachsen- Anhalt, Sachsen und Thüringen
<b>Statistische Methoden</b>	Analyse von Sensitivität und Spezifität, sowie positiver und negativer Prädiktion. Vergleich der Gültigkeit der Stuhlscreening Methoden nach Mc Nemar

### 3.1 Studienablauf und Materialgewinnung

Im Rahmen unserer Studie wurden Patienten in 18 klinischen Zentren in Sachsen-Anhalt, Sachsen und Thüringen eingeschlossen.

Voraussetzung für die Teilnahme war, dass die Patienten unabhängig von der Studie koloskopiert wurden, darüber aufgeklärt waren, und eine Einverständniserklärung unterschrieben hatten.

Danach folgte eine Aufklärung über die Studie sowie eine Einführung über das Sammeln der Stuhlproben. Dies musste vor der notwendigen Darmreinigung geschehen, da die Proben andernfalls zu wässrig und somit nicht mehr auswertbar waren. Mit Unterschreiben der Einverständniserklärung über die Teilnahme an der Studie wurden die Patienten eingeschlossen. Jeder Proband wurde mit einem spezifischen Code versehen, um die Identität der Patienten zu verblinden.

Ein Fragebogen beschäftigte sich mit Angaben zu Geschlecht, Alter, Stuhlkonsistenz, und Ernährungsgewohnheiten hinsichtlich Fleisch und Ballaststoffen. Die Patienten erhielten die drei verschiedenen Tests und schickten die Stuhlproben, die zu Hause zu entnehmen waren an die Studienzentrale zurück.

Vor der Entnahme der Stuhlproben mussten keinerlei intestinale Vorbereitungen getroffen oder bestimmte Diäten eingehalten werden. Die Entnahme der Stuhlproben aus der Toilette erfolgte mit geeigneten Hilfsmittel (kleine Holzspatel). Der FOBT besteht aus drei Teststreifen mit jeweils zwei Fenstern für die Stuhlproben. Die drei Stuhlproben sollten von drei aufeinanderfolgenden Stuhlgängen entnommen werden.

Die Stuhlproben für den Schebo und den Genefec-2 Test sollten zusammen mit dem letzten FOBT entnommen werden. Für den Genefec-2 Test wurden 3 Stuhlproben in drei unterschiedliche Behälter gegeben.

Die Stuhlproben sollten dann von den Patienten in den dafür vorgesehenen Päckchen an das Studienzentrum der Universität Halle geschickt werden. Nach der Ankunft in der Studienzentrale wurden sie bei -20°C aufbewahrt. Die molekularen Tests (Genefec-2) wurden in Bergen, Norwegen, ausgewertet. Der Tumor M2-PK Test der FOBT wurden im Labor der Universitätsklinik Halle ausgewertet. Die Darmreinigung für die Koloskopie begann erst nach der letzten Stuhlprobenentnahme. Als letzter Schritt erfolgte die Koloskopie. Der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 6 dargestellt.

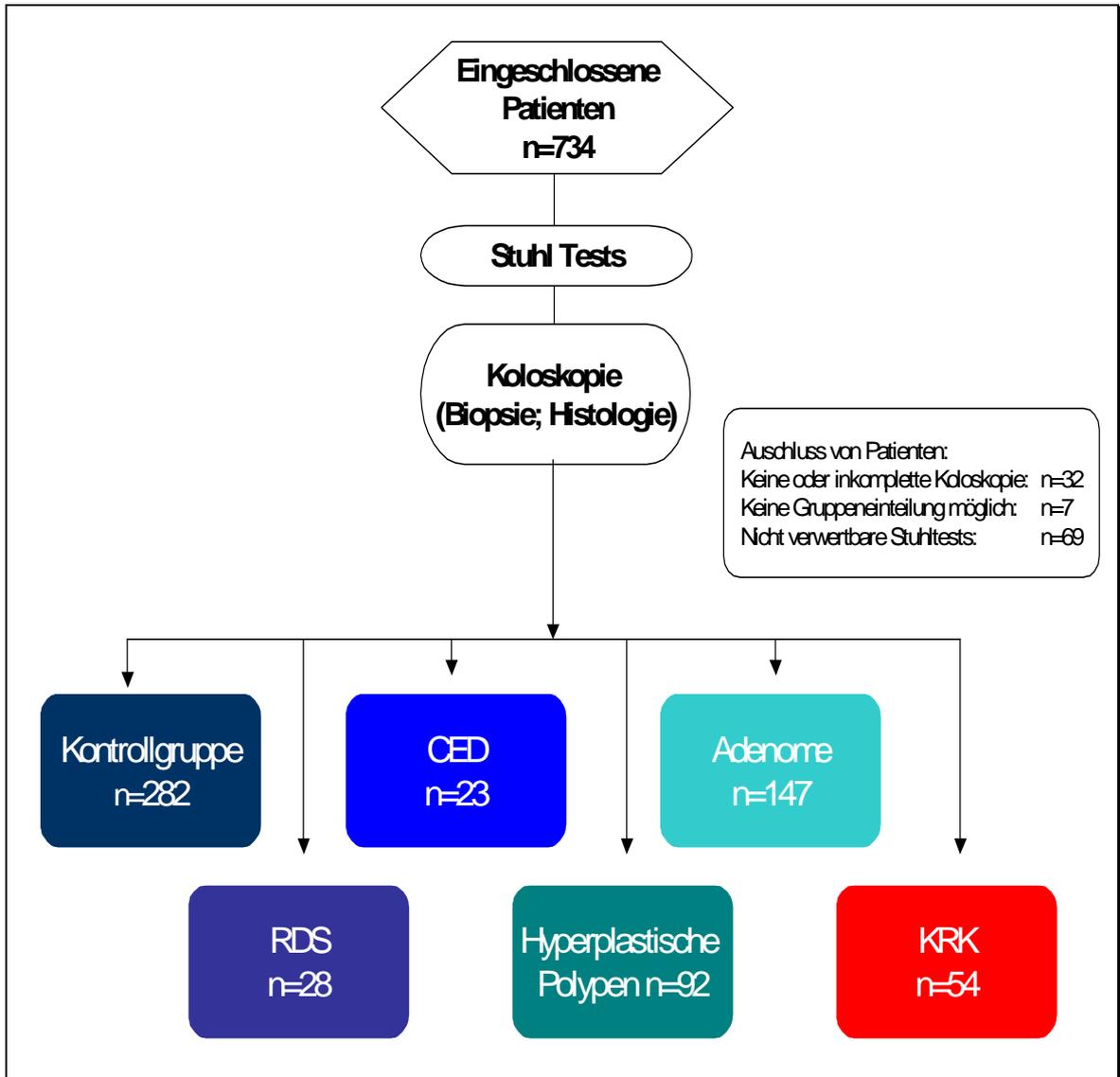


Abb. 6: Studienablauf

### 3.2 Studienzentren

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Studienzentren aufgelistet.

**Tab. 5:** Auflistung der Studienzentren

1	Dr. med. M. Dollinger PhD	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I Ernst-Grube-Straße 40 06097 Halle
2	Prof. Dr. med. B. Zipprich	Kreiskrankenhaus Delitzsch Klinik für Innere Medizin Dübener Str. 3-9 04509 Delitzsch
3	Dr. med. P. Martin	Helios Klinik Schkeuditz Abteilung für Innere Medizin Kursdorfer Str 50 04435 Schkeuditz
4	Dr. med. Hammelmann	St. Elisabeth-Krankenhaus Klinik für Innere Medizin Mauerstr. 5-10 06110 Halle
5	Dr. med. Ernst	Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannstrost Klinik für Innere Medizin Merseburger Str. 165 06112 Halle
6	Dr. med. H.-J. Bronisch	Katholisches Krankenhaus St. Johann Nepomuk Innere Abteilung Haarbergstr. 72 99097 Erfurt
7	Dr. med. Th. Koch	Kreiskrankenhaus Naumburg Innere Abteilung Humboldtstr. 31 06603 Naumburg
8	Dr. med. R. Behrens Dr. med. N. Steudel	Arztpraxis Kleine Marktstraße 3 06108 Halle
9	Dr. med. Th. Zeisler	Arztpraxis Große Steinstraße 32 06108 Halle
10	Dr. med. R. Kuchta Dr. med. Wegener	Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis Johannisplatz 1 04130 Leipzig
11	Dr. med. P. Dietel Dr. med. Klugmann Dr. med. Borkenhagen	Arztpraxis Funkenburgstr. 19 04105 Leipzig
12	Dr. med. H.-W. Scholz Dr. med. Gurk	Arztpraxis An der Ziebiger Kirche 1 06846 Dessau

13	Dr. med. F. Odemar	Innere Klinik Klinikum Bernburg gGmbH Kustrenaer Strasse 98 06406 Bernburg
14	PD Dr. med. E. Schleyer  PD Dr. med. W.-A. Cappeller	Medizinische Klinik II Carl-von-Basedow-Klinikum Weiße Mauer 52 06217 Merseburg Klinik für Allgemein-, Visceral- und Gefäßchirurgie Carl-von-Basedow-Klinikum Weiße Mauer 52 06218 Merseburg
15	PD Dr. med. habil. T. Höfs  PD Dr. med. K. Ridwelski	Klinik für Innere Medizin Städtisches Klinikum Magdeburg Max-Otten-Straße 11-15 39104 Magdeburg Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie Städtisches Klinikum Magdeburg Birkenallee 34 39130 Magdeburg
16	Dr. med. A. Klamann  PD Dr. med. K. Kohlhaw	Innere Klinik Helios-Klinik Borna Rudolf-Virchow-Straße 2 04552 Borna Chirurgische Klinik Helios-Klinik Borna Rudolf-Virchow-Straße 2 04552 Borna
17	Prof. Dr. med. J. Mössner  Prof. Dr. med. J. P. Hauss	Zentrum für Innere Medizin Universitätsklinikum der Universität Leipzig Liebigstraße 27 04103 Leipzig Chirurgische Klinik und Poliklinik II Universitätsklinikum der Universität Leipzig Liebigstr. 20 04103 Leipzig
18	Prof. Dr. med. B. R. Ruf	2. Klinik für Innere Medizin Städtisches Klinikum St. Georg Delitzscher Str. 144 04129 Leipzig

### 3.3 Patientenkollektiv

Es nahmen 734 Patienten an der Studie teil. Als Voraussetzung zur Teilnahme galt eine von der Studie unabhängige Indikation zur Koloskopie. Die Patienten wurden aufgeklärt und bei Einverständnis eingeschlossen. Vor der Koloskopie wurden natürlich abgesetzte Stuhlproben für die jeweiligen Stuhl Tests gewonnen, sowie klinische Daten mit Fragebögen erhoben. Die hauptsächlichen Ursachen eines Ausschlusses aus der Studie waren eine unkomplette Koloskopie (n=32) oder fehlende Stuhlproben (n=69). Bei sieben Patienten war eine Zuteilung zu einer der sechs Gruppen nicht möglich, was ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie führte. Auf Grund ihrer histologischen Diagnose konnten letztendlich 626 Patienten in folgende sechs Gruppen unterteilt werden:

#### Gruppe 1: Kontrollgruppe

Diese Gruppe besteht aus 282 Patienten mit gesunder Darmschleimhaut, ohne KRK, Polypen oder CED. Ihre Indikation für eine Koloskopie war entweder eine Vorsorgeuntersuchung oder die Abklärung unklarer Beschwerden. Es handelt sich hierbei um eine Screening Gruppe.

#### Gruppe 2: RDS

Es wurden 28 Patienten mit der Diagnose eines irritablen Kolons eingeschlossen.

#### Gruppe 3: CED

Die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung betraf 23 Patienten.

#### Gruppe 4: Hyperpl. Polypen

Bei 92 Patienten wurde durch die Koloskopie ein oder mehrere hyperplastische Polypen entdeckt

#### Gruppe 5: Adenome

Diese Gruppe besteht aus 147 Patienten deren Darmschleimhaut bei der Koloskopie einen oder mehrere adenomatöse Polypen aufwies.

#### Gruppe 6: KRK

Diese Gruppe besteht aus 54 Patienten mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom. Das bedeutet, dass mindestens eine pT1 Infiltration vorliegen muss. Es spielt keine Rolle, ob zusätzlich Polypen oder adenomatöse Veränderungen gefunden wurden. Die Erkrankung konnte im

Rahmen der Studie festgestellt werden, oder sie war vor Einschluss in die Studie schon bekannt. In diesem Fall musste der Koloskopiebericht sowie die pathologische Diagnose schriftlich vorhanden sein. Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war, dass die Stuhlproben der Patienten vor Therapiebeginn entnommen worden waren. Patienten, die eine chronisch entzündliche Darmerkrankung haben, und ein Karzinom entwickelten, wurden ebenfalls in diese Gruppe eingeteilt.

<b>Gruppen</b>	<b>Definition</b>	<b>Klinische Symptome und Diagnostik</b>
<b>Gruppe 1:</b> Kontroll Gruppe	Patienten mit gesunder, makroskopisch und histologisch unauffälliger Darmmukosa	Patienten ohne klinische Symptome;
<b>Gruppe 2:</b> RDS	Pat. mit gastrointestinalen Funktionsstörungen, für mindestens drei Tage pro Monat während der vergangenen drei Monate. Die Kriterien müssen erfüllt sein für die vergangenen drei Monate, und die Symptome müssen mindestens sechs Monate vor Diagnosestellung begonnen haben (18).	Klinische Magen-Darmbeschwerden Opstipation, Diarrhö, abdominelle Schmerzen Klinisch, anamnestische Diagnostik nach den ROM III-Kriterien (2006)
<b>Gruppe 3:</b> CED M.Crohn	Diskontinuierlich segmental auftretende Entzündung aller Wandschichten des gesamten GIT mit bevorzugter Lokalisation im terminalen Ileum	Kolikartige Abdominalschmerzen und unblutige Diarrhö, Fistelbildung, anorektale Abszesse Diagnose: Anamnese und Klinik; Koloskopie, Histologie
Colitis Ulcerosa	Kontinuierliche Ausbreitung mit Ausbildung von Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten	Blutig, schleimige Durchfälle, Abdominalschmerz, Tenesmen Diagnose: Anamnese und Klinik, DRU, Koloskopie Histologie
<b>Gruppe 4:</b> hyperplastische Polypen	Kleine, oft auf den Falten spitzen sitzende benigne Veränderung der Darmmukosa	Meist symptomloser Zufallsbefund
<b>Gruppe 5:</b> Adenome	Prä-maligne Läsionen mit bes. Bedeutung für die Pathogenese des KRK;	Meist symptomloser Zufallsbefund im Rahmen einer Koloskopie; evtl. Stuhlunregelmäßigkeiten, Blutungen, Obstruktion Diagnose: Koloskopie, Histologie
<b>Gruppe 6:</b> KRK	Maligner Tumor meist epithelialen Ursprungs (> 90%); fast ausschließlich Adenokarzinome Grenzmarke zwischen Kolon und Rektum: 16 cm zwischen aboralem Tumorrund und Anokutanlinie – mit starrem Rektoskop gemessen	Keine zuverlässigen, oder spezifischen Frühsymptome, evtl. Blutbeimischung im Stuhl, plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheiten, B- Symptomatik

### 3.4 Endoskopisches Screening

Sowohl die Sigmoidoskopie als auch die komplette Koloskopie bieten die Möglichkeit von Diagnose und Therapie in einem Schritt. Die Vorteile der Sigmoidoskopie im Gegensatz zur kompletten Koloskopie liegen in einer einfacheren und schnelleren Darmreinigung sowie einer kürzeren Untersuchungszeit. Die Untersuchung kann auch von geschultem medizinischen Personal und nicht nur von Ärzten durchgeführt werden. Des Weiteren wird keine Sedierung benötigt. Seine Spezifität ist mit 98% sehr hoch. Das KRK Screening mittels Sigmoidoskopie kann die Mortalität um 20 - 40% reduzieren (63). Die Sensitivität bewegt sich zwischen 35% und 70%, was daran liegt, dass das rechte Kolon nicht erfasst wird (28).

Die Koloskopie ist schließlich das einzige Verfahren, welches eine Untersuchung des gesamten Kolons einschließlich terminalem Ileum ermöglicht. Sie besitzt die höchste Sensitivität (95%) und Spezifität (100%) für die Erkennung eines kolorektalen Karzinoms/Adenoms und bietet deshalb als einziges Verfahren die Möglichkeit der Diagnose und endoskopischen Therapie von prä-neoplastischen Läsionen im gesamten Kolon (20).

Nur bei der kompletten Koloskopie können alle vorhandenen Dickdarmpolypen entdeckt und abgetragen werden. Im Vergleich zur zu erwartenden Karzinomprävalenz führt eine Screening-Koloskopie mit Abtragung aller gefundener Polypen zu einer Reduktion von Kolonkarzinomen um 70 - 80% (63). Als Nachteil der Koloskopie müssen die deutlich höheren Kosten (bis zu 1100 Euro) und ihre begrenzte Verfügbarkeit genannt werden (20). Auf Grund des invasiven Verfahrens wird die Untersuchung von nur 16% der Berechtigten genutzt.

Ein Kosten-Nutzen-Effekt im Vergleich zum Hämokkult kombiniert mit der flexiblen Sigmoidoskopie ist noch unklar. Seit Oktober 2002 sieht die gesetzliche Früherkennung eine Früherkennungskoloskopie ab dem 56. Lebensjahr vor, die bei unauffälligem Befund nach zehn Jahren wiederholt werden kann.

Im Rahmen der Genefec-2 Studie diente die Koloskopie als Referenztest. Aufgrund der histologischen Diagnose wurden die Patienten in die sechs verschiedenen Gruppen eingeteilt. Mit Hilfe der histologisch gesicherten KRK Fälle wurde die Sensitivität, aufgrund der Ergebnisse der restlichen Gruppen die Spezifität ermittelt.

### **3.5. Genefec-2 Stuhl Test**

Im Stuhl befinden sich abgeschilferte Epithelzellen der Darmschleimhaut. Die Quantität scheint bei tumorösen Prozessen signifikant erhöht zu sein. Mit molekularen Screening Methoden werden genetische Veränderungen in diesen Zellen aufgespürt. Im Genefec-2 Test werden K-ras (Codon 12 und 13), B-raf (Codon 600), p53 (Exon 5-Codon175; Exon 7 - Codon 245 und 248; Exon 8 Codon 273 und 278 ) und long DNA auf Mutationen untersucht. Das Verfahren ermöglicht eine Mutationsanalyse dieser Gene in nur einer Probe. Es wurde in unserer Studie getestet, inwieweit sich dieses neuartige, nicht invasive Verfahren zur Früherkennung von Darmkrebs eignet. Ein positives Testergebnis resultierte, wenn in einem dieser neun Einzel-Marker eine Mutation festgestellt wurde.

#### **3.5.1 K-ras**

Es sind drei ras-Onkogene (H,K,N) bekannt. Alle drei codieren für eine GTPase, welche für die Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung wichtig ist. Im inaktiven Zustand sind sie an GDP gebunden . Nach ihrer Aktivierung lösen sie wachstumsstimulierende Signale aus. Durch eine intrinsische GTPase wird der aktivierte Zustand wieder beendet. Durch Punktmutation im K-ras Gen ist die GAP (GTPase aktivierendes Protein) Bindungsstelle defekt. So verweilt das Protein im aktivierten Zustand, und die wachstumsstimulierenden Signale wirken kontinuierlich auf die Zelle ein. Bei kolorektalem Krebs wurden Mutationen in K- und N-ras gefunden. Die Karzinogenese des Kolons ist ein fortschreitender Prozess, ausgehend von einer Dysregulation der kryptischen Zellproliferation. Karzinogen veränderte Kryptenzellen weisen zu 40% Mutationen im ras-Onkogen auf. Die meisten befinden sich im Codon 12 und 13 des K-ras Gens. Dysplastische Polypen zeigten häufiger K-ras Mutationen als Polypen ohne Dysplasie. Die Mutationen treten bereits in frühen Stadien der Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms auf. Es ist heutzutage möglich aus Stuhlproben gewonnene DNA zu sequenzieren, und K-ras-Mutationen in der Darmschleimhaut nachzuweisen. K-ras-Mutationen treten allerdings nur in 40% aller Kolontumore auf und sind auch in nicht neoplastischem Gewebe zu finden, weshalb dieser Marker allein nicht ausreichend für ein Nachweisverfahren zur Früherkennung von Darmkrebs ist. In Genefec-2 wurden Mutationen im K-ras Gen des Kodons 12 und 13 als Marker mit anderen molekularen Markern kombiniert.

#### **3.5.2 p53**

Auf dem Chromosom 17p ist das Tumorsuppressor Gen für das „Wächter“-Protein p53

lokalisiert. In über 75% der kolorektalen Krebsdiagnosen wurde ein Verlust der Heterozygotie für dieses Gen nachgewiesen, selten jedoch bei benignen Adenomen. Die Mutationen treten meist erst in späteren Stadien der Tumorerkrankung auf. Der „Wächter“ p53 ist ein inhibierender Transkriptionsfaktor im Zellzyklus beim Übergang von der G1 zur S-Phase. Es führt zur Induktion der Apoptose, sowie der Bewahrung genomischen Stabilität durch Kontrolle der DNA-Reparatur. Dabei handelt es sich in bis zu 80% um Punktmutationen, die sich mit über 90% in den Exons 5-8 befinden, die mit der DNA Bindungsdomäne des Proteins assoziiert sind. In KRK überwiegen mit 80% G:C-A:T Transitionen. In 2/3 sind die CpG-Dinukleotid enthaltenden Kodons 175, 248 und 273 mutiert. In rund 25% aller Patienten lassen sich p53-Autoantikörper im Serum nachweisen.

Epithelzellen der Darmschleimhaut unterliegen einem kontinuierlichem Erneuerungsprozess. Gealterte Zellen werden abgestoßen, und es folgt eine Regeneration der Darmschleimhaut durch neue Zellen. Durch neoplastische Veränderungen wird das Gewebe stimuliert, immer mehr Zellen abzustoßen und mehr neue Zellen zu bilden. So wandert ein große Menge abgeschilfter Epithelzellen durch den Verdauungstrakt, welche schließlich aus dem Stuhl isoliert werden können. Das p53 Gen wurde in Genefec-2 auf Mutationen in 5 verschiedenen Kodons untersucht. (Exon 5 Codon 175; Exon 7 Codon 245 und 248; Exon 8 Codon 273 und 278)

### **3.5.3 Long DNA (L-DNA)**

L-DNA bezeichnet DNA-Fragmente von mehr als 200 Nukleotiden Länge. Sie ist charakteristisch für DNA apoptotischer Zellen, weshalb sie einen geeigneten Marker für DNA basierende Stuhltests darstellt. Eine Mutation in diesen DNA Fragmenten steht für eine nicht korrekt ablaufende Apoptose. Sie wird langsamer als normale DNA degradiert. In ihrer Form als Tumormarker werden sog. „hot spot“ Mutationen untersucht. An diesen Gen- Loci werden häufig Mutationen nachgewiesen. In einer iranischen Studie erreichte der Nachweis von mutierten long DNA-Sequenzen beim kolorektalen Karzinom eine Sensitivität von 64% (1).

### **3.5.4 B-raf**

Bei den raf-Proteinen handelt es sich um eine Familie von cytoplasmatischen Ser./Thr.Proteinkinasen, welche die Isoformen A-raf, B-raf und C-raf umfasst. Sie spielen eine wichtige Rolle im MAP-Kinase und ras-raf Signalweg (76).

Der Map-Kinase-Weg bezeichnet eine Reihe mehrstufiger Transduktionswege, die unter anderem an der Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt sind. Einer der drei möglichen Signalwege wird durch Mitogene aktiviert. Hierbei sind die raf-Proteine von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess wird ERK1/ ERK2 Kaskade genannt. (raf--> MEK1/2--> ERK1/2) Dies führt zu Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung. Bei sporadischen Fällen des kolorektalen Karzinoms treten V 600 E-Mutationen im B-raf Gen in 4-6% auf (52).

B-raf ist bei Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität wesentlich an der Tumorgenese beteiligt. Im Rahmen von Genefec-2 wurde das Gen in Codon 600 auf Mutationen untersucht.

### **3.5.5 Methodik des Genefec-2 Stuhl Tests**

Die Patienten sollten Stuhlproben sammeln und sie in die drei dafür vorgesehenen Behälter geben. In den Stuhlproben befinden sich abgeschilferte Darmepithelzellen, woraus DNA isoliert, mittels PCR amplifiziert und auf Mutationen in mehreren Exons untersucht wurde. Das Markerpanel von Genen für K-ras, p53, B-raf und long DNA wurde mittels spezifischen Primern vervielfältigt. Der Genefec-2 Test war positiv, wenn in einem dieser Marker eine Mutation nachgewiesen wurde.

#### **Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction [PCR]):**

Die PCR ermöglicht eine gezielte Vervielfältigung kurzer DNA-Abschnitte. Die notwendige Starthilfe bieten Oligonukleotidprimer, kurze, einzelsträngige DNA Moleküle, die den Enden der definierten Ziel-Sequenz der DNA-Matrize komplementär sind. Die DNA-Polymerase verlängert dann, in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturiert vorliegenden DNA-Matrize in 5´ - 3´Richtung, mit ca. 35-100 Nukleotiden pro Sekunde und synthetisiert so neue, der Matrize komplementäre, DNA-Moleküle. Zur erneuten Synthese wird die doppelsträngige DNA wiederholt durch Hitze aufgeschmolzen, durch die thermostabile Polymerase repliziert, separiert in Einzelstränge und nach Abkühlung wieder von den Primern gebunden. Unter optimalen Reaktionsbedingungen steigt damit bei jedem neuen Zyklus die Konzentration der zu vervielfältigenden Ziel-Sequenz an. Bereits ab dem dritten Zyklus entstehen Produkte der gesuchten Länge. Kurze Ziel-Sequenzen, die durch die Primer eingeschlossen sind, vermehren sich ab dem vierten Zyklus exponentiell, lange Produkte, mit einem Ende ohne Primer, werden hingegen linear vervielfältigt. Bei 100 prozentiger Ausbeute in jedem Zyklus hat sich nach 20 Zyklen die DNA 2 hoch 20-fach

vermehrt. Alle Kopien der DNA-Moleküle liegen zum Abschluss der Reaktion in Form von Doppelsträngen vor; ihre Anzahl lässt sich anhand folgender Formel bestimmen :  $(2^n - 2n)$  , wobei n die Anzahl der Vermehrungszyklen ist, 2n die Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist (49).

Besondere Möglichkeiten bietet die PCR durch hohe Spezifität und Sensitivität. Mit Einsatz geringster Mengen an Ziel-DNA aus komplexen Mischungen genomischer Sequenzen einzelner Zellen oder einzelner Kopien von Genen mit einer Größe von 50 - 10000bp ist es möglich, in praktisch unlimitierter Menge DNA-Fragmente zu amplifizieren.

### **3.6 Methodik der statistischen Auswertung**

Um die Güte der Stuhltests beurteilen zu können, wurden Sensitivität, Spezifität und die Prädiktion von FOBT, Schebo und Genefec im Vergleich zur Histologie ermittelt. Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den drei Verfahren bestehen, wurde der Test nach Mc Nemar angewandt.

#### **3.6.1 Sensitivität und Spezifität**

Sensitivität und Spezifität beschäftigen sich mit der Beziehung eines diagnostischen Tests und dem tatsächlichen Vorliegen einer Krankheit. Die Sensitivität ist definiert als der Anteil der Patienten, die krank sind, und die ein positives Testergebnis haben. In unserer Studie bezieht sich die Sensitivität der Tests auf die diagnostische Aussagekraft hinsichtlich des Vorliegens eines histologisch gesicherten Kolonkarzinoms. Die Spezifität ist definitionsgemäß der Anteil der Patienten, die eine Krankheit nicht haben, und bei denen der Test negativ ausfällt, in unserer Studie alle Patienten die endoskopisch, sowie histologisch kein Karzinom haben, und ein negatives Testergebnis erhielten. Es gibt in der Klinik oft entweder sehr sensitive oder hoch spezifische Tests, wobei zwischen beiden Parametern eine Abhängigkeit besteht. Ein Test, dessen Sensitivität hoch, Spezifität jedoch gering ist, sollte genutzt werden, wenn schwerwiegende Nachteile durch das Übersehen einer Krankheit entstehen. Hochspezifische Tests, die meist eine geringe Sensitivität vorweisen, sind wichtig, wenn falsch positive Ergebnisse den Patienten physisch, emotionell oder finanziell schaden könnten. Die entsprechend beobachteten Werte für Sensitivität und Spezifität werden typischerweise mit dem dazugehörigen Konfidenzintervall (Streubereich) angegeben. Die Breite dieses Wertebereichs definiert den Grad an Präzision der Schätzungen von Sensitivität und Spezifität (23).

#### **3.6.2 Prädiktion**

Sensitivität und Spezifität dienen der allgemeinen Beurteilung eines diagnostischen Verfahrens. In Praxis und Klinik sind aber Wahrscheinlichkeiten, einen Kranken als krank (Sensitivität) und einen Gesunden als gesund (Spezifität) zu erkennen, relativ irrelevant. Hier interessiert, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Person mit pathologischem Befund wirklich krank ist (positive Prädiktion, oder positiver Vorhersagewert) und mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Person mit unauffälligem Befund wirklich gesund ist (negative Prädiktion, oder negativer Vorhersagewert). Die Prädiktion gibt also die Zuverlässigkeit eines Befundes an. Des Weiteren ist die

positive bzw. negative Prädiktion von der Krankheitshäufigkeit, also der Prävalenz abhängig. So ist bei häufigen Krankheiten die positive Prädiktion leicht zu erreichen, bei seltenen Erkrankungen die negative. Die Prädiktion gilt also nur für eine bestimmte Krankheitshäufigkeit, Sensitivität und Spezifität sind von der Häufigkeit der Krankheit unbeeinflusst, und demnach allgemein gültig.

Abbildung 7 verdeutlicht Charakteristika und Definitionen sowohl von Sensitivität und Spezifität, als auch von positiver und negativer Prädiktion.

		Krankheit (K)	
		vorhanden	nicht vorhanden
Test (T)	positiv	richtig + (RP)	falsch + (FP)
	negativ	falsch - (FN)	richtig - (RN)

Sensitivität: $p(T+/K+) = RP/(RP+FN)$  Spezifität: $p(T-/K-) = RN/(RN+FP)$  Positive Prädiktion: $p(K+/T+) = RP/(FP+RP)$  Negative Prädiktion: $p(K-/T-) = RN/(RN+FN)$  (p= Wahrscheinlichkeit)
---

Abb. 7: Charakteristika und Definitionen eines diagnostischen Tests

### 3.6.3 Vorzeichentest nach Mc Nemar

Der McNemar-Test gehört zu den binominalen Testverfahren. Er kann angewendet werden, wenn eine Vierfeldertafel, wie in Abbildung 8 zu sehen ist, vorliegt und wenn untersucht werden soll, ob sich bestimmte Merkmalskombinationen in bedeutsamer Weiser verändert haben.

Gegeben sind zwei Alternativmerkmale, die jeweils zwei Variationen aufweisen, (Dichotome Variablen). Es werden nun die Anzahl der Wechsler betrachtet, d.h. der Elemente, die in der zweiten Stichprobe eine andere Merkmalsausprägung angenommen haben. Man prüft, ob sich der Anteilswert von den Wechslern (siehe Beispiel unten) signifikant von 0,5 unterscheidet. 0,5 ist deshalb der Entscheidungswert, weil es sich um eine dichotome Variable handelt, deren Erfolgswahrscheinlichkeit 0,5 beträgt. In unserer Studie wurde untersucht, ob zwischen zwei diagnostischen Tests hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Ergebnisse eine deutliche Abweichung besteht, ob sie sich somit signifikant voneinander unterscheiden.

		Test A	
		positiv	negativ
Test B	positiv	a	<b>b</b>
	negativ	<b>c</b>	d

Abb. 8: Vierfeldertafel

In den vier Feldern stehen die Anzahl der Patienten, die in beiden Tests positiv (a) oder negativ (d) waren, sowie die Anzahl der Patienten, die nur in Test A (c) oder Test B (b) positiv waren. Letztendlich wurde in unserer Studie untersucht, ob sich die Tests hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Ergebnisse (b und c) signifikant unterscheiden.

## 4 Ergebnisse

Es wurden insgesamt 734 Patienten in die Studie eingeschlossen und aufgeklärt, wovon 667 Patienten koloskopiert wurden. Insgesamt wurden 108 Patienten von der Auswertung ausgeschlossen. Die hauptsächlichen Ursachen eines Ausschlusses waren eine unkomplette Koloskopie (n=32), Gruppeneinteilung unmöglich (n=7) und fehlende Stuhlproben (n=69). Die verbleibenden 626 Patienten bilden das „full analysis set“ (FAS). Diese wurden aufgrund der Koloskopie und der daraus folgenden histologischen Klassifizierung einer der sechs Gruppen zugeteilt.

<b>Gruppen:</b>	<b>FAS (N)</b>
1: Kontrollgruppe	282
2: RDS	28
3: CIBD	23
4: Hyp. Polypen	92
5: Adenome	147
6: CRC	54

**Tab. 7:** Stuhl Test spezifisches Patientengut

<b>Test</b>	<b>FAS</b>
FOBT	N=616
Schebo	N=569
Genefec-2	N=619

Bei insgesamt 562 Patienten konnten alle drei Stuhltests ausgewertet werden. Abbildung 9 zeigt die Gruppenspezifische Aufteilung der eingeschlossenen Patienten, für die alle drei Stuhltests ausgewertet werden konnten.

### Gruppenspezifische Patientenverteilung

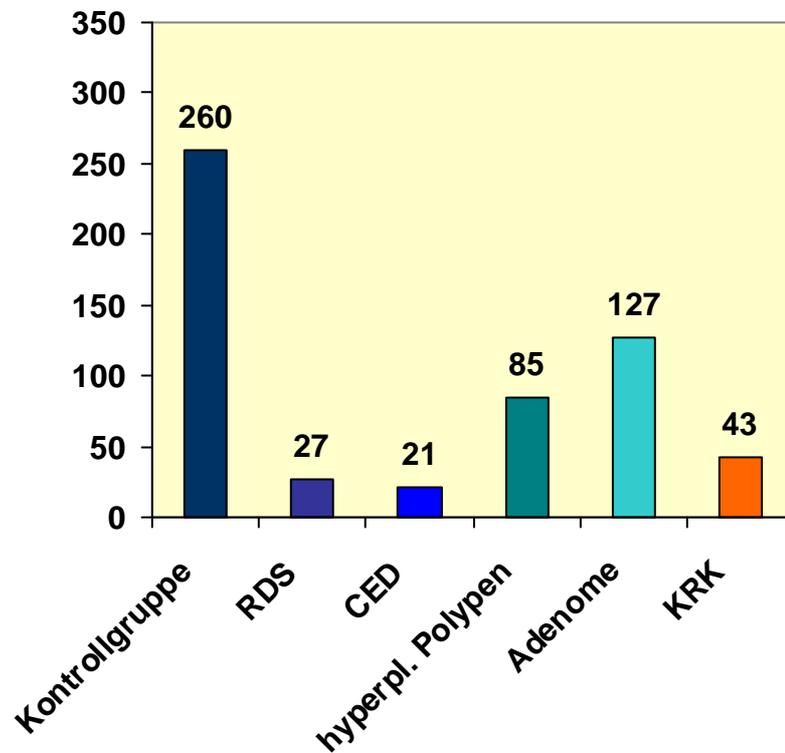


Abb. 9: Gruppenverteilung der Patienten mit drei Stuhltests

#### 4.1 Auswertung des Fragebogens

Die Patienten wurden hinsichtlich klinischer und demographischer Gesichtspunkte charakterisiert. In einem Fragebogen sollten die Patienten Auskunft geben über:

- ethnische Gruppenzugehörigkeit
- Gewicht
- Nikotinabusus
- Geschlecht
- Alter
- Ernährungsgewohnheiten
- Stuhlkonsistenz

Die Unterschiede in diesen Punkten stellten sich als nicht signifikant heraus. Einige Ergebnisse schienen dennoch interessant.

So nahmen an der Studie ausschließlich Patienten der kaukasischen Bevölkerungsgruppe teil. Zudem war auffällig, dass die Gruppe der gesicherten

Kolonkarzinome im Durchschnitt den höchsten BMI Wert hatte, was Tabelle 7 verdeutlicht.

**Tab. 8:** Vergleich der einzelnen Gruppen bezüglich des BMI Wertes

<b>Gruppe</b>	Gewicht (Kg) (Mittelwert)	Größe (m) (Mittelwert)	BMI (Kg /m <sup>2</sup> )
1	77	1,68	27
2	72	1,66	26
3	73	1,67	26
4	78	1,70	27
5	78	1,69	27
6	81	1,70	28

Im Hinblick auf den Nikotinabusus konnte kein Zusammenhang zwischen Rauchen und dem Auftreten eines Kolonkarzinom hergestellt werden. Nur sechs Prozent der betroffenen Patienten gaben an, zu rauchen. In den anderen Gruppen war der prozentuale Anteil an Rauchern höher.

#### **4.1.1 Geschlecht**

Die Verteilung des Geschlechts innerhalb der einzelnen Gruppen ist in Abbildung 10 dargestellt. Männer waren in der Adenom und Karzinom Gruppe häufiger betroffen als Frauen. In allen anderen Gruppen waren Frauen häufiger betroffen.

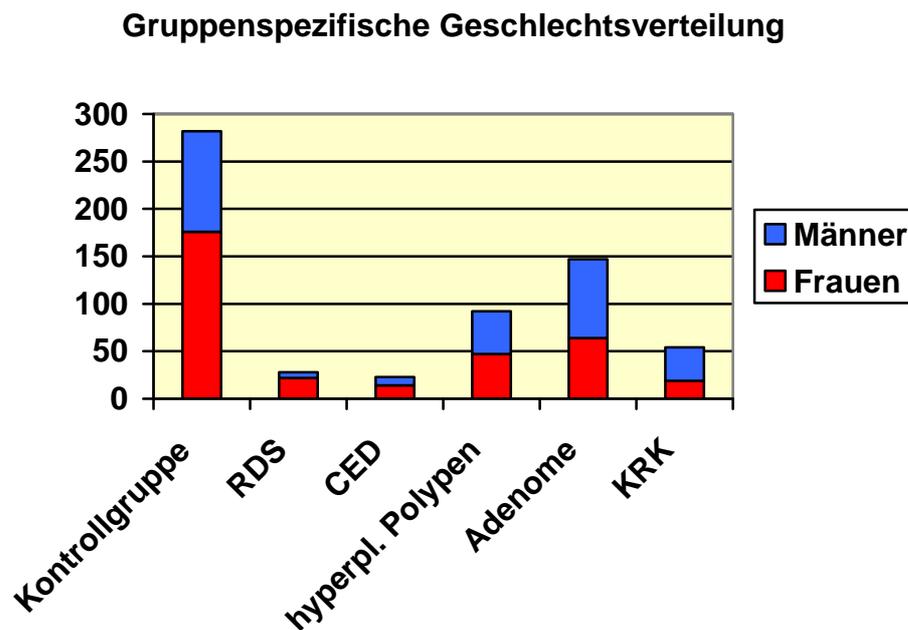


Abb. 10: Gruppenspezifische Geschlechtsverteilung

#### 4.1.2 Alter

Das Lebensalter der Patienten sollte zwischen 40 und 80 Jahren liegen. Das korrekte Einhalten der Altersgrenze bereitete einige Schwierigkeiten. Vor allem Patienten mit CED sind häufig jünger als 40 Jahre. So wurden vor allem in dieser Gruppe auch Patienten jüngeren Alters eingeschlossen. Des Weiteren war es schwierig für die Karzinom Gruppe eine ausreichende Anzahl von Patienten zu finden, weswegen auch hier die Altersgrenze teilweise überschritten wurde. In den restlichen Gruppen wurden leichte Abweichungen toleriert. so war der jüngste Proband 21 Jahre, der älteste 85 Jahre alt.

#### 4.1.3 Ernährungsgewohnheiten

Die Patienten wurden hinsichtlich ihres Fleischkonsums, sowie nach ballaststoffreicher Ernährung befragt. Es war auffallend, dass unter den Befragten keine Patienten waren, die sich vegetarisch ernähren. Auch hinsichtlich dieses Punktes gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Patienten konnten bei den Antworten zwischen normal, wenig oder viel Fleischkonsum, bzw. faserreicher Kost unterscheiden. Die Fragestellung war jedoch zu wenig detailliert, um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines KRK und den Ernährungsgewohnheiten, welche in Tabelle 8 und 9 gezeigt werden, der Probanden diskutieren zu können.

**Tab. 9:** Selbsteinschätzung der Patienten bezüglich ihres Fleischkonsums

Fleischkonsum	Gruppe 1 (n=228)	Gruppe 2 (n=28)	Gruppe 3 (n=23)	Gruppe 4 (n=147)	Gruppe 5 (n=92)	Gruppe 6 (n=54)
normal	218	24	19	111	67	43
wenig	62	4	2	35	25	10
Vegetarier	0	0	0	0	0	0
fehlende Angabe	2	0	2	1	0	1

**Tab. 10:** Selbsteinschätzung der Patienten bezüglich ihrer ballaststoffreichen Ernährung

ballaststoffreiche Kost	Gruppe 1 (n=228)	Gruppe 2 (n=28)	Gruppe 3 (n=23)	Gruppe 4 (n=147)	Gruppe 5 (n=92)	Gruppe 6 (n=54)
normal	195	21	16	98	64	36
wenig	21	0	3	11	6	12
viel	63	7	2	37	22	5
fehlende Angabe	3	0	2	1	0	1

## 4.2 Statistische Auswertung der Stuhltests

### 4.2.1 Ergebnisse des FOBT

Die Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität sind in Tabelle 5 dargestellt. Von den insgesamt 626 eingeschlossenen Patienten lagen uns in 616 Fällen auswertbare Tests vor.

Der FOBT war bei 34 von 51 gesicherten KRK positiv, was einer Sensitivität von 66,7% entspricht. Die Gesamtspezifität war mit 95% sehr hoch. Die Spezifität für die einzelnen Vergleichsgruppen ist in Tabelle 10 dargestellt. Auffällig war, dass die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die geringste Spezifität aufwies. Des Weiteren hatten in dieser Gruppe 18% ein falsch positives Ergebnis, was daraus resultiert, dass es im Verlauf v.a. der Colitis ulcerosa vermehrt zu anorektalen Blutungen kommt. Insgesamt waren 27 Probanden falsch positiv. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über die falsch positiven Ergebnisse in den einzelnen Gruppen. Der positiv prädiktive Wert war mit 0,56 gering und damit nicht sehr aussagekräftig, der negativ prädiktive Wert war jedoch mit 0,97 sehr hoch.

**Tab. 11:** Spezifität FOBT

Gruppe	N =616	Spezifität	90% KI
Kontrollgruppe	278	96%	(0,935; 0,978)
RDS	28	92,9%	(0,792; 0,987)
CED	22	81,8%	(0,631; 0,935)
Hyperplastische Polypen	92	94,6%	(0,889; 0,978)
Adenome	145	94,5%	(0,903; 0,972)

**Sensitivität der Karzinomgruppe: 66,7%**  
(Sensitivität der Adenomgruppe: 5%)

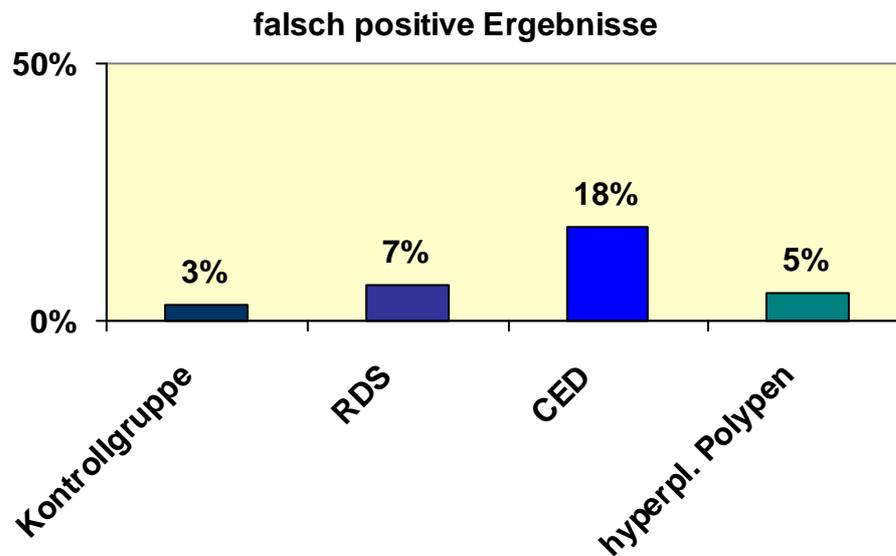


Abb. 11: Gruppenspezifischer prozentualer Anteil der falsch positiven Ergebnisse

Der Test war in unserer Studie hochspezifisch und hatte mit Ausnahme der CED Gruppe die wenigsten falsch positiven Ergebnisse, seine Sensitivität war jedoch gering.

#### 4.2.2 Ergebnisse des Tumor M2-PK Tests

Bei einem FAS von 626 Probanden stand in 569 Fällen ein auszuwertender Test zur Verfügung. Von insgesamt 51 histologisch gesicherten KRK Fällen konnte er für 45 Probanden ausgewertet werden, wovon 35 betroffene Patienten ein positives Ergebnis hatten. Der Tumor M2-PK Test erreichte eine Sensitivität von 77,8%, Die Spezifität war in allen Vergleichsgruppen gering was zu einer mittleren Gesamtspezifität von 50,34% führte. In der Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen betrug sie nur 14,3%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Rate der falsch positiven Ergebnisse war in allen Gruppen relativ hoch und ist in Abbildung 12 dargestellt. In der Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hatten 85,7% ein falsch positives Ergebnis.

**Tab. 12:** Spezifität Tumor M2-PK Test

Gruppe	N = 569	Schebo	Spezifität	90% KI
Kontrollgruppe	263	Spezifität	60,5%	(0,552; 0.655)
RDS	27	Spezifität	63%	(0,453; 0.783)
CED	21	Spezifität	14,3%	(0,040; 0.329)
Hyperplastische Polypen	85	Spezifität	57,6%	(0,481; 0.667)
Adenome	128	Spezifität	56,3%	(0,486; 0.637)

**Sensitivität der Karzinomgruppe: 77,8%**  
 (Sensitivität der Adenom Gruppe: 43,8%)

### Falsch positive Ergebnisse

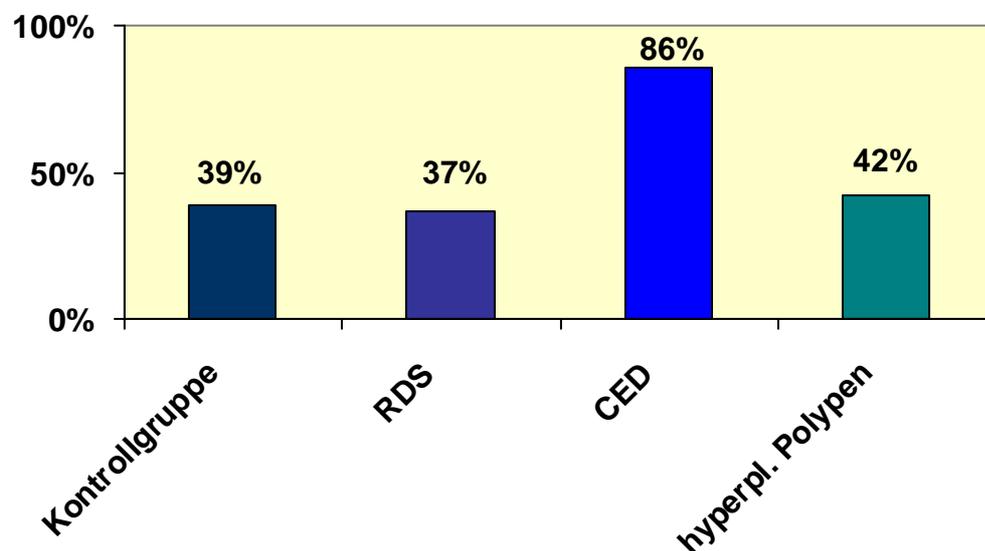


Abb. 12: Gruppenspezifischer prozentualer Anteil der falsch positiven Ergebnisse

### 4.2.3 Ergebnisse von Genefec-2

Die primäre Zielstellung der Studie war die Evaluierung der Spezifität und Sensitivität in allen sechs Gruppen.

Ein positives Testergebnis resultierte, wenn bei einem der neun Einzel Marker eine Mutation festgestellt wurde. Wenn die Untersuchung aller neun Marker fehlgeschlagen war, galt der Test als misslungen. Wurde in keinem der neun Einzel Marker eine Mutation entdeckt, bedeutete dies ein negatives Ergebnis.

Die Sensitivität des Genefec-2 Tests wurde anhand der positiven Testergebnisse der histologisch gesicherten KRK-Fälle bewertet. Die Spezifität wurde einzeln für die restlichen Gruppen ermittelt.

Genefec-2 entdeckte 28 von 54 KRK, was einer Sensitivität von 51,9% entspricht.

Für die einzelnen Marker ergaben sich variable Sensitivitäten:

K-ras:	25,9%	B-raf:	5,6%
p53:	16,7%	long DNA:	24,1%

In Tabelle 13 sind die einzelnen Spezifitäten der Vergleichsgruppen dargestellt.

**Tab. 13:** Spezifität Genefec-2

Gruppe	N	Genefec-2	Spezifität	90% KI
Kontrollgruppe	279	Spezifität	0,889	(0,853; 0,918)
RDS	28	Spezifität	0,857	(0,702; 0,950)
CED	23	Spezifität	0,870	(0,696; 0,963)
Hyperplastische Polypen	89	Spezifität	0,820	(0,740; 0,884)
Adenome	146	Spezifität	0,877	(0,823; 0,919)

**Sensitivität der Karzinom Gruppe: 51,9%.**

(Sensitivität der Adenom Gruppe: 12%)

In den Vergleichsgruppen bewegte sich die Prozentualität der falsch positiven Ergebnisse zwischen 10,4% und 16,9% und liegt damit zwischen FOBT und ScheBo Test. Bei insgesamt 58 falsch positiven und 28 richtig positiv getesteten Probanden,

wies Genefec-2 mit 0,6 den höchsten positiv prädiktiven Wert. Es hatten insgesamt 497 Patienten ein richtig negatives Ergebnis, und 26 Patienten waren falsch negativ. Der negativ prädiktive Wert war demnach mit 0,95 wie bei den anderen beiden Stuhltests sehr hoch.

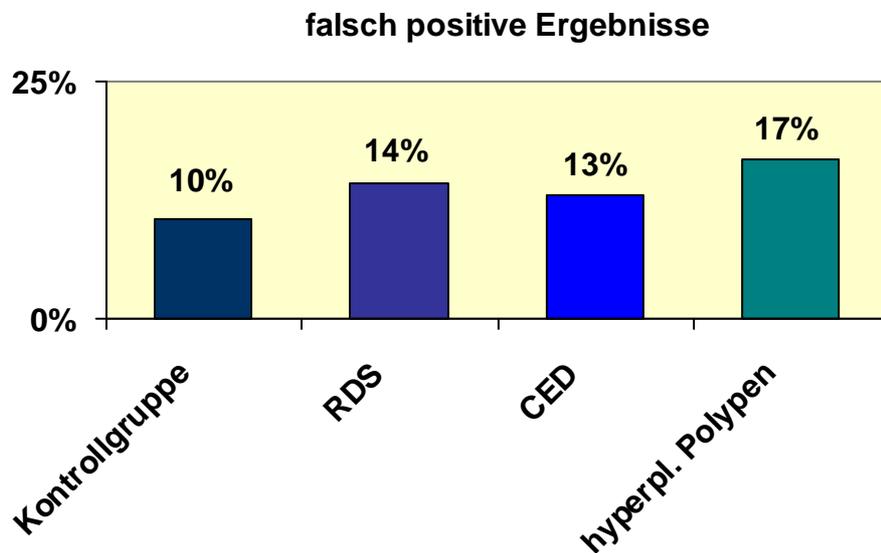


Abb. 13: Gruppenspezifischer prozentualer Anteil der falsch positiven Ergebnisse

### 4.3 Vergleich der einzelnen Tests

Die drei verschiedenen Tests lieferten teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. Vor allem bezüglich der falsch positiven Ergebnisse war der Tumor M2-PK Test den anderen beiden deutlich unterlegen, was in Abbildung 14 veranschaulicht wird.

## falsch positive Ergebnisse im Vergleich

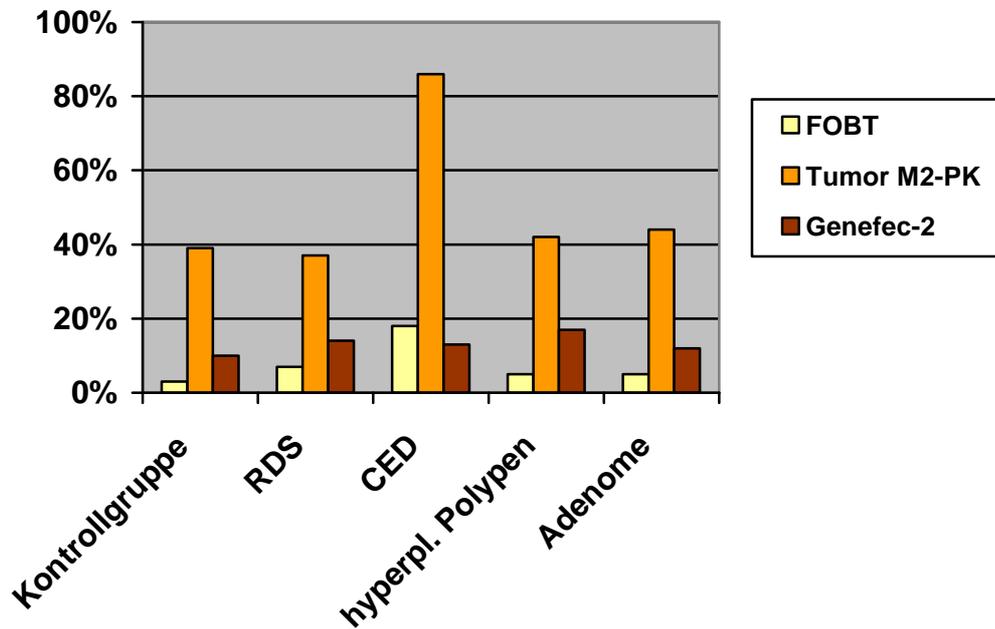


Abb. 14: Vergleich der falsch positiven Ergebnisse

Abbildung 15 beschäftigt sich mit Sensitivität und Spezifität der einzelnen Tests. Hier wird eindeutig gezeigt, dass der Tumor M2-PK Test die höchste Sensitivität erreichte, bezüglich der Spezifität jedoch sehr viel schwächere Ergebnisse lieferte als der FOBT und Genefec.

Um festzustellen, ob die Unterschiede zwischen den drei Tests signifikant waren, wurden sie mit dem Vorzeichentest nach Mc Nemar miteinander verglichen.

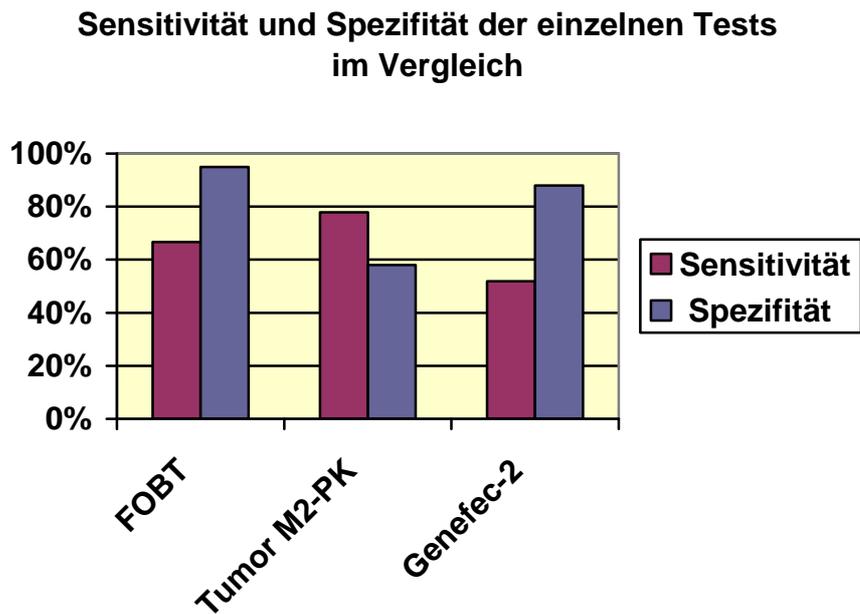


Abb. 15: Vergleich von Sensitivität und Spezifität

#### 4.3.1 Vergleich von Genefec-2 und FOBT

Von 51 KRK entdeckte Genefec 7 Fälle (14%), die der FOBT nicht erfasste. Der FOBT wiederum war in 15% der KRK Fälle positiv, die mittels Genefec-2 nicht erkannt wurden (Tab.14). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die beiden Methoden unterschiedliche Fälle von KRK entdecken. Zwischen Genefec und FOBT bestand hinsichtlich der Sensitivität kein signifikanter Unterschied.

Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Spezifität der Kontrollgruppe und der Gruppe der hyperplastischen Polypen. Genefec-2 lieferte in beiden Gruppen deutlich mehr falsch positive Ergebnisse.

**Tab. 14:** Vergleich von Genefec-2 und FOBT nach Mc Nemar

Gruppe	N	Genefec-2 +	FOBT +	Mc Nemar	P- Wert
Kontrollgruppe	275	28	8	11.1	<.001
RDS	28	3	1	1.0	0.317
CED	22	1	2	0.3	0.564
Hyperplastische Polypen	89	15	4	6.4	0.012
Adenome	144	17	7	4.2	0.041
<b>KRK</b>	<b>51</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>2.9</b>	<b>0.088</b>

Die folgende Kreuztabelle (Tab.15) bezieht sich auf die richtig positiv getesteten in der KRK Gruppe.

**Tab. 15:** Kreuztabelle bezogen auf die KRK Gruppe

		FOBT	
		Positiv	Negative
Genefec-2	Positiv	19 (37%)	<b>7 (14%)</b>
	Negative	<b>15 (29%)</b>	10 (20%)

### 4.3.2 Vergleich von Genefec-2 und Tumor M2-PK Test

Von 45 KRK-Fällen, für die der Tumor M2-PK Test ausgewertet werden konnte, wurden sechs durch Genefec-2 entdeckt, welche die Tumor M2-PK nicht als solche identifizierte. Allerdings konnten der Tumor M2-PK Test 15 KRK finden, die mit Genefec-2 nicht erkannt wurden. Der Unterschied war sowohl hinsichtlich Sensitivität, als auch Spezifität in allen Gruppen signifikant. Der Tumor M2-PK Test erreichte eine deutlich höhere Sensitivität, Genefec-2 war jedoch sehr viel spezifischer, was Tabelle 16 zu entnehmen ist.

**Tab. 16:** Vergleich von Genefec-2 mit Tumor M2-PK nach MC Nemar

Gruppe	N	Genefec-2 +	Tumor M2 PK +	Mc Nemar	P- Wert
Kontrollgruppe	260	17	88	48,0	<.001
Irritables Kolon	27	2	8	3.6	0.058
CIBD	21	0	15	15.0	<.001
Hyperplastische Polypen	85	8	31	13.6	<.001
Adenome	127	7	49	31.5	<.001
<b>KRK</b>	<b>43</b>	<b>6</b>	<b>15</b>	<b>3,9</b>	<b>0.050</b>

In Tabelle 17 ist eine Kreuztabelle dargestellt, die sich auf die KRK Gruppe bezieht.

**Tab. 17:** Kreuztabelle bezogen auf die KRK Gruppe

		Tumor-M2-PK	
		positiv	negativ
Genefec-2	positiv	18 (42%)	3 (7%)
	negativ	15 (35%)	4 (9%)

### 4.3.3 Vergleich von FOBT und Tumor M2-PK Test

Von 43 KRK Fällen konnte der Tumor M2-PK Test 11 Fälle ermitteln, die im FOBT negativ waren. Der FOBT war in fünf Fällen positiv, die mittels Tumor M2-PK Test nicht entdeckt wurden. Der FOBT war in drei Fällen falsch positiv, bei welchen der Tumor M2-PK Test ein negatives Ergebnis lieferte.

Der Vergleich beider Tests zeigte einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der positiven Ergebnisse sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Risikogruppen.

Aus der Tabelle 18 ist zu entnehmen, dass der Unterschied bezüglich der Sensitivität nicht signifikant war.

**Tab. 18:** Vergleich von FOBT und Tumor M2-PK Test nach Mc Nemar

Gruppe	N	Tumor M2 PK +	FOBT +	Mc Nemar	p- Wert
Kontrollgruppe	260	94	3	85,4	<,001
RDS	27	8	0	8,0	0,005
CED	21	14	0	14,0	<,001
Hyperplastische Polypen	85	36	4	25,6	<,001
Adenome	127	53	2	47,3	<.001
<b>KRK</b>	<b>43</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>	<b>0,134</b>

## 4.4 Kombination von Genefec-2 und FOBT

Aufgrund des sehr schwachen Resultates des Schebo Tests hinsichtlich falsch positiver Ergebnisse, und daraus resultierender niedriger Spezifität, wurde entschieden, dass eine kombinierte Auswertung nur für FOBT und Genefec durchgeführt werden sollte. Durch Kombination der beiden Stuhltests konnte die Sensitivität auf 80,4% gesteigert werden. Von den 51 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden 41 entdeckt. Diese Steigerung zeigt, dass die beiden Tests verschiedene Fälle von Dickdarmkrebs aufspüren. Die Gesamtspezifität war 83%, in den einzelnen Vergleichsgruppen bewegte sie sich zwischen 77,3% und 86,5%. Sensitivität und Spezifität sind der Tabelle 19 zu sehen.

**Tab. 19:** Spezifität Genefec-2 kombiniert mit FOBT

Gruppe	N	Genefec-2/ FOBT	Spezifität	90% KI
Kontrollgruppe	275	Spezifität	86,5%	(0,827; 0,898)
RDS	28	Spezifität	82,1%	(0,661; 0,927)
CED	22	Spezifität	77,3%	(0,580; 0,906)
Hyperplastische Polypen	89	Spezifität	78,7%	(0,703; 0,855)
Adenome	144	Spezifität	83,3%	(0,774; 0,882)

**Sensitivität der Karzinom Gruppe: 80,4%**  
(Sensitivität der Adenom Gruppe: 17%)

90 Patienten waren entweder im FOBT oder Genefec-2 falsch positiv. Die Gruppenspezifische Verteilung ist in Abbildung 16 dargestellt. Bei 41 richtig positiv getesteten Probanden ergab sich ein ppW von 0,31. Insgesamt wurden 468 Patienten richtig negativ, und nur zehn Patienten falsch negativ getestet. Daraus ergab sich ein sehr hoher negativ prädiktiver Wert mit 0,97.

#### falsch positive Ergebnisse

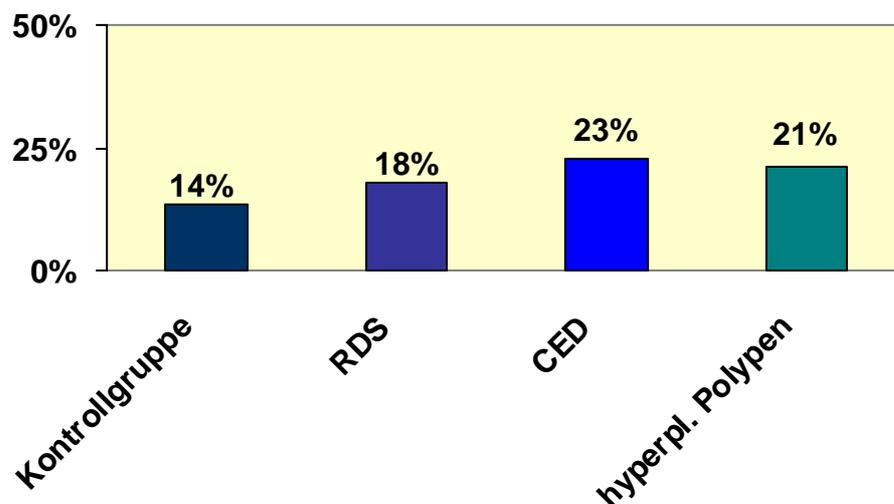


Abb. 16: Gruppenspezifisch prozentualer Anteil der falsch positiven Ergebnisse

## 5 Diskussion

In der Arbeit wurde die Sensitivität und Spezifität der molekularen Stuhltests untersucht. Eine Aussage über die Sensitivität konnte durch die Untersuchung von Patienten mit bereits gesichertem kolorektalem Karzinom getroffen werden. Hierbei ergab sich jedoch ein organisatorisches Problem. Bei dem Anteil der Patienten, die aufgrund bestimmter Symptomatik eine Koloskopie durchführen ließen, und bei dieser Untersuchung, ein Karzinom diagnostiziert wurde, musste meist schnell operiert werden. Für die Durchführung der Stuhltests blieb dann keine Zeit mehr, da nach der Koloskopie mindestens eine Woche vergehen musste, bevor die Stuhltests durchgeführt werden konnten. Inwieweit sich molekulare Stuhltests zum Screening der asymptomatischen Bevölkerung eignen, muss in weiteren, repräsentativen klinischen Studien getestet werden.

Für die Beurteilung einer Screeningmethode ist nicht nur Sensitivität und Spezifität, sondern auch die Senkung der Mortalität, sowie die Kosteneffektivität von entscheidender Bedeutung. Zur Kosteneffektivität verschiedener KRK-Screeningmethoden gibt es für Deutschland keine Zahlen.

In den USA beispielsweise werden die Folgekosten des kolorektalen Karzinoms mit bis zu 6,5 Milliarden Dollar pro Jahr angegeben (67, 68). Ein statistisches Modell des National Cancer Institut konnte zeigen, dass die Screeningmethoden beim kolorektalen Karzinom pro Jahr 15.000–25.000 US-\$ an Kosten pro vermiedenem Tod an einem Kolonkarzinom verursachen. Medizinische Interventionen und Vorsorgemaßnahmen gelten in den USA als kosteneffektiv, wenn sie die Grenze von 40.000 US\$ pro vermiedenem Tod nicht überschreiten (69).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Durchführbarkeit der Screeningmethode. Stuhltests gelten als einfach durchzuführende Tests. Allerdings stellt auch diese Methode vor allem ältere Patienten vor Schwierigkeiten, zum Beispiel bei der Entnahme der Stuhlproben aus der Toilette.

### 5.1 FOBT

In amerikanischen Studien konnte eine Kosteneffektivität für ein Screening mittels FOBT gezeigt werden (68,24). In Deutschland gibt es keine adäquaten Daten über eine Kosteneffektivität weder über den FOBT, noch über andere Screeningmethoden. Bis September 2002 war ein jährlicher FOBT für Patienten ab 45 Jahren Teil der

gesetzlichen Früherkennungsmaßnahmen. Die Beteiligung war sehr niedrig (34% der berechtigten Frauen; 14% der Männer). Seit Oktober 2002 wird der FOBT einmal jährlich ab einem Alter von 50 Jahren empfohlen. Hinsichtlich der Prävalenz erscheint dies sinnvoll. Nur 6% der Kolonkarzinome und 9% der Rektumkarzinome treten vor dem 50 Lebensjahr auf (69). Ein großer Teil davon fällt auf hereditäre Karzinome, für die spezielle Überwachungsempfehlungen gelten (61). Durch den späteren Beginn der Screeninguntersuchungen entfallen über 2,6 Mio. Untersuchungen mit den hiermit verbundenen Kosten (51).

Zur Untersuchung der Effektivität des FOBT gibt es, neben einer Vielzahl kleinerer Studien, vier große prospektive randomisierte Studien in den USA, Großbritannien, Dänemark und Schweden, die den Einfluss auf Detektion und Mortalität kolorektaler Karzinome (KRK) bei >300.000 Menschen untersucht haben (45, 27, 32, 36). In der Minnesota Studie (USA) konnte nach dreizehn Jahren eine Reduktion der Mortalität bei jährlicher Testung von 33% beobachtet werden. In einer Metaanalyse dieser Daten wird gezeigt, dass die Mortalität des kolorektalen Karzinoms durch die Anwendung des FOBT bei Personen zwischen dem 45. und 80. Lebensjahr um >25% gesenkt werden kann (72). Erklärt wird die Senkung der Sterblichkeit v.a. durch eine Verschiebung der Karzinomdiagnose zu einem früheren prognosegünstigeren Stadium. Seine Sensitivität variiert in unterschiedlichen Studien und ist vom Patientengut abhängig. So erreicht sie in Studien mit bekannten KRK Patienten bis zu 90% (70), in anderen Studien mit einer Screening Population jedoch nur 50% für Karzinome, 12% für alle Adenome und 22% für Risikoadenome (tubuläre Adenome >1 cm, villöse Anteile oder hochgradige Dysplasie) (42).

Der FOBT ist die am meisten untersuchte Screeningmethode für das kolorektale Karzinom. Er ist leicht durchzuführen, bewirkt keine weiteren Komplikationen oder Einschränkungen und ist nicht invasiv, was für die Patientencompliance wichtige Vorteile darstellen. Sensitivität und Spezifität des FOBT jedoch sind nicht hoch.

Im Rahmen der Genefec-2 Studie konnte der FOBT Test eine Sensitivität von 66,7 % aufweisen. In den Gruppen mit erhöhtem Risiko für KRK und der Kontrollgruppe bewegten sich die falsch positiven Ergebnisse zwischen 3,2% und 7,1 %. Nur in der Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen waren 18,2% falsch positiv. Die Spezifität für die Kontrollgruppe war mit 96,0% sehr hoch. Der Test wurde ausgewertet, und mit den Genefec-2 Ergebnissen sowie mit den Resultaten des Tumor M2-PK Tests verglichen. Des Weiteren wurde der FOBT in Kombination mit Genefec-2 ausgewertet, was zu einer deutlichen Zunahme der Sensitivität auf 80,4% führte. Da der Test nur 5% aller Adenom Patienten erkannte, ist er nur als Methode zur

Früherkennung des Darmkrebses geeignet, als Vorsorgeuntersuchung eignet er sich jedoch nicht.

Eine neue Alternative bietet der immunologische FOBT (iFOBT), der das menschliche Hämoglobin im Stuhl erkennt, dessen steigender Gehalt mit der Malignität der Schleimhautveränderung korreliert. In einer Studie von Ciatto et al. Erreichte der Test einen PPW von 41,5% für die Anwesenheit eines KRK oder eines Adenoms. Da der Test Adenome detektiert (13), diskutierten die Autoren darüber, ob sich dieser Test in der Zukunft nicht nur als eine Früherkennungsmethode des Darmkrebses, sondern als Vorsorgeuntersuchung eignet, die bereits Vorstufen des malignen Tumors erkennt. Ein weiterer Vorteil des iFOBT ist, dass die Einnahme von NSAR's, sowie die Einnahme von Antikoagulantien nicht unterbrochen werden muss (39).

## 5.2 Tumor M2-PK Test

Die Tumor M2 Pyruvatkinase ist ein Schlüsselenzym der Glycolyse. Seine Bestimmung ermöglicht einen Einblick in die metabolische Situation des Tumors. Sie wurde anfangs aus dem Serum oder Plasma von Patienten gewonnen, doch ein neuartiges ELISA Verfahren der Firma ScheBo Biotech AG ermöglicht die Bestimmung aus Stuhlproben. Tumor M2-PK lässt sich aus Stuhlproben reproduzierbar quantifizieren.

In verschiedenen Studien wurde der Stuhltest hinsichtlich Spezifität und Sensitivität untersucht. Die Sensitivität schwankte in Abhängigkeit des Krebsstadiums zwischen 60% im T1-Stadium und 100% im T4-Stadium (71). In einer irischen Studie erreichte der Tumor M2-PK Test für Karzinome eine Sensitivität von 97% mit einer Spezifität von 98%. Für Adenome war die Sensitivität 76% bei einer Spezifität von 98% (44).

Tabelle 20 zeigt einen Vergleich von Tumor M2-PK und FOBT hinsichtlich der Sensitivität für das KRK, sowie für große und kleine Polypen.

**Tab. 20:** Sensitivität von Tumor-M2-PK und FOBT im Vergleich (modifiziert nach 35)

<b>Sensitivität</b>	<b>Tumor M2-PK</b>	<b>FOBT</b>
KRK	92,35%	19,2%
Grosse Polypen	60%	10%
Kleine Polypen	25%	0%

In unserer Studie konnte der Test zwar die höchste Sensitivität erreichen, war jedoch hinsichtlich Spezifität und falsch positiver Ergebnisse den anderen beiden Tests deutlich unterlegen. Sein positiv prädiktiver Wert betrug 0,14 und war mit Abstand von den drei Stuhltests am geringsten. Sein negativ prädiktiver Wert korrelierte mit den anderen beiden Tests mit 0,97.

Im Rahmen der Genefec-2 Studie wurden der Tumor M2-PK Test und FOBT mittels Mc- Nemar Test verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Sensitivität der beiden Tests festgestellt werden. Im Vergleich der falsch positiven Ergebnisse war der Unterschied jedoch sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Risikogruppen signifikant. Der Tumor M2-PK Test war insgesamt in 222 Fällen falsch positiv. Er entdeckte 11 KRK, die im FOBT negativ waren. In der Einzelauswertung erreichte der Tumor M2-PK Test die höchste Sensitivität mit 77,8%. Allerdings hatte er die meisten falsch positiven Werte und auch hinsichtlich der Spezifität (60,5%) war er den anderen beiden Stuhltests deutlich unterlegen. Von 626 eingeschlossenen Patienten fehlten von 67 Patienten die Proben für den Tumor M2-PK Test. Bei weiteren fünf war eine Analyse unmöglich. Der Test erreichte zwar eine relativ hohe Sensitivität, sein ppW jedoch war auf Grund der vielen falsch positiven Ergebnisse sehr gering. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein positiv getesteter Patient wirklich Darmkrebs hat, beträgt nur 14%. Der Tumor M2-PK Test war bei 44% der Adenom Patienten positiv. Dies bietet interessante Möglichkeiten in seiner Funktion als Vorsorgeuntersuchung. Der Test wird derzeit nicht von der gesetzlichen Krankenkasse übernommen, sie kann jedoch im Rahmen einer gewünschten individuellen Gesundheitsleistung erfolgen. Die Kosten liegen bei ca. 30 Euro.

Der Stuhltest für die Tumor M2-Pyruvatkinase wird weder von den Leitlinien, noch von der deutschen Fachgesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten als Screeningmethode für das KRK empfohlen. Es gibt noch keine Daten über den Einfluss auf Mortalität oder Kosteneffektivität des Tests. Diese Faktoren und seine Fähigkeit als Vorsorgeuntersuchung müssen mittels geeigneter Studien weiter untersucht werden. Eine kombinierte Auswertung mit dem Genefec Test war auf Grund seiner geringen Spezifität nicht sinnvoll.

### **5.3 Genefec-2**

Das KRK ist molekular eines der am besten charakterisierten Karzinome. Durch Abschilferung veränderter Zellen ist es möglich, genetische Alterationen im Stuhl frühzeitig nachzuweisen. Die wissenschaftliche Grundlage für das Konzept genetischer

Stuhltests war die Aufdeckung der molekularen Veränderungen entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Karzinome Ende der 1980er Jahre. DNA wird hierzu aus dem Stuhl isoliert, und gezielt auf genetische Alterationen untersucht. Nach Amplifikation mittels PCR werden schließlich Mutationen nachgewiesen. Es existieren derzeit mehrere Publikationen, die sich mit dem Auftreten genetischer Mutationen beim KRK und ihrer Eigenschaft als Tumormarker in Form von Stuhltests beschäftigen. Es stellte sich heraus, dass die Sensitivität solcher molekularen Stuhltests durch Kombination verschiedener Markerpanels erhöht werden konnte (3). Bis zu 90% aller KRK weisen Mutationen des Tumorsuppressorgens APC (33), 40–50% Mutationen des Onkogens K-ras (12) und 50–60% Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens (10) auf. Das Kombinationspanel von K-ras, p53 und long DNA erreichte eine Sensitivität von 59%. K-ras, p53, und APC erreichten zusammen eine Spezifität von 97% (5).

Die einzelnen Marker treten zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt der Karzinogenese auf. Die in Genefec-2 gewählte Kombination der Marker vermag verschiedene Wege der Krebsentstehung abzudecken. K-ras und B-raf diagnostizieren den MAP-Kinase Weg. Durch die Kombination mit p53 sind verschiedene Stadien der Karzinogenese abgedeckt. So eignet sich K-ras vor allem für die Entdeckung früherer Läsionen, p53 tritt im Allgemeinen erst in weiter fortgeschrittenen Stadien auf. Mit der Analyse von long DNA können schließlich weitere neoplastische Veränderungen erfasst werden.

Da unterschiedliche Arten von Dickdarmkrebs unterschiedliche Wege bei der Kanzerogenese beschreiten, erscheint die Kombination dieser vier Gene sehr sinnvoll. Auf Grund früherer Genefec Studien kristallisierten sich als geeignetste Marker K-ras, p53, B-raf und long DNA heraus. Genefec-2 untersuchte diese molekularen Marker hinsichtlich Sensitivität und Spezifität. Die Sensitivität des Tests lag bei 51,9%, die Spezifität in der Kontrollgruppe bei 88,9%. Die Proportionalität der falsch positiven Ergebnisse war in der Kontrollgruppe 10,4%, in den verschiedenen Risikogruppen bewegte sie sich zwischen 11,6% und 16,9%. Der Test erreichte einen sehr hohen negativ prädiktiven Wert. Jeder einzelne Marker konnte je zwei KRK aufdecken, die bei den anderen Tests unentdeckt blieben. Durch geeignete Kombination der einzelnen Marker konnte eine relativ hohe Sensitivität erreicht werden. Dieses hochspezifische Ergebnis ergibt sich aus der Tatsache, dass es sich bei den Markern um Alterationen handelt, die nur im Tumor, nicht jedoch im Normalgewebe vorliegen. K-ras Mutationen treten beispielsweise in weniger als 50% aller Kolonkarzinome auf und sind auch in nicht neoplastischem Gewebe zu finden, weshalb dieser Marker allein nicht ausreichend für ein Nachweisverfahren zur Früherkennung ist (63).

Da unterschiedliche Arten von Dickdarmkrebs unterschiedliche Wege bei der Kanzerogenese beschreiten, ist eine geeignete Kombination von einzelnen Markern in dem Diagnose Kit wichtig. Unsere Studie konnte zeigen, dass durch die Kombination von K-ras, p53, B-raf, und long DNA eine Früherkennung von Darmkrebs möglich ist. Der Test war in 12% aller Adenom Patienten positiv weswegen er als zur Vorsorge von Darmkrebs nicht geeignet ist.

Der Vergleich von Genefec-2 mit dem Hämoccult Test und dem Schebo Test erfolgte mit dem Test von Mc Nemar.

Der Genefec-2 Test war dem FOBT hinsichtlich der Sensitivität mit 51,9% etwas unterlegen, der Unterschied zwischen beiden Tests ist jedoch nicht signifikant. Im Vergleich von Genefec-2 mit Tumor M2-PK, war der Unterschied der positiven Ergebnisse in allen Gruppen signifikant.

## **5.4 Kombination von FOBT und Genefec-2**

Wie bereits gezeigt werden konnte erreichte der FOBT als alleinige Stuhl Screening Methode eine Sensitivität von 66,7%. Im Unterschied zu vielen anderen Studien waren die Resultate für die Spezifität mit bis zu 96,0% in der Kontrollgruppe überraschend hoch. Der Genefec-2 Test ist mit einer Sensitivität von 51,9% dem FOBT etwas unterlegen, die Spezifität war mit bis zu 88,9% hoch, jedoch dem FOBT ebenfalls unterlegen. Bei der kombinierten Auswertung von FOBT und Genefec-2 konnte die in beiden Fällen relativ geringe Sensitivität auf 80,4% erhöht werden. Es wurden zusammen von 51 KRK Fällen 41 entdeckt. Dies spricht dafür, dass die beiden Tests unterschiedliche Patienten mit kolorektalem Karzinom entdecken und dass eine Kombination dieser beiden Tests hinsichtlich der Früherkennung sinnvoll erscheint. Die Spezifität bewegte sich in der Kontrollgruppe und den Risikogruppen zwischen 77,3% und 86,5%, was im Vergleich zu den Einzelauswertungen keine große Abweichung darstellt. Von den insgesamt 626 Patienten fehlten bei sieben Patienten die Stuhlproben für den Genefec-2 Test, bei zehn Patienten waren keine Proben für den FOBT vorhanden. Beide Tests zusammen waren bei 17% der Adenom Patienten positiv. Die Kombination eignet sich damit nicht zur Vorsorge von Darmkrebs. Inwieweit sich die Kombination von FOBT und Genefec als Screening der asymptomatischen Population eignet, sollte dennoch in weiteren, größer angelegten, prospektiven Studien getestet werden. Vor allem bei Patienten, die einer Koloskopie

ablehnend gegenüberstehen, kann die Kombination aus Genefec und FOBT als Früherkennungsmethode angewandt werden.

## 6 Schlussfolgerungen

Krebsvorsorgeuntersuchungen werden immer wieder kontrovers diskutiert. Die vorgestellten und getesteten Screening Methoden für das kolorektale Karzinom haben durchaus ihre Berechtigung. Auf Grund der Tatsache, dass sich die meisten bösartigen Veränderungen der Darmschleimhaut in einem langjährigen Prozess aus benignen Vorläufer Läsionen entwickeln, und diese durch ein minimal invasives Verfahren meist einfach entfernt werden können, sind Vorsorgeuntersuchungen auf diesem Gebiet sehr sinnvoll. Durch ein flächendeckendes Massenscreening könnte die Mortalität bei Darmkrebs deutlich gesenkt werden. Obwohl die Kosten- Nutzen Effektivität der Koloskopie durch mehreren Studien bewiesen wurde, ist die Bereitschaft der Bevölkerung hinsichtlich dieser Untersuchung relativ gering. Viele Menschen haben diesbezüglich zum einen eine hohe Schamgrenze, zum anderen wirken die vorbereitenden Maßnahmen sowie die Invasivität der Koloskopie abschreckend, weswegen sie von der Bevölkerung immer noch sehr wenig angenommen und genutzt wird. Aus diesem Grund sind Stuhltests zunehmend von großer Bedeutung.

Die Koloskopie ist im Rahmen aller Krebsvorsorgeuntersuchungen das einzige Verfahren, mit dem das Auftreten einer Krebserkrankung verhindert werden kann. Diesbezüglich bedarf es einer besseren Aufklärung vor allem durch die Hausärzte.

Die Kombination des FOBT mit dem molekularen Stuhltest bietet eine sinnvolle Alternative zum alleinigen Stuhlscreening mittels FOBT und sie liefert zudem ein sehr sensitives und hoch spezifische Ergebnisse. Diese Tatsache spricht für ein molekulares Darmkrebscreening, weil die Empfehlung für eine Koloskopie gezielter erfolgen kann. Patienten, die durch diese Kombination aus der Masse herausgefiltert werden, stehen unter dem Verdacht an neoplastischen Läsionen im kolorektalem Bereich erkrankt zu sein. Eine Koloskopie ist dann in jedem Fall dringend zu empfehlen, und führt unter diesen Umständen eventuell zu einer höheren Bereitschaft, die invasive Untersuchung durchführen zu lassen. Bei negativen Ergebnissen ist eine jährliche Wiederholung der Stuhltests ratsam, um mögliche tumoröse Veränderungen frühzeitig zu erkennen. Im Vergleich mit dem ScheBo Test liefert die Kombination aus Genefec-2 und FOBT nicht nur eine höhere Sensitivität, sondern die Ergebnisse sind zudem auch noch hochspezifisch. Um Aussagen treffen zu können, ob sich molekulare Stuhltests als Screening Methode für das kolorektale Karzinom eignen, bedarf es weiterer Studien, die sich mit Kosteneffektivität und Mortalitätssenkung auseinandersetzen. Durch ein erweitertes Stuhlscreening mittels FOBT und

molekularen Tumormarkern könnte die Vorauswahl für eine Koloskopie gezielter getroffen werden, und die Bereitschaft der Bevölkerung diesbezüglich gesteigert werden. Der i-FOBT einerseits, und die Kombination aus FOBT und Genefec andererseits bieten eine Alternative in der Darmkrebs Vorsorge bei Patienten, die eine Koloskopie ablehnen. Bis jetzt sind Stuhlscreening Methoden jedoch keine Alternative zur Darmspiegelung. Sie ist immer noch das zuverlässigste Verfahren, tumoröse gutartige Veränderungen der Darmschleimhaut zu entdecken, und somit den Ausbruch der Krebserkrankung zu verhindern.

## 7 Zusammenfassung

Darmkrebs als eine genetische Erkrankung beruht letztendlich auf einer Störung der normalerweise exakt ablaufenden Entwicklung und Vermehrung von Zellen. Diese Anarchie ist das Resultat eines in mehreren Schritten ablaufenden Prozesses. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei Mutationen von Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen. Im Rahmen der Genefec-2 Studie wurden aus abgeschilferten Darmepithelzellen gewonnene und isolierte DNA Abschnitte mittels PCR auf Mutationen untersucht. Als besonders geeignet erwiesen sich die Gene für K-ras, p53, B-raf und long DNA. Sie wurden alle in Form von nur einem Test, Genefec-2, untersucht. Es erfolgte eine Einteilung der 626 in die Studie eingeschlossenen Patienten in 6 Gruppen, aufgrund ihrer durch die Koloskopie gewonnenen Histologie. Alle Probanden sollten Stuhlproben für FOBT, Tumor M2-PK Test und Genefec-2 entnehmen.

Ziel der Studie war es, die Sensitivität und Spezifität von Genefec-2 in jeder Patientengruppe zu ermitteln, und mit den Ergebnissen von geläufigen Stuhltests, FOBT und Schebo, zu vergleichen. Die Darmspiegelung diente als Referenztest.

Die Sensitivität von Genefec-2 lag bei 51,9 % bei 54 gesicherten KRK, seine Gesamtspezifität erreichte 86,26%. Der Test hatte einen sehr hohen negativ prädiktiven Wert. Die Patienten mit negativem Testergebnis haben mit 97% Wahrscheinlichkeit kein kolorektales Karzinom. Der FOBT konnte 34 von 51 gesicherten KRK ermitteln, und erreichte somit eine Sensitivität von 66,7 %, bei einer Gesamtspezifität von 95%. Der Tumor M2-PK Test diagnostizierte 35 von 45 gesicherten KRK Fällen. Seine Sensitivität war mit 77,8 % am höchsten, hinsichtlich der Spezifitäten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Risikogruppen unterlag er deutlich den beiden anderen Tests. Die Gesamtspezifität betrug 50,34%

Durch eine Kombination von Genefec-2 und FOBT konnte die Sensitivität für KRK auf 80,4% erhöht werden, die Spezifität erreichte 86,26%. Die Resultate bei kombiniertem FOBT und Genefec-2 sind vielversprechend hinsichtlich eines auf Stuhltest basierenden Darmkrebsscreening, sie stellen jedoch keine Alternative zur Koloskopie dar. Das Verfahren ist eine gute Möglichkeit, Risikopatienten aus der Gesellschaft heraus zu filtern, und ihre Bereitschaft für eine Koloskopie zu erhöhen.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Abbaszadegan M, Tevasoli A, Velayati A (2007): Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. *World J Gastroenterol.* 13 (10): 1528-33
- 2 Ahlquist DA, Shuber AP (2002): Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers; *Clinica Chimica Acta* 315: 157-168
- 3 Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA et al (2000): Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119: 1219-1227
- 4 Ahlquist DA, Wieland HS, Moertel CG, et al (1993) Accuracy of fecal occult blood screening for colorectal neoplasia: a prospective study using HemoQuant and Hemocult; *JAMA* 269: 1262-1267
- 5 Arnold C.; Blum H (2005): Kolonkarzinom: Molekulare Marker: *DMW* 130: 880-882
- 6 Bang KM, Tillett S, Noar SK, et al (1986): Sensitivity of fecal Hemocult testing and flexible sigmoidoscopy for colorectal cancer screening: *J Occup Med* 28: 709-713
- 7 Becker N, Wahrendorf J (1998): *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981–1990*. Berlin, Springer,
- 8 Bertz H, Hoffmeister H (1995): *Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland, RKI Schriften; Bd 3.*, München
- 9 Bingham SA, et al. (2003): *Lancet.*; 361: 1496-501
- 10 Boland CR, Sato J, Appelman HD, et al (1995): Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nat Med* 1: 902–909

- 11 Bond JH (1999): Screening guidelines for colorectal cancer. *Am J Med* 1067–1068
- 12 Bos JL (1989): Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682– 4689
- 13 Ciatto S et al. (2007): Association of FOBT-assessed faecal Hb content with colonic lesions detected in the Florence screening programme; *British Journal of Cancer* 96: 218 – 221
- 14 Classen; Diehl; Kochsiek: (2004) *Innere Medizin*; Urban und Fischer; 5. Auflage 1235- 1238 13
- 15 Crisan D, Mattson JC (1993): Retrospective DNA analysis using fixed tissue specimens. *DNA Cell Biol.* 12(5): 455-64
- 16 Demers RY, Stawick LE, Demers P (1985): Relative sensitivity of the fecal occult bloodtest and flexible sigmoidoscopy in detecting polyps: *Prev Med* 14: 55-62
- 17 Deutsches Ärzteblatt Jg. 105. Heft 7 (15. 02. 2008)
- 18 Douglas A et al. (2006): Rome III: New Standard for Functional Gastrointestinal Disorders: *J Gastrointestin Liver Dis* September Vol.15 No.3, 237-241
- 19 Dukes CE, Bussey HJR (1958): The spread of rectal cancer and its effect on prognosis:*Br J Cancer* 12: 309–320
- 20 Eickhoff A., Reinacher-Schick A, Schmiegel W (2002): Primärprävention, Screening und präventive Chirurgie Kolorektalkarzinom. *DMW* 127
- 21 Fielding LP (1986): Clinical-pathologic staging of large bowel cancer: *Lancet* 45: 8–30

- 22 Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer : An international documentation system (IDS) and an international comprehensive anatomical terminology (ICAT)  
J Gastroenterol Hepatol: 6:325-344
- 23 Fletcher, Fletcher, Wagner (1999): Klinische Epidemiologie - Grundlagen und Anwendungen: Ullstein Medical
- 24 Frazier AL, Colditz GA, Fuchs CS, et. al. (2000): costeffectiveness of screening for colorectal cancer in the general population. JAMA 284: 1954-1961
- 25 Ganter D , Ruckpaul K (2005): Nicht hereditäre Tumormarker Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- 26 Greigor DH (1971): Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer Cancer 28: 131–134
- 27 Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH et al. (1996): Randomised controlled trial of faecal-occultblood screening for colorectal cancer Lancet 348: 1472–1477
- 28 H. Hauser (2004): Das Kolorektale Karzinom – Teil I: Epidemiologie, Präkanzerosen, Primär- und Sekundärprävention J Gastroenterol Hepatol Erkr; 2 (4): 6–11.
- 29 Heinimann K (2009): Schweizerische Ärztezeitung / Bulletin des médecins suisses / Bollettino dei medici svizzeri;81: Nr 36
- 30 Herold G (2010): Innere Medizin
- 31 Jahn H, Joergensen OK, Kronborg O, et al. (1992): Can Hemocult II replace colonoscopy after radical surgery for colorectal cancer or after polypectomy? Dis. Colon Rectum 35: 253-256

- 32 Kewenter J, Bjork S, Haglind E, et al. (1988): Screening and rescreening for colorectal cancer. A controlled trial of fecal occult blood testing in 27.700 subjects: *Cancer* 62: 645–651
- 33 Kinzler KW, Vogelstein B (1996): Lessons from hereditary colorectal cancer *Cell* 87: 159–170
- 34 Kleinig; Sitte (1999): *Zellbiologie Fischer*, 4. Auflage
- 35 Koss K, Maxton D (2005): Jankowski JAZ: The potential use of fecal dimeric M2 pyruvate kinase (Tumor M2-PK) in screening for colorectal cancer Abstract from Digestive Disease Week, May 2005, Chicago/USA
- 36 Kronborg O, Fenger C, Olsen J, et al. (1996): Randomised study of screening for colorectal cancer with FOBT. *Lancet* 348: 1467–1471
- 37 Kumar, Yogesh, Tapuria, et al. (2007): Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 19(3): 265-276
- 38 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643–649
- 39 Levi Z et al. (2009): Sensitivity, but not specificity, of a quantitative immunochemical fecal occult blood test for neoplasia is slightly increased by the use of low-dose aspirin, NSAIDs, and anticoagulants. *Am J Gastroenterol* 2009 Apr; 104:933.
- 40 Liotta, LA et al (1983): Tumor invasion and the extracellular matrix: *Lab. Invest* 49: 636
- 41 Liebermann DA (1995): Cost-effectiveness model for colon cancer screening. *Gastroenterology* 109: 1781–1790

- 42 Lieberman DA, Weiss DG (2001): One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med* 345: 555–560
- 43 Link K-H (2005): Kolonkarzinom und adjuvante Chemotherapie: Schlüsselrolle des Chirurgen Asklepios Paulinen Klinik, FOLFOX mit FOLFusor: Sicherheit und Verträglichkeit für die ambulante Chemotherapie Pressekonferenz am 10. März 2005 in Frankfurt Wiesbaden
- 44 Loughlin Mc, Shiel E, Sebastian S (2005): Tumor M2-PK, a novel screening tool for colorectal cancer. Department of gastroenterology, Adelaide and meath hospital, Dublin, Ireland
- 45 Mandel JS, Bond JH, Church TR et al. (1993): Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 328: 1365–1371
- 46 Müller AD, Sonnenberg A (1995): Prevention of colorectal cancer by flexible endoscopy and polypectomy. A case-control study of 32.702 veterans. *Ann Intern Med* 123 1741–1748
- 47 Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2251-2270
- 48 Newcomb PA, Norfleet RG, Storer BE et al. (1992): Screening sigmoidoscopy and colorectal cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 84 1572–1575
- 49 Newton (1994): CR.: PCR
- 50 Norat T, et al. (2002): IARC Sci. Publ. No. 156, 223-225
- 51 Pox C , Schulmann K, Schmiegel W (2002): Medizinische Klinik, Knappschaftskrankenhaus, Ruhr-Universität Bochum Konventionelles und molekulares Screening (Stuhltests) *Internist* 44 287–293

- 52 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer (2002): Tumorigenesis: Raf/Ras oncogenes and mismatch repair status Nature 418 934
- 53 Rexroth (2005): Gastroenterologie. Hans Huber Verlag, Bern. 1. Auflage Seite 325
- 54 Ribet A, Frexinos J, Escourrou J, et al (1980): Occult blood tests and colorectal tumors. Lancet 1 417-421
- 55 Riede; Schäfer (2001): Allgemeine und spezielle Pathologie Thieme, 4. Auflage
- 56 Robinson MHE, Kronborg O, Williams CB, et al (1995): Faecal occult blood testing and colonoscopy in the surveillance of subjects at high risk of colorectal neoplasia. Br J Surg 82 318-320
- 57 Rockey DC et al. (2005): Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: prospective comparison. Lancet; 365 (9456): 305–311 (EBM-Grad: I b)
- 58 Rozen P (1992): Screening for colorectal neoplasia in the Tel Aviv area: cumulative data 1979-89 and initial conclusions. Isr J Med Sci 28 8-20
- 59 Rummeny E.; Reiner P; Heindel W (2002): Ganzkörper- MR- Tomographie; Thieme; 360- 363
- 60 Rust G.-F., Reiser M (2002): Virtuelle Koloskopie – Chancen für ein Screeningverfahren? Institut für Klinische Radiologie, Klinikum Großhadern der Universität München: Radiologe 42:617–621
- 61 Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P (2000): Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikopatienten – Endoskopische Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Polypen und Karzinomen. Gastroenterol 38 49-75
- 62 Schmiegel W, Pox C (2008): Selbmann H.-K: S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7.

- Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI und VII) S3-Guideline „Colorectal Cancer“ 2004/2008
- 63 Schmoll, Höffken, Possinger (2006): Kompendium internistische Onkologie 1 - Standards in Diagnostik und Therapie. Springer Verlag; 4. Auflage
- 64 Schrag D, Weeks J (1999): Costs and costeffectiveness of colorectal cancer prevention and therapy. *Semin Oncol* 26 561–568
- 65 Steinberg P, Scholtka B (2005): Verfahren zur nicht invasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen. World intellectual property organization. Publication Number: WO/ 2005/030788
- 66 Schulenburg JM, Über A (1995): The cost of cancer to society. :The challenges in studying the socioeconomic dimensions in cancer therapy (Cologne, Germany). Medicine Group, Pennsylvania, pp 27–35
- 67 Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP et al. (1992): A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 326 653–657
- 68 Sonnenberg A, Delc6 F, Inadomi JM (2000): Cost-effectiveness of colonoscopy in screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 133 573–584
- 69 Steele GD (1994): The national cancer data base report on colorectal cancer; *Cancer* 74 1979–1989
- 70 St. John DJ, McDermott FT, Hopper JL, et al. (1993): Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer *Ann Intern Med* 118 785–790
- 71 Tonus C, Neupert G, Selinger M (2006): Colorectal cancer screening by non invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK. *World Journal of Gastroenterology* 11,12 (43), 7007-7011.

- 72 Towler B, Irwig L, Glasziou P et al. (1998): A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test BMJ 317 559–565
- 73 v. Gelder, et al. (2004): Radiology 232 25-33
- 74 Willet WC; Stampfer MJ; Colditz GA; et al. (1990): Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among woman. N Engl J Med 323 1664-1672
- 75 Williams CB, Macrae FA, Bartram CI (1982): A prospective study of diagnostic methods in adenoma follow up. Endoscopy 14 74-78
- 76 Zheng Feng YU, Shiozawa T, Miyamoto T (2005): B-raf Mutation in endometrial carcinoma and Hyperplasia: Correlation with K-ras and p53 Mutations and Mismatch Repair Protein Expression. Clin. cancer res. 11 (17) 6133-6137

## 9 Thesen

1. Darmkrebs ist mit ca. 35.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland die zweithäufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen.
2. Um die Mortalität und Morbidität zu senken ist eine frühzeitige Entdeckung des entarteten Gewebes wichtig.
3. Der Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT) und die Koloskopie sind in Deutschland anerkannte Früherkennungsmethoden. Viele der Berechtigten lehnen eine Koloskopie ab. Die Suche nach nicht invasiven Alternativen ist berechtigt und sinnvoll.
4. Im Rahmen der Studie wurden die Gene K-ras, p53, B-raf und long DNA in Form von Stuhltests (Genefec) in ihrer Funktion als Früherkennungsmaßnahme hinsichtlich Sensitivität und Spezifität untersucht und mit den Ergebnissen des FOBT und dem Schebo Test (Tumor-M2 Pyruvatkinase) verglichen. Alle Patienten wurden koloskopiert.
5. Es nahmen 734 Patienten in 18 verschiedenen Zentren in Sachsen-Anhalt, Sachsen und Thüringen an der Studie teil. Auf Grund ihrer histologischen Diagnose wurden letztendlich 626 Patienten in 6 verschiedene Gruppen eingeteilt
6. Um die Güte der Stuhltests beurteilen zu können, wurden Sensitivität, Spezifität und die Prädiktion von FOBT, Schebo und Genefec im Vergleich zur Histologie ermittelt. Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den drei Verfahren bestehen, wurde der Test nach Mc Nemar angewandt.
7. Der FOBT erreichte eine Sensitivität von 66,7%, der Schebo Test hatte mit 77,8% die höchste Sensitivität, Genefec-2 erreichte eine Sensitivität von 51,9%. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Resultaten des Schebo und des Genefec Tests.
8. Durch Kombination des FOBT und Genefec konnte die Sensitivität auf 80,4% gesteigert werden. Auf Grund der schlechten Spezifität des Tumor-M2-PK Tests erschien eine kombinierte Auswertung nicht sinnvoll.
9. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die beiden Tests (FOBT, Genefec) unterschiedliche Patienten mit kolorektalem Karzinom entdecken
10. Bis jetzt sind Stuhlscreening Methoden keine Alternative zur Darmspiegelung. Durch ein erweitertes Stuhlscreening mittels FOBT und molekularen Tumormarkern könnte die Vorauswahl für eine Koloskopie gezielter getroffen werden, und die Bereitschaft der Bevölkerung diesbezüglich gesteigert werden.

# Curriculum vitae

## Zur Person:

Sonja Kristina Hiemer

Geboren am 14.03.1979 in München  
Ledig, keine Kinder  
Vater, Dr. Hermann Hiemer, Zahnarzt  
Mutter, Dr. Gerda Hiemer, Zahnärztin, 1996 verstorben  
Geschwister, Manuel und Georg Hiemer

Wohnhaft:  
Kleine Ulrichstr.21  
06108 Halle/S.

seit 02/2009                      Anstellung als Assistenzärztin in der Klinik für  
innere Medizin IV- Hämatologie/ Onkologie an  
der Universitätsklinik Halle

08/2002 bis 11/2008            **Universitäre Ausbildung**

11/2008                            **Staatsexamen Medizin**  
med. Fakultät der Universität Halle/ Wittenberg

08/2007 bis 07/2008            **Praktisches Jahr**

Chirurgie  
Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie  
Universitätsklinikum der Semmelweis Universität  
*Budapest, Ungarn*

Innere Medizin  
Station für Innere Medizin 2  
BG Klinikum Bergmannstrost  
*Halle*

Wahlfach Radiologie  
Klinik für diagnostische Radiologie  
Universitätsklinikum Halle Kröllwitz  
*Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg*

## Famulaturen

**Innere Medizin**  
Klinikum Garmisch-Patenkirchen (1Monat)

**Plastische Chirurgie/ Handchirurgie**  
Orthozentrum München (1Monat)

**Allgemein/ Visceralchirurgie**  
Klinikum Prien am Chiemsee (1Monat)

**Notfallambulanz**  
Narok district hospital  
*Narok, Kenia* (1 Monat)

**Innere Medizin**  
Endoskopische Abteilung  
BG Klinikum Bergmannstrost (3 Wochen)

Seit 10/2006

### **Arbeit an der Dissertation**

Thema:  
„Genefec 2 - Studie zur Beurteilung von Sensitivität und Spezifität DNA-basierter Stuhl Screening Methoden für das Kolorektale Karzinom.“  
in der Klinik für Innere Medizin I, Martin-Luther-Universität Halle

08/2004

**Physikum**  
med. Fakultät der Semmelweis Universität  
*Budapest, Ungarn*

08/2002 bis 08/2004

**Studium der Humanmedizin**  
med. Fakultät der Semmelweis Universität  
*Budapest, Ungarn*

08/2001 bis 08/2002

**Pre-med. Kurs**  
College international  
*Budapest, Ungarn*

06/2000 bis 06/2001

**Pflegepraktikum und Tätigkeit als medizinische Aushilfskraft**  
Klinikum Rosenheim

08/1985 bis 06/2000

### **Schulbildung**

1985-1989 Grundschule Neubeuern  
1989-1994 Ignaz-Günther Gymnasium, Rosenheim  
1994-2000 Schloss Neubeuern Internatsschule für Jungen und Mädchen

### **Sonstige Kenntnisse**

Gute Englischkenntnisse  
Französisch und Ungarischkenntnisse  
Gute EDV-Kenntnisse

Halle, 15.02.2010

Sonja Hiemer

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 20.01.2009

Sonja Hiemer

## **Erklärung über Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 20.01.2009

Sonja Hiemer

## Danksagung

Für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Martin-Luther-Universität Halle/ Wittenberg möchte ich Herrn Prof. Dr. Seufferlein, danken.

Herrn OA PhD Dr. M. Dollinger möchte ich für die Betreuung danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Behl für die Unterstützung und engagierte Betreuung im gesamten Verlauf dieser Arbeit sehr herzlich bedanken. Sie stand mir jederzeit für alle Fragen und zur Lösung jeglicher Probleme zur Seite.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Haerting und Frau Grohmann, sowie dem epidemiologischen Institut für den Rat und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Familie Wisboeck und Familie Peisl, insbesondere Andrea danke ich für die ausnahmslose seelische und moralische Unterstützung, sowie für ihr ewig währendes Verständnis.

Meinen Großeltern, Joseph und Maria Falter, möchte ich für Ihre uneingeschränkte Liebe danken.

Meinem Vater danke ich für seine Motivation bei meiner Entscheidung Medizin zu studieren und für seine jahrelange finanzielle Unterstützung.

Ich danke Jette dafür, dass Sie die Arbeit Korrektur gelesen hat, und Christian für seine Hilfe bei der Formatierung!!