

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig-Maximilian-Universität München
Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel**

Nukleosomen im Serum von Tumorpatienten unter Radiochemotherapie

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München**

vorgelegt von

Andreas Emanuel Kremer

aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Klobeck
Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huß

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. P. Stieber
Herr Dr. S. Holdenrieder

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2007

Meinen Eltern gewidmet

Vorveröffentlichungen:

Originalarbeiten:

Kremer A, Wilkowski R, Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, Seidel D

Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy
Tumour Biology 2005; 26: 44-49

Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YM

Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR
Clin Chem 2005; 51: 1544-1546

Kremer A, Holdenrieder S, Stieber P, Wilkowski R, Nagel D, Seidel D

Nucleosomes in colorectal cancer patients during radiochemotherapy
Tumour Biology 2006; 27: 235-242

Beiträge auf internationalen Kongressen in Form von Abstracts:

- | | |
|---------|---|
| 11/2002 | Jahrestagung der Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie, in Düsseldorf (<u>Poster</u>) |
| 08/2003 | XXXI Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM, in Edinburgh (<u>Vortrag, Poster</u>) |
| 11/2003 | 3rd Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum Proteomics, CNAPS, in Santa Monica, California, USA (<u>Vortrag, Poster</u>) |
| 09/2005 | 4th Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum Proteomics, CNAPS, in London, UK (<u>Poster</u>) |
| 09/2005 | XXXIII Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM, in Rhodos, Greece (<u>Vortrag</u>) |

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	HINTERGRUND	3
2.1	Zelltod	3
2.1.1	Geschichtlicher Hintergrund	3
2.1.2	Modellvorstellungen über den Zelltod	5
2.1.3	Zelltod bei physiologischen und pathologischen Prozessen	8
2.1.4	Signalwege der Apoptose	10
2.1.5	Verfahren zum Nachweis der Apoptose	12
2.2	Nukleosomen	14
2.2.1	Struktur	14
2.2.2	Funktion	16
2.2.3	Freisetzung und Metabolismus	18
2.3	Pankreaskarzinom	19
2.3.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	20
2.3.2	Klinik und Diagnostik	21
2.3.3	Therapie und Prognose	22
2.4	Kolorektales Karzinom	25
2.4.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	25
2.4.2	Klinik und Diagnostik	26
2.4.3	Therapie und Prognose	27
3	PATIENTEN UND METHODEN	29
3.1	Patienten	29
3.1.1	Patienten mit Pankreaskarzinomen	29
3.1.2	Patienten mit kolorektalem Karzinom	33

3.1.3 Radiochemotherapie	36
3.1.3.1 Strahlentherapie	36
3.1.3.2 Chemotherapie	37
3.2 Klinische Bewertung der Therapieeffizienz	37
3.3 Methoden	39
3.3.1 Gewinnung und Vorbehandlung der Serumproben	39
3.3.2 Bestimmung der Nukleosomen	40
3.3.3 Messung von Tumormarkern	43
3.3.4 Statistik	45
4 ERGEBNISSE	48
4.1 Nukleosomen- und Tumormarker-Konzentrationen bei Patienten mit Pankreas-Karzinom	48
4.1.1 Freisetzungsmuster vor Start der Therapie	48
4.1.2 Freisetzungsmuster unter Therapie	51
4.1.3 Vergleich der Therapiegruppen	63
4.1.4 Therapieansprechen	65
4.1.5 Progressionsfreies Intervall	75
4.2 Nukleosomen- und Tumormarker-Konzentrationen bei Patienten mit kolorektalen Karzinom	78
4.2.1 Freisetzungsmuster vor Start der Therapie	78
4.2.2 Freisetzungsmuster unter Therapie	81
4.2.3 Vergleich der Therapiegruppen	95
4.2.4 Therapieansprechen bei Patienten unter neoadjuvanter RCT	100
5 DISKUSSION	109
6 ZUSAMMENFASSUNG	127
7 LITERATURVERZEICHNIS	129

8 ANHANG	142
8.1 Verzeichnis der Abkürzungen	142
8.2 Ethikantrag	146
9 DANKSAGUNG	156
10 LEBENSLAUF	158

1 Einleitung und Fragestellung

Für die zelluläre Homöostase im Menschen ist ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelluntergang von großer Bedeutung [Kerr 1994]. Ohne dieses Gleichgewicht ist der Organismus nicht funktions- und lebensfähig. Eine Dysregulation der Homöostase führt zu verschiedenen pathologischen Zuständen. Nimmt die Zellneubildung überhand, bilden sich lokale oder systemische Tumoren. Im Gegensatz dazu überwiegt bei entzündlichen, degenerativen, ischämischen oder autoimmunen Erkrankungen der Zelluntergang.

Während des Zelluntergangs, insbesondere der Apoptose, werden Nukleosomen freigesetzt und von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert. Wird die Phagozytosekapazität überschritten, gelangen die freigesetzten Nukleosomen in die Blutzirkulation [Kerr 1994, Wyllie 1992]. Nukleosomen, die nach der Desintegration der Zellmembran in die Zirkulation gelangen, werden rasch eliminiert [Rumore 1992]. Zirkulierende Nukleosomen können mittels immunologischer Verfahren quantifiziert werden [Holdenrieder 2001 (B)]. Nukleosomen in niedriger Konzentration lassen sich auch im Serum von gesunden Personen nachweisen [Holdenrieder 1999, Holdenrieder 2001 (C)]. Im Serum von Patienten mit verschiedenen benignen oder malignen Erkrankungen kommen sie in höherer Konzentration vor [reviewed in Ziegler 2002]. Auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankung [Amoura 1997, van Nieuwenhuijze 2003], nach Trauma [Lo 2000 (B)], während Transplantatabstoßung [Lo 1998, Fishbein 2004], nach Schlaganfall [Rainer 2003, Geiger 2006] und nach extremer körperlicher Belastung [Atamaniuk 2004] werden erhöhte Nukleosomenwerte im Serum beschrieben. Bei malignen Erkrankungen werden erhöhte Nukleosomenkonzentrationen sowohl spontan als auch unter Radio- und Chemotherapie festgestellt [Holdenrieder 2001 (A), Holdenrieder 2001 (C), Kuroi 2001, Holdenrieder 2004 (B), Müller 2006].

Die Therapieeffizienz bei Malignomen wird derzeit meist mit bildgebenden Verfahren, wie Ultraschall, Röntgen, Computer-, Magnetresonanz- oder Positronenemissions-Tomographie beurteilt. Oftmals erstreckt sich die Behandlung eines Malignoms über mehrere Monate, bevor ihre Effizienz abgeschätzt werden kann. Zusätzlich werden benachbarte Gewebe durch die Behandlung mitgeschädigt

und erschweren eine objektive Beurteilung der aktuellen Tumorgroße. Dies gilt besonders für Karzinome der Bauchspeicheldrüse.

Ein Labortest, der früher als die bildgebenden Verfahren die biochemischen Veränderungen und somit den Erfolg einer Radiochemotherapie anzeigen könnte, wäre höchst wünschenswert. So könnte man das therapeutische Konzept frühzeitig anpassen und Nebenwirkungen einer erfolglosen Therapie vermeiden.

Diese Arbeit versucht zu klären, ob die Freisetzung von Nukleosomen innerhalb der ersten Tage einer Radiochemotherapie frühzeitig die Effizienz der Therapie und damit das progressionsfreie Intervall erkennen lässt. Dazu wurden Patienten mit einem Karzinom der Bauchspeicheldrüse oder des Dickdarms in eine prospektive Studie eingeschlossen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Werden die Nukleosomen im Verlauf einer Radiochemotherapie nach einem typischen Muster freigesetzt?
2. Weisen Patienten mit postoperativer, primärer oder Rezidiv-Radiochemotherapie unterschiedliche Nukleosomenkonzentrationen auf?
3. Korrelieren Nukleosomenkonzentrationen mit dem klinischen Ansprechen auf die Therapie und den Ergebnissen der bildgebenden Verfahren?
4. Korrelieren die Nukleosomenwerte während Radiochemotherapie mit den Ergebnissen anderer biologischer Marker wie CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1? Verfügen Nukleosomen über eine vergleichbare oder additive Aussage?
5. Wie sicher und wie frühzeitig lässt sich speziell beim Pankreas- und beim Rektumkarzinom mit Hilfe der Nukleosomen die Therapieeffizienz bzw. das progressionsfreie Intervall beurteilen?

2 Hintergrund

Zum besseren pathophysiologischen Verständnis der Nukleosomen geht dieses Kapitel genauer auf Bedeutung, Ablauf und Regulation des Zelltods ein. Beim Zelltod werden verschiedene Apoptoseprodukte, unter anderem Nukleosomen, freigesetzt. Die bisher bekannten, verschiedenen Zelltodmodelle werden kurz und übersichtlich beschrieben. Einige Methoden zum Nachweis des Zelltods werden vorgestellt. Es folgen eine Beschreibung von Struktur, Funktion und Bedeutung der Nukleosomen als Grundbausteine des Chromatins und eine Erörterung der klinischen Relevanz dieses Parameters im Serum und Plasma. Abschließend werden das Pankreaskarzinom und das kolorektale Karzinom hinsichtlich Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese, Klinik, Diagnostik, Therapie und Prognose betrachtet. Für diese beiden Tumore wurden in der vorliegenden Arbeit die Nukleosomenkonzentrationen vor, während und nach Radiochemotherapie untersucht.

2.1 Zelltod

2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die Erkenntnisse über den Zelltod reichen zurück bis in die Antike. Vermutlich beschrieb schon Aristoteles dieses Phänomen, definitive Überlieferungen stammen von Galenus Galen. Er untersuchte im zweiten Jahrhundert nach Christus die Rückbildung des Ductus arteriosus während der Ontogenese [Krammer 2000]. Im 19. Jahrhundert konnte Carl Vogt erstmals diese Vorgänge mikroskopisch an der Geburtshelferkröte darstellen [Vogt 1842]. Allerdings musste noch mehr als ein Jahrhundert vergehen, ehe R Lockshin und C Williams die Abläufe des Zelltods an Insektenmodellen analysierten und den Begriff des „programmierten Zelltods“ prägten [Lockshin 1964]. Einige Jahre später konnten Lockshin und Tata zeigen, dass sich der Zelltod mit RNA- und Protein-Inhibitoren verhindern lässt [Tata 1966, Lockshin 1969].

John F Kerr führte 1971 den Begriff der „shrinkage necrosis“ ein, der Veränderungen einzelner absterbender Zellen in der Leber nach Verschluss der Vena portae beschrieb [Kerr 1971]. Mit Andrew Wyllie und Sir Alastair Currie prägte er dafür den Begriff „Apoptose“ [Kerr 1972]. Dieses Wort stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Abfallen von Blättern im Herbst ($\alpha\pi\omicron$ (apo): von, weg, entfernt von; $\pi\tau\omicron\sigma$ (ptosis): herabsinken, senken). Sie beschreiben die Apoptose als einen genetisch regulierten Prozess innerhalb der Zelle, bei dem einzelne Zellen absterben. Im Gegensatz dazu wird eine Nekrose durch Einflüsse herbeigeführt, die sich außerhalb der Zelle ereignen und häufig zum Absterben größerer Zellgruppen führen.

Ende der 70er Jahre wurde bei elektrophoretischen Untersuchungen des Chromatins in bestrahltem Gewebe eine typische Fragmentierung gefunden, die ein Leiter-ähnliches Muster auf dem Agarose-Gel hinterließ [Skalka 1976, Yamada 1981]. Die Chromatinbruchstücke wiesen eine Länge von etwa 200 Basenpaaren (bp) oder einem Vielfachen davon auf. Dies entspricht der Größe eines Nukleosoms (Mononukleosoms) bzw. zweier oder mehrerer miteinander verbundener Nukleosomen, die als Oligonukleosomen bezeichnet werden. Bereits 1974 charakterisierte Kornberg die Struktur dieser aus DNA und Histonen bestehenden Grundbausteine des Chromatins [Kornberg 1974].

Den Zusammenhang zwischen Zelltod und genetischer Programmierung stellte Horvitz 1982 durch Untersuchungen des Wurms *Caenorhabditis elegans* her [Horvitz 1982]. Es zeigte sich, dass die Apoptose von mehreren Genen reguliert wird [Ellis 1986, Hengartner 1992]. Entsprechende Regulatorgene wurden auch in Säugetierzellen nachgewiesen. Dabei spielt das p53-Gen eine zentrale Rolle bei der Auslösung der Apoptose, wie Yonish an leukämischen Zellen zeigte [Yonish 1991]. Auch wurde das Bcl-2-Gen entdeckt, welches den apoptotischen Zelltod blockieren kann [Vaux 1988].

Ein Durchbruch gelang den Arbeitsgruppen um Yonehara und Kramer, die entdeckten, dass Apoptose über einen Rezeptor induziert werden kann [Yonehara 1989, Trauth 1989]. Dieser Rezeptor wurde zunächst als Fas bzw. Apo1 bezeichnet und ist heutzutage als CD95 bekannt. Die Aktivierung des CD95-Rezeptors mittels eines monoklonalen Antikörpers durch Trauth gilt als erster erfolgreicher Ansatz, die

Apoptose-Induktion therapeutisch zu nutzen [Trauth 1989].

Intrazellulär wird das Apoptosesignal durch eine komplexe Aktivierung von Caspasen (Cystein-abhängige ASPartat-spezifische ProteASEn) weitergeleitet. Nachdem Thornberry 1992 die erste Cysteinprotease identifizierte, vergingen noch fünf Jahre, ehe die vollständige Kaskade der Caspasen beschrieben wurde [Thornberry 1992, Boldin 1996, Muzio 1996, Thornberry 1999]. Das Endglied dieser Kaskade ist eine Caspasen-abhängige DNase, die in den Zellkern eindringt und das Chromatin in Mono- und Oligonukleosomen spaltet [Enari 1998, Lichtenstein 2001, Fadeel 2005].

Inzwischen ist eine Vielzahl weiterer Oberflächenrezeptoren und intrazellulärer Faktoren bekannt, die das Apoptosesignal verstärken oder hemmen [Conradt 1998, Verhagen 2000, Gastmann 2001]. Auch viele Zellstrukturen, besonders die Mitochondrien, spielen eine zentrale Rolle während der Apoptose [Green 1998, Gastmann 2001]. Auf genetischer, RNA- und Proteinebene setzen therapeutische Strategien zur Modulation der Apoptose an, deren Stellenwert für unterschiedlichste Krankheitsbilder zunehmend erkannt wird [Nicholson 2000, Ferreira 2002].

2.1.2 Modellvorstellungen über den Zelltod

An der Elimination von Zellen sind zahlreiche physiologische und pathologische Stimuli beteiligt. Um diese Mechanismen besser zu verstehen, wurden verschiedene Modellvorstellungen entwickelt. Erstmals führte J. F. Kerr den Apoptose-Begriff ein. Er erklärte alle Formen des Zelltods allein durch zwei Formen, Nekrose und Apoptose. Von der Nekrose, die durch externe Stimuli verursacht wird, unterschied er die Apoptose, welche durch interne Stimuli ausgelöst wird. Zunächst wurden Nekrose und Apoptose mittels unter dem Mikroskop sichtbaren morphologischen Veränderungen unterschieden, ehe später dazu biochemische Untersuchungen herangezogen wurden [Kerr 1994, Granville 1998].

Die Apoptose löst keine Entzündungsreaktion aus und betrifft meist nur einzelne Zellen. Es handelt sich oft um alte Zellen, die für eine bestimmte Organfunktion nicht

mehr benötigt werden oder irreparabel geschädigt sind. Um die aktive Selbstzerstörung auszulösen, werden bestimmte Strukturen und Funktionen benötigt. [Kerr 1994, Darzynkiewicz 1997].

Während der Apoptose werden vielfältige morphologische Veränderungen beobachtet. Das Chromatin kondensiert, marginalisiert und wird pyknotisch. Aktivierte intrazelluläre Endonukleasen spalten die DNA in Mono- und Oligonukleosomen. Die Zelle schrumpft, da ihr Wassergehalt abnimmt [Arends 1990, Lichtenstein 2001]. Die Zellmembran wird unregelmäßig, bildet Blasen und Falten. Vesikel mit Zell- und Kernbestandteilen schnüren sich als apoptotische Körperchen von der Zelloberfläche ab. Diese werden von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert [Arends 1990, Kerr 1994, Majno 1995]. Durch die Freisetzung dieser „apoptotic bodies“ sintert die Zelle zusammen, bis nur noch ein dichtes, rundes Körperchen mit den verbleibenden Zellstrukturen übrig bleibt. Auch dieses wird phagozytiert. Dadurch entsteht theoretisch weder eine inflammatorische Begleitreaktion noch gehen benachbarte Zellen zugrunde [Kerr 1994]. Je nach Zelltyp laufen diese Prozesse zeitlich recht unterschiedlich ab [Kanduc 2002].

Im Gegensatz zur Apoptose betrifft die Nekrose meist mehrere Zellen, Zellverbände oder ganze Organteile. Häufig sind es externe Faktoren, wie Ischämien, Traumen, Säuren oder Laugen, Hitze oder hohe Bestrahlungsdosen, die eine Nekrose induzieren. Diese Stimuli schädigen die Zellen so stark, dass die Zellfunktionen irreversibel ausfallen. Die Mitochondrien werden geschädigt und der Energiegehalt der Zelle sinkt rasch ab. Die ATP-abhängigen Ionenpumpen kommen zum Erliegen. Ionen und Wasser strömen ein und lassen die Zelle anschwellen [Kerr 1994]. Der Zellkern und das Chromatin werden, wie alle andere Zellorganellen, durch unspezifische Proteasen gespalten. Dabei entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die nach Ruptur der Zellmembran in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [Darzynkiewicz 1997, Okada 2004]. Die ebenfalls freigesetzten proteolytischen Enzyme greifen Nachbarzellen an und lösen eine Entzündungsreaktion aus.

Ob eine Zelle durch Apoptose oder Nekrose zugrunde geht, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Entscheidend scheint die intrazelluläre ATP-

Konzentration während des auslösenden Ereignisses zu sein [Leist 1997]. Bei manchen Krankheitsprozessen laufen aber auch beide Formen des Zelltods nebeneinander ab. So sterben Zellen bei einem zerebralen Insult im Zentrum durch Nekrose, während sie in der Penumbra durch verzögerten apoptotischen Zelltod untergehen [Dirnagl 1999].

Ursprünglich wurde von dem dichotomen Modell des Zelltods, also Nekrose und Apoptose ausgegangen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass sie lediglich zwei extreme Grenzsituationen einer Vielfalt morphologischer und biochemischer Todesprozesse darstellen. In den letzten Jahren wurden weitere Zelltodarten und Mischformen beschrieben. Dazu gehören Paraptose, Nekroptose, Onkose und der autophagische Zelltod [Leist 2001, Okada 2004, Shintani 2004, Degterev 2005, Kelekar 2006]. Zunehmend wird auch der Begriff „Aponekrose“ verwendet, der die fließenden Übergänge besser beschreibt [Formigli 2000, Tanner 2004].

Unter Paraptose wird eine Form des programmierten Zelltods verstanden, die ohne eine deutliche Kondensierung des Chromatins abläuft und durch typische Vakuolenbildung gekennzeichnet ist [Leist 2001]. Die Nekroptose ist durch einen morphologisch Nekrose-ähnlichen Zelltod charakterisiert. Dabei wird wie bei der Apoptose ein Rezeptor der Fas-/TNF-Familie stimuliert. Trotz Blockade der intrazellulären Weiterleitung der Apoptosesignale, kann diese Rezeptoraktivierung einen nicht-apoptotischen Zelltod einleiten, die sogenannte Nekroptose [Degterev 2005]. Der Begriff Onkose (onkosis; griech. Schwellung) wurde von Majno als Ersatz für Nekrose eingeführt. Die Onkose beschreibt eindrucksvoller das Anschwellen einer Zelle während des Zelltods und grenzt diese Form des Zelltods exakter von der Apoptose ab, die mit einer Zellschrumpfung einhergeht [Majno 1995]. Onkose und Apoptose beschreiben also prämortale Prozesse in Zellen während des Zelltods. Nekrose stellt dagegen morphologische Veränderungen nach dem Untergang einer Zelle dar, unabhängig von der Art des Zelltods [Cruchten 2002]. Beim autophagischen Zelltod werden defekte Organellen, Zytoplasma und phagozytierte Substanzen eliminiert. Eine wichtige Rolle spielen dabei Lysosomen, die Hydrolasen enthalten. Diese Enzyme verdauen abzubauenende Stoffe nach deren Fusion mit Lysosomen [Kroemer 2005]. Nicht geklärt ist bisher, ob der autophagische Zelltod vor Krankheiten schützt oder gar als Krankheitsauslöser angesehen werden muss [Wang 2003, Shintani

2004, Kroemer 2005].

Über molekulare Regulation und Signifikanz dieser Zelltodmodelle gibt es bisher nur begrenzte Erkenntnisse. Fließende Übergänge zwischen verschiedenen Zelltodformen wurden beschrieben und die Abgrenzung zwischen den einzelnen Zelltodformen scheint schwierig zu sein. Daher konzentriert sich diese Arbeit im weiteren Verlauf auf die Beschreibung der Apoptose als charakteristische Zelltodform.

2.1.3 Zelltod bei physiologischen und pathologischen Prozessen

Die Apoptose ist im menschlichen Organismus von fundamentaler Bedeutung für geregelte Embryogenese, physiologische Involutionsprozesse, funktionierendes Immunsystem, Aufrechterhaltung der Organfunktionen und Homöostase der Zellzahl [Kerr 1994, Cummings 1997, Granville 1998].

Eine geregelte Embryogenese, während der überflüssige Organanlagen abgebaut werden, ist ohne den programmierten Zelltod nicht denkbar. Störungen in diesem frühen Stadium des Lebens können zu Dismorphien und Fehlfunktionen innerer Organe und äußerer Körperstrukturen führen [Cummings 1997, Granville 1998]. Involutionsprozesse, wie die physiologische Rückbildung der Mamma nach dem Abstillen, können nur bei funktionierender Apoptose stattfinden. Das Immunsystem eliminiert während der Lymphogenese eigene T- und B-Lymphozyten, welche unfähig sind, körperfremde Antigene zu erkennen oder gegen körpereigene Antigene autoreaktiv wirksam sind [Ucker 1997, Krammer 2000]. Ist die Lymphozytenelimination nicht mehr gewährleistet, können Autoimmun-Erkrankungen entstehen, da ausgereifte T-Killerzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die Apoptose bei praktisch jeder körpereigenen Zelle induzieren können [Krammer 2000]. Um die Funktion der Organe, speziell der Organe mit hohem Zellumsatz, aufrecht zu erhalten, ist ein Abbau alter, geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen notwendig. Dies geschieht meist auf apoptotischem Wege [Cummings 1997, Savitz 1998, Wagener 1999]. Auch in der Heilungsphase von Wunden und Traumen, wenn sich Granulationsgewebe in Narbengewebe umwandelt, werden zelluläre Bestandteile

zugunsten von Fasergewebe apoptotisch eliminiert [Desmouliere 1997].

Im gesamten Organismus, wie auch in den einzelnen Organen und Funktionssystemen, stehen Zelltod und Zellproliferation in einem fein regulierten Gleichgewicht. Eine funktionierende Gewebshomöostase stellt damit einen entscheidenden Schutz vor Neubildungen und Tumoren dar. Für die Malignomentstehung könnte ursächlich entweder eine gesteigerte Proliferationsrate, eine erniedrigte Zelltodrate, ein Zusammentreffen beider Phänomene oder eine gleichsinnige Veränderung mit überwiegender Wachstumskomponente sein [Wyllie 1992, Reed 1999]. Im Modell der mehrstufigen Entwicklungssequenz von Tumoren verändert sich, nach verschiedenen Genmutationen, Normalgewebe über Metaplasie und Dysplasie schließlich zur Neoplasie. Aktivierte Onkogene und supprimierte Suppressorgene wirken dabei beschleunigend auf die Proliferationsrate [Wyllie 1999]. Bei vielen Tumoren wird auch eine Mutation des p53-Gens beobachtet, wodurch die Zellen ihre Fähigkeit verlieren, die Apoptose einzuleiten [Wagener 1999, Zörnig 2001].

Die Entwicklung von einer dysplastischen Zelle bis hin zum malignen Tumor vollzieht sich über Jahre bis Jahrzehnte. Bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms wurden Zellproliferation, Apoptoserate und Angiogenese sehr gründlich analysiert. Verändert sich gesundes Gewebe zu einem Adenom mit leichten Dysplasien, so steigt mit der Proliferationsrate auch die Apoptoserate. Dies könnte durch einen Mangel an Nährstoffen, Sauerstoff und Hormonen verursacht sein. Wandelt sich ein Adenom mit leichter Dysplasie zu einem Adenom mit schwerer Dysplasie um, so fällt interessanterweise die Apoptoserate ab, während gleichzeitig die Proliferationsrate weiter ansteigt. Zusätzlich bilden sich in diesem Stadium deutlich neue Blutgefäße aus. Beim Übergang zum manifesten Karzinom steigt die Apoptoserate wieder leicht an. Die Angiogenese nimmt nochmals deutlich zu, während die Proliferation der malignen Zellen auf hohem Niveau lediglich geringfügig steigt [Aotake 1999]. Insgesamt überwiegt damit im Tumor die Proliferationsrate vor Angiogenese- und Apoptoserate. Dies führt zu einem Nettowachstum des Geschwürs.

2.1.4 Signalwege der Apoptose

Der programmierte Zelltod kann über extrazelluläre oder intrazelluläre Mechanismen induziert werden. Hormonähnliche Faktoren, wie der Fas-Ligand oder der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) binden an spezifische Apoptose-Rezeptoren und aktivieren extrazellulär das Apoptoseprogramm [Ashkenazi 1998, Krammer 2000]. Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere Oberflächen-Rezeptoren identifiziert, die externe apoptotische Signale übermitteln können. Der wichtigste Vertreter ist der CD95-Rezeptor, der das Apoptosesignal nach einer Konformationsänderung in die Zelle leitet. Es bildet sich der Death Inducing Signalling Complex (DISC), der verschiedene Caspasen, wie Caspase 8 und 3, proteolytisch aktiviert [Krammer 2000, Hengartner 2000, Fadeel 2005] (s. Abb. 1). Außerdem können zytotoxische Zellen durch Freisetzung von Perforin und Granzymen die Apoptose einleiten [Lowin 1995].

Andererseits lösen diverse Zellschädigungen, wie Hypoxie, Radikale, Toxine, Chemotherapeutika oder Bestrahlung den programmierten Zelltod auf intrazellulärem Wege aus. Solche Veränderungen des Zellmilieus induzieren meist p53 vermittelt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien [Green 1998, Krammer 2000]. Diese Freisetzung von Cytochrom C hängt von dem Verhältnis apoptosehemmender Faktoren (Bcl-2-Proteine) zu apoptosefördernden Faktoren (Bax-Proteine) [Granville 1998] ab. Das freigesetzte Cytochrom C ist ein Kofaktor für die Aktivierung von Caspasen, die als inaktive Vorstufen, sog. Procaspasen, in der Zelle vorhanden sind. Aktivierte Caspasen führen das apoptotische Programm aus, indem sie eine Reihe von Zellproteinen und die DNA an charakteristischen Stellen spalten und dadurch die Zelle schrittweise abbauen [Granville 1998, Wagener 1999, Hengartner 2000, Krammer 2000] (s. Abb. 1).

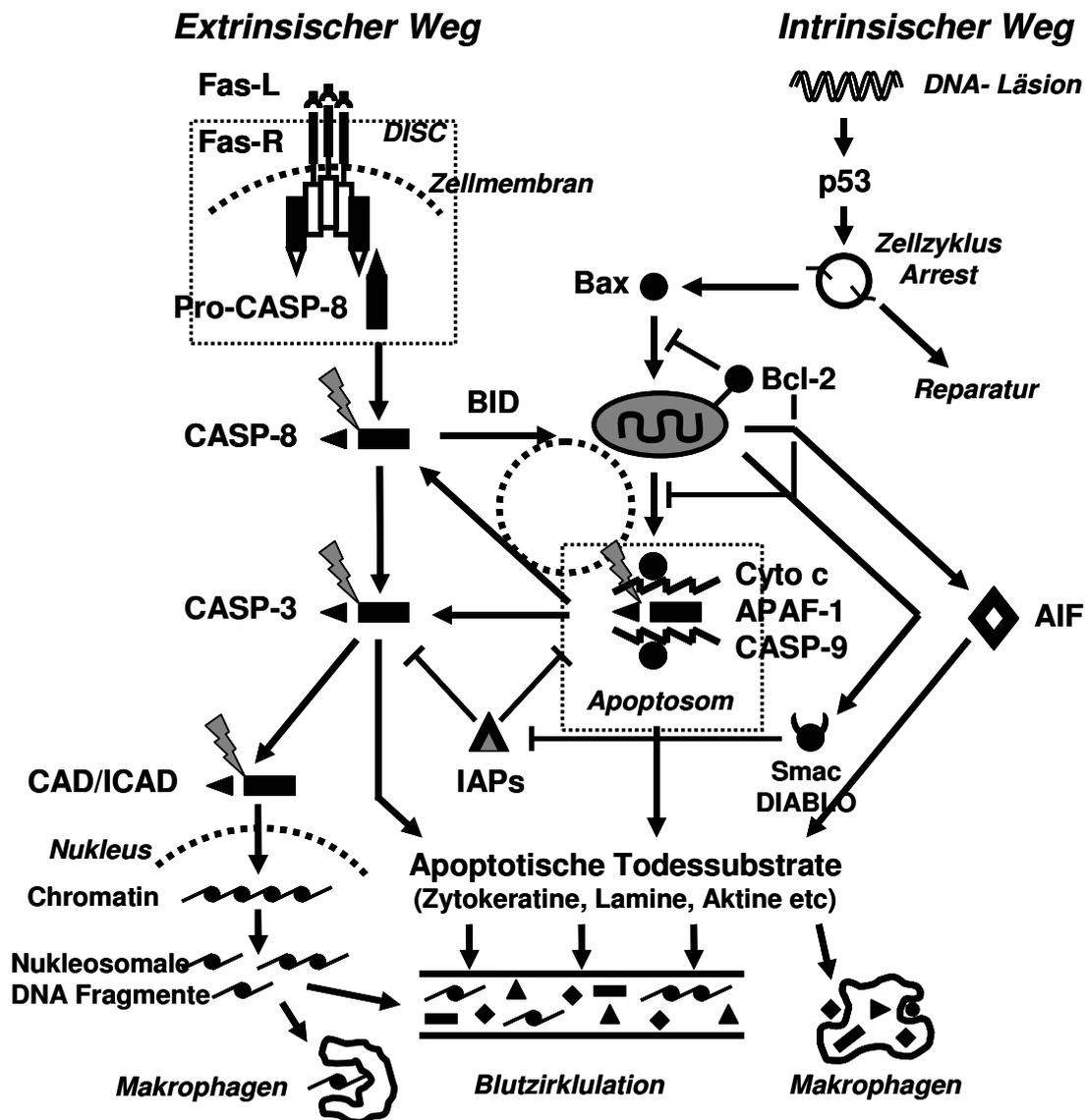


Abb. 1: Extrinsische und intrinsische Aktivierungskaskade der Apoptose (modifiziert nach [Holdenrieder 2004 (A)]): Der extrinsische Weg wird über eine Aktivierung des Rezeptors der Fas-/TNF-/Apo1-Familie eingeleitet. Dabei formiert sich ein „death inducing signalling complex“ (DISC), der erst die Caspase 8 und anschließend weitere Effektorcaspasen, wie Caspase 3 aktiviert (\longrightarrow). Diese Effektorcaspasen leiten eine geordnete Auflösung der zellulären Strukturen ein. So wird die Caspasen-abhängige DNase (CAD) aktiviert, welche in den Zellkern gelangt und das Chromatin in nukleosomale Fragmente zerkleinert. Diese werden wie alle anderen Zelltodssubstrate in apoptotische Körperchen verpackt und von Nachbarzellen und Makrophagen aufgenommen. Zusätzlich werden sie auch an den Blutkreislauf abgegeben. Dies geschieht in größerem Maße bei gesteigerter Apoptoserate. Eine Schädigung der DNA initiiert den intrinsischen Weg. Der Zellzyklus wird durch p53 arretiert, damit die Läsion repariert werden kann. Eine erfolglose Reparatur führt zur Ausschüttung verschiedener Proteine wie Bax, welche Cytochrom C aus den Mitochondrien freisetzen und Caspase 9 im Apoptosom aktivieren. Über die Aktivierung von Caspase 8, BID und des Apoptosoms läuft ein sich selbst verstärkender Kreislauf ab. Beide Signalwege sind an dieser Stelle miteinander verzahnt. Mit der Freisetzung des apoptosis inducing factors (AIF) aus den Mitochondrien existiert ein zusätzlicher Mechanismus der Apoptosesignale. Verschiedene Moleküle, wie Bcl-2 oder inhibitors of apoptosis (IAPs) wirken hemmend und regulatorisch auf die ablaufenden Prozesse der Apoptose. Sie sind mit folgenden Linien abgebildet (\dashv).

Der apoptotische Zelltod wird jedoch nicht nur bei Zellschädigung, sondern auch beim Fehlen von Wachstumsfaktoren und bei inadäquater Wachstumsstimulation ausgelöst [Raff 1992, Grossmann 2002]. Die Apoptose ist somit auch ein biologischer Sicherungsprozeß, durch den Zellen mit dereguliertem Wachstum eliminiert werden. Dadurch wird auch die Tumorentstehung verhindert. Dies erklärt, warum im Rahmen der Krebsentstehung mehrere Gendefekte, welche die Regulation der Zellteilung und Apoptose betreffen, zusammentreffen müssen.

2.1.5 Verfahren zum Nachweis der Apoptose

Zur qualitativen Beschreibung und quantitativen Erfassung des programmierten Zelltods können zahlreiche Methoden eingesetzt werden. Sie setzen an verschiedenen Stellen des Zelltodgeschehens an und sind in ihrer Sensitivität und Spezifität deutlich unterschiedlich. Grundsätzlich kann der Zelltod direkt an der Zelle oder indirekt über freigesetzte Substanzen in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.

Apoptotische Zellen können am besten anhand ihres charakteristischen Erscheinungsbildes in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung erkannt werden. Allerdings können sie verwechselt werden mit Zellen mit kondensiertem Chromatin, wie etwa kleine Lymphozyten oder kleine Zellfragmente [Mesner 1997]. Morphologische Details apoptotischer Zellen sind allerdings erst im Elektronenmikroskop sichtbar.

Die Apoptose lässt sich biochemisch durch verschiedene Methoden nachweisen. Dazu zählt die Bindung von fluoreszenzmarkiertem Annexin V an Phosphatidylserin an der Zelloberfläche [Mesner 1997] und die Darstellung der durch Caspasen gespaltenen DNA mittels Einbau von markierten Nukleotiden, sogenannte TUNEL-Reaktion (Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) [Gorczyca 1993, Ben-Sasson 1995]. Auch die Aktivität von Enzymen und Proteasen oder der Nachweis von charakteristischen DNA-Fragmenten, wie Nukleosomen, gelten als Nachweis der Apoptose [Mesner 1997].

Der Zelltod kann auch in flüssigen Medien nachgewiesen werden. Dazu eignen

sich unter anderem Serum, Plasma, Urin, Aszites, Pleuraflüssigkeit und Liquor. Der Test CYFRA 21-1, der Fragmente des Cytokeratins 19 mittels zweier monoklonaler Antikörper detektiert, kann die Menge freigesetzter Bestandteile des Zytoskeletts anzeigen. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Freisetzung von CYFRA 21-1 und der Apoptoserate [Sheard 2002]. Obligat intrazelluläre Enzyme, wie die Laktatdehydrogenase (LDH) und ihre Isoenzyme, können zur Differenzierung und Lokalisierung eines Zell- oder Gewebeschadens herangezogen werden. Auch direkt am Zelltodprozess beteiligte Enzyme wie die Caspasen und deren Spaltprodukte lassen sich in der Blutbahn nachweisen. Erhöhte Konzentrationen von Nukleosomen im Serum oder Plasma deuten auf eine Aktivierung von Caspase-abhängigen Endonukleasen hin. Nach einer Studie von Jahr et al. lassen sich durch den Grad der DNA-Fragmentierung verschiedene Zelltodmodalitäten unterscheiden. Kleine DNA-Fragmente wie Mono- und Oligonukleosomen sprechen für Apoptose mit hochgradiger, spezifischer Nukleasenaktivierung. Hochmolekulare Fragmente deuten eher auf einen nekrotischen Zelltod mit eingeschränkter und unspezifischer Nukleasenaktivierung hin [Jahr 2001].

Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich apoptotische Zellen auch mittels bildgebender Verfahren nachweisen lassen. Dazu wurden spezielle supramagnetische Eisenoxid-Nanopartikel entwickelt, die als Kontrastmittel in der Kernspintomographie fungieren. Diese Partikel binden an apoptotische Zellen. Tumortragende Mäuse wurden mit Zytostatika behandelt und erhielten anschließend das Kontrastmittel. Auf diese Weise konnte mittels MRT das Ausmaß der Apoptose sichtbar gemacht werden [Zhao 2001]. Weitere Untersuchungen wurden mit radioaktiv markiertem Annexin V durchgeführt, welches an apoptotische Zellen bindet. In klinischen Studien wurden dabei Ausmaß und Schwere von Herzinfarkten sowie Abstossungsreaktionen nach Herztransplantation kontrolliert [Hofstra 2000, Narula 2001, Blankenberg 2004].

2.2 Nukleosomen

2.2.1 Struktur

Würde die DNA als lineares Makromolekül vorliegen, hätte sie eine Länge von etwa 1,8 m. Damit sie in den winzigen Zellkern einer Zelle passt, wird sie aufwendig zusammengelagert und aufgerollt, man spricht auch von kondensierter DNA. Im Zellkern eukaryonter Zellen wird die DNA dabei um Histonproteinkomplexe gewickelt. Diese Komplexe besitzen eine oktamere Struktur und werden aus jeweils zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 gebildet. Die Verbindung von DNA und Histonproteinkomplex wird als Nukleosom bezeichnet. Lediglich in Prokaryonten und Mitochondrien liegt die DNA als freie, ringförmige Struktur vor, ohne an Proteine assoziiert zu sein.

Die DNA ist nach folgendem komplexen Prinzip geordnet (s. Abb. 2): die DNA-Doppelhelix ist in sich verdrillt und besitzt einen Querdurchmesser von 2 nm. Rund 1,65 mal windet sich die Doppelhelix um einen Histonproteinkomplex und bildet das Nukleosom mit einem Durchmesser von 11 nm. Diese Kette aus DNA und Histonen ist wiederum in sich verdrillt und wird durch weitere Histone stabilisiert. Es entsteht eine Chromatinfaser, die im Durchmesser rund 30 nm misst. Die Chromatinfaser bildet Schleifen und ist zu einem Supertwist verdrillt. Innerhalb eines Chromosoms ist sie schleifenartig zusammengesetzt und durch Nichthistonproteine stabilisiert (s. Abb. 2).

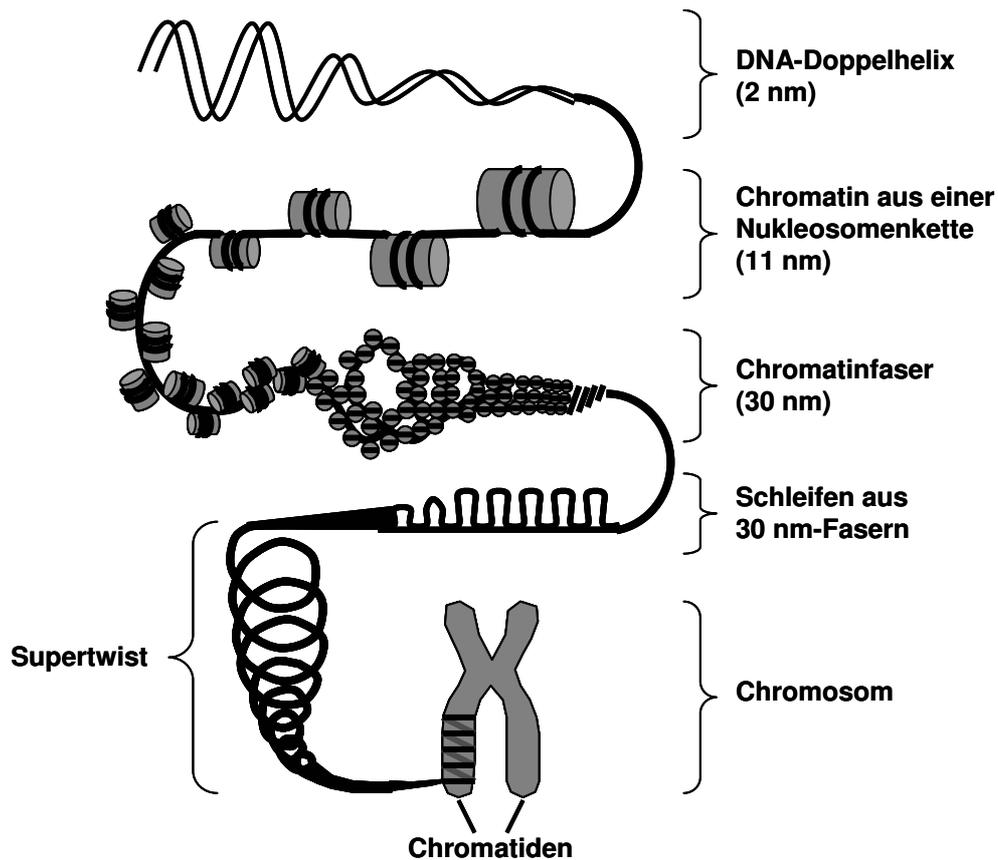


Abb. 2: Aufbau des Chromatins (modifiziert nach [Plattner 1997])

Nukleosomen, die Grundbausteine des Chromatins, bestehen aus basischen Proteinen, sogenannten Histonen, und DNA. Um die flache Außenseite des Histonproteinkomplexes wickeln sich 147 Basenpaare der DNA (s. Abb. 3). Stabilisiert wird diese Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der Histone und Phosphorsäurediester- und Deoxyribosegruppen der DNA [Luger 2003, Luger 2006]. Die scheibenförmigen Nukleosomen besitzen ein Molekulargewicht von rund 206 kDa, wobei etwa jeweils die Hälfte auf die DNA und die Histonproteine entfällt. Benachbarte Nukleosomen werden durch sogenannte Linker-DNA verbunden, die je nach Zelltyp eine Länge zwischen 20 und 80 Basenpaaren besitzt. In Säugetierzellen sind an fast allen diesen Verbindungsstellen Histone vom Typ H1 angeordnet. Sie scheinen unter anderem für Aufbau und Struktur der 30 nm Chromatinfaser verantwortlich zu sein. Zusätzlich ragen aus dem Histonzentrum kürzere Peptidketten mit einer Länge von

15 bis 30 Aminosäuren heraus. Sie stabilisieren ebenfalls die Chromatinfaser über Kontakte zu benachbarten Nukleosomen [Luger 2003, Khorasanizadeh 2004, Luger 2006]. Außerdem können diese Endigungen biochemisch modifiziert werden und damit den Zugriff von Hormonen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren entscheidend beeinflussen [Kornberg 1999, Strahl 2000, Khorasanizadeh 2004].

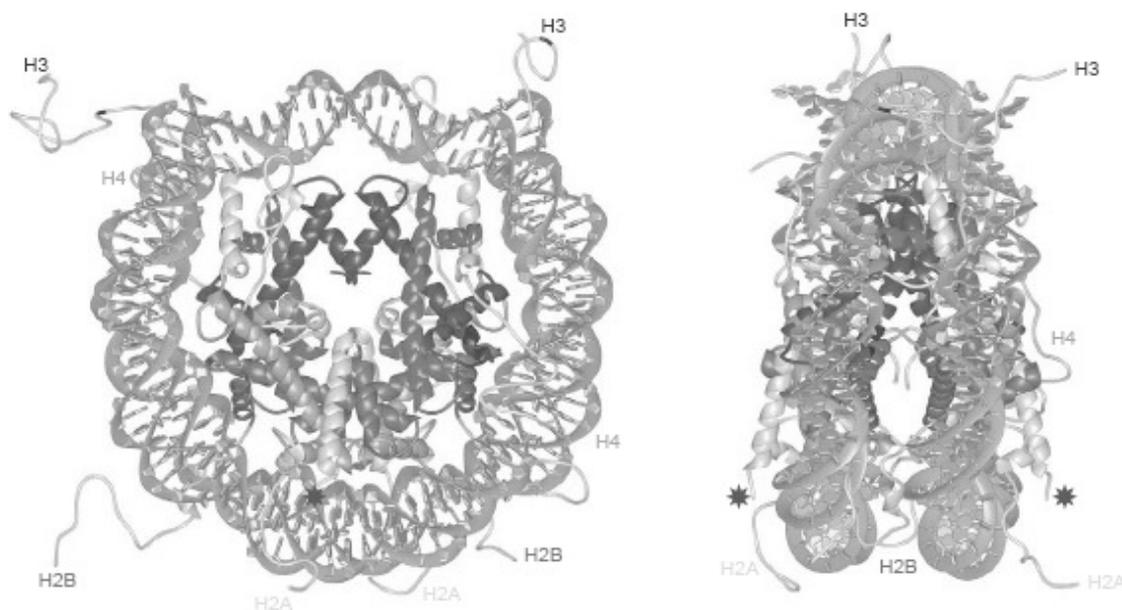


Abb. 3: Räumliche Struktur eines Nukleosoms (aus [Luger 2003])

2.2.2 Funktion

Nukleosomen haben mehrere Funktionen. Eine wichtige Aufgabe der Nukleosomen besteht darin, die DNA zu kondensieren und zu stabilisieren. Im kondensierten Zustand ist die DNA relativ gut gegenüber exogenen und endogenen Noxen geschützt. Allerdings ist die kondensierte DNA weder für Enzyme, Hormone noch Transkriptionsfaktoren zugänglich [Kornberg 1999, Khorasanizadeh 2004].

Um die genetische Information zu replizieren, transkribieren oder reparieren, muss die DNA decondensiert werden. Nukleosomen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die im Nukleosomenkern gelegenen Histone gewähren oder verhindern den

Zugang etwa von Transkriptionsfaktoren zu den DNA-Sequenzen. Allerdings können auch diese Histone durch Modifikation der abstehenden Endstücke beeinflusst werden. In experimentellen Studien wurden verschiedene Molekülgruppen, wie Acetyl-, Methyl-, Phosphoryl-, Ubiquitiny-, Glucosyl- und ADP-Ribosyl-Gruppen an Histone angefügt oder entfernt. Anschließend wurden die Effekte auf die Transkription der DNA beobachtet [Grunstein 1997, Kornberg 1999, Strahl 2000, Khorasanizadeh 2004].

Nukleosomen dürfen aber nicht als starre Strukturen angesehen werden. Vielmehr handelt es sich um dynamische Verbindungen, die ständig umgebaut werden und ihre Position im Zellkern ändern.

Am Beispiel der Acetylierung soll dies veranschaulicht werden. Histonacetyltransferasen übertragen Acetyl-Reste auf Histonendigungen. Diese Acetylierung lässt das Chromatin lokal begrenzt dekondensieren und lockert Verbindungen zwischen und innerhalb von Nukleosomen, d.h. zwischen DNA und Histonproteinen. Das Histonoktamer kann sich von der DNA lösen und wird entlang der Doppelhelix verschoben. Dadurch werden bestimmte Gensequenzen der DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich. Andererseits entfernen Histon-Deacetylasen die angehefteten Acetylreste und unterbinden das Ablesen der genetischen Information [Kornberg 1999, Strahl 2000, Khorasanizadeh 2004]. In den letzten Jahren zeichnet sich ab, dass die Beeinflussung von Histon-Deacetylasen eine vielversprechende Therapieoption bei Tumorerkrankungen darstellen könnte. Diese Histon-Deacetylasen können inhibiert werden, mit dem Ziel aberrierende epigenetische Veränderungen, die mit Tumoren assoziiert sind, rückgängig zu machen [Pandolfi 2001, Baylin 2006]. Erste Phase-II und -III-Studien belegen den Nutzen eines kombinierten Einsatzes von Histon-Deacetylase-Inhibitoren mit herkömmlichen Chemotherapeutika. Bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom, die Gemcitabin und den Histon-Deacetylase-Inhibitor CI-994 erhielten, konnte allerdings weder Gesamtüberleben, Ansprechrate noch progressionsfreies Intervall gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie verbessert werden [Richards 2006].

Die Einflüsse anderer Modifikationen werden teils kontrovers diskutiert. So wird die Ubiquitinierung der Histone in unterschiedlichen Studien sowohl als Induktor [Zhang 2003] als auch Repressor der Transkription angesehen [Shiio 2003].

2.2.3 Freisetzung und Metabolismus

Während der Apoptose wird eine komplexe Kaskade von Caspasen aktiviert. Aktivierte Caspasen zersetzen viele Proteinstrukturen und aktivieren Endonukleasen, welche die im Zellkern befindliche DNA fragmentieren [Enari 1998]. Bisher wurden verschiedene Endonukleasen beschrieben, darunter die kationenabhängige DNase I [Hewish 1973], die kationenunabhängige DNase II [Barry 1993] und einige weitere wie DNase γ [Tanuma 1994]. Ein direkter Zusammenhang zwischen Apoptose und Endonukleasen konnte für die Caspasen-abhängige DNase (CAD) gezeigt werden [Enari 1998]. Caspase 3 aktiviert diese Caspasen-abhängige DNase, welche in den Zellkern lanciert wird und die DNA zunächst in große Bruchstücke von 50 – 300 kbp spaltet. Anschließend werden diese Fragmente durch die DNase in Einheiten von 180 bp und einem Vielfachen davon weiter zerkleinert. Dies entspricht der Größe von Mono- und Oligonukleosomen [Lichtenstein 2001, Fadeel 2005]. Die DNA-Fragmentierung kann auch ohne Vermittlung von Effektorcaspasen durch die Endonuklease G vorgenommen werden. Nach Stimulation des intrinsischen Apoptoseweges gelangt diese DNase von den Mitochondrien in den Zellkern und fragmentiert DNA in die apoptose-typischen Oligo- und Mononukleosomen [van Loo 2001].

Nach Desintegration der Zellmembran werden die Apoptoseprodukte von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert. Allerdings scheint dieses System für physiologische Verhältnisse ausgelegt und in Situationen einer stark gesteigerten Zelltodrate überlastet zu sein. Die Nukleosomen werden somit vermutlich aus apoptotischen Zellen in den extrazellulären Raum freigesetzt und können dann Zugang zum Gefäßsystem finden [Rumore 1990, Jahr 2001, Lichtenstein 2001]. Nach Einsetzen der Apoptose werden Nukleosomen mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 12 Stunden in der Blutbahn nachweisbar [van Nieuwenhuijze 2003].

Bei gesunden Personen kommen niedrige DNA-Konzentrationen im Serum mit

Werten zwischen 10 und 30 ng/ml vor [Sorenson 1994, Anker 2000]. Patienten mit entzündlichen Erkrankungen, wie systemischem Lupus erythematoses, weisen höhere Werte auf [Amoura 1997]. Noch höhere Level an zirkulierender DNA wurden bei Patienten mit malignen Erkrankungen gemessen [Maebo 1990, Fournie 1995, Holdenrieder 2001 (C)].

In der Blutbahn befindliche Nukleosomen werden rasch eliminiert und weisen eine kurze Halbwertszeit auf. Die Leber nimmt dabei einen Großteil der nukleosomalen DNA auf. Eine Tiermodell-Studie zeigte, dass etwa zehn Minuten nach Injektion von Nukleosomen mehr als 70% bereits dort lokalisiert waren. Dagegen sind Niere, Milz, Magen, Darm, Herz und Lunge mit Aufnahmeraten unter einem Prozent für die Beseitigung zirkulierender Nukleosomen kaum von Bedeutung [Gauthier 1996]. Auch wird eine Phagozytose der Nukleosomen durch das Makrophagen-Monozyten-System sowie eine Ausscheidung über die Nieren in liposomaler Form diskutiert [Okada 1999, Lichtenstein 2001]. Im Tiermodell wurde außerdem mit zunehmender Menge injizierter Mononukleosomen eine verlangsamte Eliminationsgeschwindigkeit festgestellt [Gauthier 1996]. Dies deutet darauf hin, dass die Eliminationskapazität für zirkulierende Nukleosomen begrenzt ist.

Im Blutplasma befindlich Endonukleasen bauen ebenfalls Nukleosomen ab. Freie DNA wird dabei schneller zersetzt als an Proteine gebundene DNA [Ng 2002].

Eine Erhöhung der Akute-Phase-Proteine, z.B. während einer Infektion oder Sepsis, kann die Elimination der Nukleosomen aus der Blutbahn verzögern. An die basischen Histonproteine der Nukleosomen lagern sich Akute-Phase-Proteine, z.B. C-reaktives Protein oder Serumamyloid P, an und behindern vermutlich deren hepatische Aufnahme [Burlingame 1996, Du Clos 1996].

2.3 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom gliedert sich histologisch in exokrine und endokrine Karzinome. Die endokrinen Karzinome des Pankreas umfassen Insulinome, Vipome, Glukagenome, PPome und Somatostatinome. Aufgrund ihres seltenen Vorkommens

werden sie im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Über 95% aller Pankreaskarzinome entstehen im exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse. Auch alle in dieser Arbeit berücksichtigten Patienten wiesen ein exokrines Pankreaskarzinom auf. Deshalb soll in den folgenden Kapiteln auf diesen histologischen Subtyp eingegangen werden.

2.3.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Seit 1930 hat sich die Inzidenz des Pankreaskarzinoms in den westlichen Industrienationen nahezu verdoppelt. In der Europäischen Union werden etwa 30000 Neuerkrankungen pro Jahr diagnostiziert [Heinemann 2001]. Dies entspricht ungefähr 10 Fällen pro Jahr auf 100000 Einwohner, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der 7. Dekade. Zwei Drittel aller Patienten erkranken nach dem 60. Lebensjahr. Der Tumor führt bei fast 100% der Erkrankten zur Metastasenbildung. Rund 95% der Erkrankten sterben innerhalb von fünf Jahren. In der Häufigkeit der Krebstodesursachen steht das Pankreaskarzinom in den USA mittlerweile an 4. Stelle [Li 2004, Jemal 2006].

Über die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist nur wenig bekannt. Zigarettenrauchen wird am häufigsten als Risikofaktor für das Auftreten des Tumors genannt. Starke Raucher sind etwa drei Mal so häufig betroffen wie Nichtraucher [Lowenfels 2006]. Eine große Fallstudie fand auch eine erhöhte Inzidenz von Pankreaskarzinomen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis [Lowenfels 1993]. Für Alkoholabusus, fett- und fleischreiche Ernährung, Kaffeekonsum und Cholelithiasis ist ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms nicht gesichert [Heinemann 2001, Lowenfels 2006]. Ein mehrjährig bestehender Diabetes mellitus erhöht allerdings das Karzinomrisiko signifikant [Adami 1991]. Beim seltenen familiären Pankreaskarzinom finden sich Keimbahnmutationen, zum Beispiel in den p16-, k-ras- oder BRCA-2-Genen [Islam 2001, Li 2004].

Man geht heute davon aus, dass normales Pankreasgewebe über eine Hyperplasie und Dysplasie zum duktalem Pankreaskarzinom entartet. Dieser pathogenetische Ablauf wird durch das gleichzeitige Auftreten verschiedener Genmutationen

verursacht. Onkogene wie K-ras werden aktiviert und Tumorsuppressor-Gene wie p53, p16, BRCA-2 werden inaktiviert [Islam 2001].

Bei rund 70% der Patienten ist das Pankreaskarzinom im Kopf der Bauchspeicheldrüse lokalisiert. Histologisch handelt es sich zu über 80% um ein Adeno-Karzinom. Das häufigere duktale Karzinom geht von den kleinen Drüsengängen aus, das seltenere azinäre Karzinom vom Epithel der Drüsenläppchen [Heinemann 2001].

2.3.2 Klinik und Diagnostik

Das große Problem bei der Diagnose des Pankreaskarzinoms ist das Fehlen von Frühsymptomen. Die Symptome sind ähnlich unspezifisch wie bei der chronischen Pankreatitis: Appetitverlust, unspezifische Oberbauchbeschwerden, Übelkeit, Oberbauchschmerzen und Verdauungsschwierigkeiten. Diese Symptome führen häufig zu einem Gewichtsverlust bei den Patienten. Ein Verschlussikterus kann ein Frühsymptom sein, jedoch nur, wenn das Pankreaskarzinom nahe der Papille oder des Ductus choledochus liegt. Sonst findet es sich erst im fortgeschrittenen Stadium des Pankreaskarzinoms und geht typischerweise einher mit dunklem Urin, acholischem Stuhl, Steatorrhoe und Juckreiz [Harrison 2005]. Eine prallelastisch tastbare, schmerzlose Gallenblase findet sich bei etwa einem Drittel der Patienten. Dieser als Courvoisier-Zeichen bekannte Befund resultiert aus dem tumorbedingten Verschluss des Ductus choledochus [Heinemann 2001]. Seltener finden sich Thrombosen, Thrombophlebitiden, eine Thrombophlebitis migrans oder Splenomegalie, infolge einer Milzvenenthrombose. Unerklärliche rezidivierende Thrombosen sollten immer auch an Karzinome des Pankreas oder des Verdauungstrakts denken lassen [Harrison 2005].

Wegen fehlender oder nur unspezifischer Frühsymptome und mangels eines effizienten und wenig belastenden Screening-Verfahrens wird das Pankreaskarzinom meist erst spät diagnostiziert. Auch bei symptomatischen Patienten und nachweisbaren Tumoren stößt die Diagnostik häufig an Grenzen hinsichtlich Artdiagnose und lokaler Resektabilität. Neben Sonographie, Endosonographie,

endoskopisch-retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP) und Computertomographie (CT) werden zunehmend auch Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt. Die Magnetresonanztomographie könnte vor allem bei der Erkennung kleinerer Tumoren vorteilhaft sein [Heinemann 2001]. Eine hohe Sensitivität bezüglich der Tumordetektion scheint die Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) zu haben. Sie kann möglicherweise die Differentialdiagnose zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom erleichtern. Allerdings fehlen zu beiden Verfahren große randomisierte Studien [Heinemann 2001]. Derzeit gilt die intravenös und oral kontrastmittelverstärkte Spiral-Computertomographie als Goldstandard zum Nachweis und insbesondere zum Staging des Pankreaskarzinoms [Heinemann 2001].

Unter den serologischen onkologischen Biomarkern steht mit dem Cancer Antigen 19-9 (CA 19-9) ein für das Pankreaskarzinom sehr sensitiver Marker zur Verfügung. Ausgehend von den individuellen tumorfreien Basiswerten der Patienten wird CA 19-9 in ca. 95% der Fälle durch das Pankreaskarzinom gesteigert freigesetzt. Problem dieses Markers ist allerdings die geringe Spezifität bei den differentialdiagnostisch relevanten benignen Oberbaucherkrankungen, insbesondere derjenigen, die mit einer Cholestase einhergehen. Daher ist CA 19-9 als Screeningmarker ungeeignet und in der Primärdiagnostik des Pankreaskarzinoms erst bei höheren Wertlagen > 500 U/ml und Vorliegen einer Raumforderung des Pankreas hilfreich. CA 19-9 wird vor allem als Verlaufsparemeter für die therapeutische Effizienz und zur Prognoseabschätzung herangezogen [Micke 2003, Stemmler 2003, Boeck 2006].

2.3.3 Therapie und Prognose

Die einzige Erfolg versprechende Behandlung stellt die vollständige Resektion des Pankreastumors dar. Leider ist eine kurative Operation nur bei 10 bis 15% der Patienten mit Pankreaskarzinom möglich [Harrison 2005]. Das klassische Resektionsverfahren für das Pankreaskopfkarzinom stellt die partielle Duodenopankreatektomie dar, nach ihrem Erstbeschreiber auch Whipple-Operation

genannt. Es handelt sich um eine Rechtsresektion des Pankreas, bei der das gesamte Duodenum, die Gallenblase mit Ductus choledochus, regionäre Lymphknoten und ein Teil des Magens reseziert werden. Bei der anschließenden Rekonstruktion werden der Rest des Pankreas, der Ductus hepaticus communis und das Jejunum als Billroth-II oder Y-Roux mit dem Restmagen readaptiert. Befindet sich der Tumor im Pankreasschwanz, so kann eine Linksresektion vorgenommen werden, bei der Korpus und Schwanz entfernt werden. Eine komplette Resektion des Pankreas und der Milz führt zu wesentlich schwereren Nebenwirkungen, aber zu keiner besseren Prognose [Roder 1992, Roder 1996].

Eine intraoperative Radiotherapie (IORT) senkt die Häufigkeit von Lokalrezidiven, verbessert aber nicht signifikant die Überlebensrate [Calvo 1992, Zerbi 1994]. Außerhalb von Studien hat sich die intraoperative Bestrahlung in der Behandlung des resektablen Pankreaskarzinoms daher nicht etabliert.

Eine postoperative Radiochemotherapie verbesserte in einer randomisierten Studie signifikant die Überlebensdauer [Whittington 1991]. Weitere Untersuchungen bestätigten den günstigen Einfluß multimodaler Therapien auf die lokale Tumorkontrolle, ohne dass sich ein signifikanter Einfluß auf die Überlebenszeit ergab.

Lokal fortgeschrittene, primär nicht-resektable Pankreaskarzinome werden mit einer primär palliativen oder präoperativen Radiochemotherapie behandelt. Mit Hilfe einer präoperativen Radiochemotherapie kann versucht werden, ein Downstaging und damit eine Resektabilität des Tumors zu erreichen. Mehrere Studien zeigten allerdings, dass sich die Überlebensrate durch die präoperative Radiochemotherapie und anschließende Operation nur geringfügig verbesserte [GITSG 1986]. Lange Zeit wurde eine Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil favorisiert. In neueren klinischen Studien konnte eine verbesserte Effizienz durch den Einsatz von Gemcitabin in Kombination mit 5-Fluoruracil oder Cisplatin erreicht werden [Wilkowski 2000, Heinemann 2002 (A), Wilkowski 2004, Wilkowski 2006, Heinemann 2006]. Da etablierte Therapieschemata nicht vorliegen, wird empfohlen, die Patienten in klinischen Studien zu behandeln.

Bei bereits metastasierten Pankreaskarzinomen kommt meist nur eine primär palliative Chemotherapie in Frage. Bisher ist lediglich die Gemcitabin-Monotherapie

etabliert. In klinischen Studien werden gegenwärtig Kombinationstherapien aus Gemcitabin und Cisplatin, 5-Fluoruracil, Docetaxel, Irinotecan, Oxaliplatin oder Capecetabine getestet [Heinemann 2002 (A), Heinemann 2002 (B)]. Eine aktuelle Phase-III-Studie zeigt einen geringen Vorteil des medianen Überlebens und progressionsfreien Intervalls bei der Kombinationstherapie aus Cisplatin und Gemcitabin [Heinemann 2006]. Die Monotherapie soll vor allem bei älteren Patienten mit eingeschränktem Allgemeinzustand eingesetzt werden, da sie weniger toxisch und daher besser verträglich als die Kombinationstherapien ist [Heinemann 2002 (A), Heinemann 2002 (B), Wilkowski 2004, Wilkowski 2006]. Eine Bestrahlung erfolgt bei diesen Patienten häufig zur Schmerztherapie.

Palliative operative Eingriffe sind nur in Ausnahmefällen indiziert. So sollte ein tumorbedingter Verschluss der Gallenwege, der nicht über eine Stentimplantation therapierbar ist, mittels einer biliodigestiven Anastomose (Choledochojejunostomie) versorgt werden. Zur Beseitigung einer Magenausgangsstenose bei Duodenalkompression ist eine Gastroenterostomie angezeigt.

Neueren Untersuchungen zufolge könnten sich zukünftige Therapieregime aus Zytostatika und Proteasomeninhibitoren zusammensetzen. Proteasomeninhibitoren induzieren Apoptose in vielen Tumorzellen. Der zellpermeable Proteasomeninhibitor MG 132 reduzierte deutlich das Wachstum einer Pankreaszelllinie *in vitro* [Wente 2005].

Die Prognose des Pankreaskarzinoms ist trotz verbesserter therapeutischer Optionen infaust. Lediglich in 15 - 20% der Fälle ist eine Resektion des Tumors möglich. Nach Resektion des Tumors liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei knapp 20%, nach palliativer Therapie bei fast 0% [Li 2004]. Nur nach Resektion sehr kleiner Tumoren ohne Lymphknotenbefall ($T_1N_0M_0$) leben noch rund 30% der Patienten nach fünf Jahren [Heinemann 2001].

2.4 Kolorektales Karzinom

2.4.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von 30 Neuerkrankungen auf 100000 Einwohner pro Jahr das zweithäufigste Karzinom bei Männern und Frauen. An erster Stelle steht beim Mann das Bronchial-, bei der Frau das Mammakarzinom. Rund 90% der kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf [Harrison 2005]. In den letzten Jahrzehnten konnte in der Bundesrepublik Deutschland die Sterblichkeit des kolorektalen Karzinoms bei Männern von 14,1 auf 10,6 und bei Frauen von 13,8 auf 10,3 je 100000 Einwohner gesenkt werden [Schalhorn 2001].

Bei der Ätiologie der kolorektalen Karzinome scheinen Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen. Allerdings konnte bis heute nicht bewiesen werden, dass eine direkte Kausalität zwischen ballaststoffarmer, protein- und fettreicher Ernährung und einem erhöhten Karzinomrisiko besteht [Harrison 2005]. Möglicherweise haben langjähriger Tabakkonsum und Alkoholgenuß einen negativen Effekt, während eine schnelle Stuhlpassage, Acetylsalicylsäure, Ascorbinsäure und Folsäure eine protektive Wirkung haben könnten [Harrison 2005]. Zu den Risikogruppen zählen Patienten

- mit kolorektalen Adenomen,
- mit kolorektalen Karzinomen bei Verwandten 1. Grades,
- mit Colitis ulcerosa und seltener mit M. Crohn,
- mit Lynch-Syndrom (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)
- und mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP).

Grundsätzlich lassen sich familiäre, hereditäre (etwa 15%) von sporadischen (etwa 85%) Karzinomen des Dickdarms unterscheiden. Die familiäre und hereditäre Karzinomentstehung in Form des FAP- und des HNPCC-Syndroms stellen dabei Modelle für die Karzinogenese auch der sporadischen kolorektalen Karzinome dar.

Kolorektale Karzinome entstehen aus Epitheldysplasien, wobei mehr als 95% dieser Dysplasien in Form von Adenomen auftreten. Die Tumorprogression vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom dauert rund fünf Jahre und wird

durch eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen verursacht. Dabei werden Onkogene aktiviert und Tumorsuppressor-Gene inaktiviert. Ab einer kritischen Gesamtzahl genetischer Veränderungen kann das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen [Harrison 2005].

Am häufigsten sind kolorektale Karzinome im Rektum (60%) lokalisiert, seltener im Sigma (20%), Colon ascendens (10%) und im restlichen Kolon (10%). Histologisch handelt es sich in den meisten Fällen um ein Adeno-Karzinom [Schalhorn 2001].

2.4.2 Klinik und Diagnostik

Kolorektale Karzinome können relativ lange symptomlos bleiben. Mögliche Frühsymptome sind Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, Obstipation, zum Teil abwechselnd mit Durchfall, Tenesmen, Blutabgängen, Leistungsminderung und Müdigkeit [Harrison 2005]. Spätsymptome stellen Anämie, Schmerzen oder ein Ileus dar. Blutbeimengungen im Stuhl oder ein positiver Hämokult-Test indizieren immer die diagnostische Abklärung des gesamten Dickdarms, auch bei bekannten Hämorrhoiden [Schalhorn 2001].

Neben der Anamnese stellt die digital-rektale Untersuchung eine wichtige und jedem Arzt verfügbare diagnostische Maßnahme dar. Etwa die Hälfte der Rektumkarzinome liegt im tastbaren Bereich. Die genaue Lage und Höhe rektaler Malignome wird mit einem starren Rektoskop festgestellt. Der Abstand des Tumors zur Analmuskulatur entscheidet, ob eine kontinenzhaltende Operation möglich ist. Grundsätzlich sollte anschließend der gesamte Dickdarm gespiegelt werden, da in 2 - 5% multiple Tumoren vorliegen. Wenn eine Koloskopie nicht möglich ist, ist die axiale Computertomographie mit Dreifach-Kontrast (oral, intravenös und rektal) indiziert. Mit Hilfe der Endosonographie können Infiltrationstiefe und die lokale Operabilität beurteilt werden.

Zum Staging ist eine Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei Ebenen und eine abdominelle Sonographie erforderlich. Zusätzlich können mittels Computertomo-

graphie unklare Befunde und paraaortale Lymphknotenstationen abgeklärt werden.

Das karzinoembryonale Antigen (CEA) und CA 19-9 eignen sich wegen zu geringer Sensitivität und zu niedriger Spezifität nicht als Screening- oder Diagnostik-Marker [Lamerz 2004]. Ist ein kolorektales Karzinom aber einmal diagnostiziert, können diese biologischen Marker als Verlaufparameter herangezogen werden, um therapeutische Effizienz und Prognose abzuschätzen und insbesondere frühzeitig Lokalrezidive und Fernmetastasen zu entdecken. [Reiter 2000, Duffy 2003].

2.4.3 Therapie und Prognose

Die Totalresektion eines kolorektalen Malignoms ist die optimale Behandlung. Etwa 85% der rektalen Karzinome sind im oberen oder mittleren Drittel lokalisiert. Dort kann meist eine sphinktererhaltende anteriore bzw. tiefe anteriore Rektumresektion vorgenommen werden. Befindet sich der Tumor im unteren Drittel des Rektums, kann häufig nicht mehr kontinenserhaltend operiert werden. In solchen Fällen ist eine abdominoperineale Rektumexstirpation mit Anlage eines endständigen Anus praeter sigmoidalis indiziert. Bei Kolonkarzinomen werden der tumortragende Dickdarmabschnitt mit seinem Mesenterium und die regionalen Lymphabflußgebiete en-bloc reseziert. Je nach Tumorlokalisation bedeutet dies eine Hemikolektomie oder eine Kolon-Transversumresektion. Die Erfahrung und Sorgfalt des Operateurs beeinflusst dabei die Prognose erheblich. Von Spezialisten operierte Patienten weisen stadienabhängig bis zu 30% bessere 5-Jahresüberlebensraten auf als Patienten, die sich bei „Nichtspezialisten“ den Tumor entfernen ließen [Myerson 1995].

Im Anschluß an eine Tumorsektion wird je nach Tumorstadium eine postoperative Chemo- oder Radiochemotherapie empfohlen. Im UICC-Stadium III, also bei regionalem Lymphknotenbefall, konnte durch eine postoperative Therapie die Prognose um 10% verbessert werden [GITSG 1992]. Randomisierte Studien zur Behandlung des Rektumkarzinoms zeigten für die Kombination aus Operation und postoperativer Radiochemotherapie signifikant höhere Überlebensraten als nach Resektion oder als nach Resektion und postoperativer Bestrahlung. Aufgrund dieser Ergebnisse empfahl die Consensus Development Conference des National Institute

of Health 1990, die postoperative Radiochemotherapie für das Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III [NIH 1990]. Allerdings erwies sich bei R0-resezierten lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3, T4) oder bei Lymphknotenbefall die alleinige Chemotherapie gegenüber der zusätzlichen Bestrahlung als gleichwertig hinsichtlich der overall recurrence [Wolmark 2000]. Es zeigte sich lediglich ein Unterschied in der Lokalrezidivrate, das Überleben änderte sich dadurch nicht.

Eine intraoperative Radiotherapie wurde bisher nur in speziellen Zentren bei lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen angewandt. Diese Methode bietet den Vorteil, eine hohe Strahlendosis unter Umgehung strahlenempfindlicher Strukturen und Organe zu applizieren [Eble 1994]. Aufgrund fehlender klinischer Studien ist der Stellenwert dieser Therapie unklar und nicht als Standardverfahren anzusehen [Schalhorn 2001].

Eine präoperative Radiochemotherapie hat das Ziel, durch das sogenannte Downstaging bzw. Downsizing die Bedingungen für eine kurative Resektion zu verbessern [Meade 1995]. Zusätzlich hofft man dadurch Mikrometastasen in den umgebenden Geweben und Lymphknoten zu eliminieren, die während eines chirurgischen Eingriffs ausgeschwemmt werden könnten. Das Ansprechen der Therapie kann nach einer prospektiven Pilotstudie durch FDG-Positronen-Emissionstomographien kontrolliert werden [Guillem 2000]. Eine alleinige präoperative Strahlentherapie ist sinnvoll, wenn eine kombinierte Radiochemotherapie nicht möglich ist. In verschiedenen randomisierten Studien wurden eine geringere Rate an Lokalrezidiven und ein deutlicher Überlebensgewinn erreicht [Coucke 1995]. Eine Studie verglich die präoperative mit der postoperativen Radiochemotherapie. Dabei zeigten die präoperativ behandelten Patienten ein signifikant längeres Überleben [Myerson 1995].

Die Prognose steht in engem Zusammenhang mit dem Tumorstadium. Die 5-Jahresüberlebensrate nimmt vom UICC-Stadium I mit rund 75% bis zum Stadium IV, das nur etwa 5% länger als fünf Jahre überleben, stark ab. Im Durchschnitt lebt etwa die Hälfte der Patienten noch nach fünf Jahren [Harrison 2005].

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten

Diese Doktorarbeit fand im Rahmen einer prospektiven Studie statt (s. Ethikantrag im Anhang, Kapitel 8.2). Die Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilian-Universität München hat den Antrag zu dieser Studie bewertet und genehmigt. Vor der ersten Blutentnahme wurden alle Patienten über die Studie von mir persönlich umfassend informiert und aufgeklärt. Aufgenommen wurden ausschließlich erwachsene Personen mit vollständiger Aufklärungs- und Zustimmungsfähigkeit. Von jedem dieser Patienten musste eine schriftliche Erklärung der informierten Zustimmung vorliegen. Alle in die Studie aufgenommenen Patienten befanden sich auf den drei Stationen H22, K21 und K22 der Strahlentherapie und Radioonkologie im Klinikum Großhadern. Während der gesamten Behandlungsdauer wurden diese Patienten intensiv durch mich betreut. Sämtliche Blutabnahmen inklusive der Routineabnahmen zu den in der Studie definierten Zeitpunkten erfolgten über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren durch mich persönlich. Diese intensive Begleitung der Patienten führte zu einer ausgezeichneten Compliance fast aller Patienten.

Im Zeitraum von Dezember 2001 bis Februar 2003 wurden 57 Patienten, (15 Frauen (W) und 42 Männer (M)) mit der Diagnose Pankreas-Karzinom (28 Patienten), Gallengang- bzw. Gallenwegskarzinom (4 Patienten), Rektum-Karzinom (24 Patienten) oder Sigma-Karzinom (1 Patient) in die Studie aufgenommen. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt des Therapiebeginns betrug im Median 65 Jahre. Die Altersverteilung lag in einem Bereich von 45 bis 81 Jahren.

Alle 57 Patienten erhielten eine kombinierte Radiochemotherapie an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Klinikum Großhadern, München.

3.1.1 Patienten mit Pankreaskarzinomen

Die Einteilung der Patienten mit einem Karzinom der Bauchspeicheldrüse oder der

Gallenwege erfolgte stadiengerecht nach den UICC-Kriterien (Union Internationale Contre le Cancer) von 1997 (s. Tab. 1). Zu Beginn der Behandlung befanden sich je ein Patient im Stadium I und II. Zehn Patienten waren im Stadium III nach der UICC-Klassifikation, hatten also einen auf die Bauchspeicheldrüse begrenzten oder in die unmittelbar benachbarten Strukturen infiltrierenden Tumor, zum Teil mit regionalem Lymphknotenbefall. Das Stadium IVA mit lokal fortgeschrittenem Tumorbefall wiesen 19 Patienten auf. Bei einem Patienten war keine Stadienklassifizierung möglich (s. Tab. 2).

Bei allen zehn post-operativ behandelten Patienten konnte anhand der Histologie ein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden. In der Gruppe der primär behandelten Patienten wurden elf Patienten als nodal positiv und sieben Patienten als nodal negativ bewertet. Bei vier Patienten konnte der Lymphknotenstatus nicht sicher klassifiziert werden.

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Metastasen
Stadium 0	Tis	N 0	M 0
Stadium I	T 1-2	N 0	M 0
Stadium II	T 3	N 0	M 0
Stadium III	T 1-3	N 1	M 0
Stadium IVA	T 4	jedes N	M 0
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M 1

Tab. 1: Einteilung von Patienten mit Pankreaskarzinomen bezogen auf das TNM-Stadium nach den UICC-Richtlinien von 1997.

Alle Karzinome des Pankreas oder der Gallengänge bzw. -blase wurden histologisch bestätigt (n = 32). Das histologische Präparat wurde entweder aus dem Operationsresektat oder mittels einer Punktion gewonnen. Histologisch konnte ein

duktales Adeno-CA bei 28 Patienten gesichert werden. Zwei Patienten wiesen ein muzinöses Adeno-CA und bei zwei weiteren Patienten konnte lediglich die Diagnose eines Karzinoms ohne weitere Klassifizierung gestellt werden.

Das histopathologische Grading wurde bei 28 Patienten erfasst. Davon hatten zwei Patienten ein gut differenziertes Adeno-CA (G1), 13 Patienten ein mäßig differenziertes Adeno-CA (G2) und bei 13 Patienten konnte ein schlecht differenziertes Adeno-CA (G3) nachgewiesen werden.

Das Patientenkollektiv wurde in drei Behandlungsgruppen unterteilt:

- Postoperative Radiochemotherapie (n = 10)
- Primäre Radiochemotherapie (n = 21)
- Rezidiv-Radiochemotherapie (n = 1)

Initial wurden zehn Patienten als operabel eingeschätzt. Bei diesen Patienten wurde der Tumor reseziert und anschließend eine additive postoperative Radiochemotherapie durchgeführt. Eine Whipple'sche Operation erhielten sechs Patienten (alle mit R1-Resektion und alle mit Lymphknotenbefall). Bei zwei Patienten mit Tumorsitz im Pankreaskorpus oder –schwanzbereich wurde eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie durchgeführt (beide mit R1-Resektion und Lymphknoten positiv). Zwei Patienten mit einem Karzinom der Gallenwege wurden mit einer Hepatojejunostomie und erweiterten Cholezystektomie behandelt (beide R1-Resektion und N1). Alle zehn resezierten Patienten wurden anschließend mit einer post-operativen Kombination aus Bestrahlung und simultaner Chemogabe therapiert. Ein lokal fortgeschrittenes primär inoperables Karzinom lag bei 21 Patienten vor und diese Patientengruppe erhielt eine primäre Radiochemotherapie. Ein Patient mit einem ausschließlich lokalen Rezidiv des Pankreastumors wurde mit einer Rezidiv-Radiochemotherapie behandelt (s. Tab. 2). Für die weitere Auswertung wurde der Patient mit einem Tumorrezidiv aufgrund des gleichen Therapieansatzes zu der Gruppe der primär behandelten Patienten gezählt.

	Post-operative RCT	Primäre/Rezidiv-RCT	Gesamt
Patientenzahl	10	22	32
Geschlecht w / m	1 / 9	9 / 13	10 / 22
Alter Median (Jahre)	65	65	65
Altersbereich (Jahre)	44 – 80	52 – 76	45 – 81
UICC I – II	1	1	2
UICC III	7	3	10
UICC IVA	2	17	19
Keine Klassifikation	0	1	1
T 2	2	0	2
T 3	5	4	9
T 4	3	17	20
Keine Klassifikation	0	1	1
N 0	0	7	7
N 1	10	11	21
Keine Klassifikation	0	4	4
G 1	1	1	2
G 2	5	8	13
G 3	4	9	13
Keine Klassifikation	0	4	4

Tab. 2: Alter der behandelten Patienten mit Pankreaskarzinom, Geschlechtsverteilung, Krankheitsstadium nach UICC-Klassifikation, Lymphknotenstatus und histopathologischem Grading (nicht bei allen Patienten erfaßt). Unterteilung des Patientenkollektivs nach Therapieart in post-operative Radiochemotherapie (RCT) und primäre bzw. Rezidiv-Radiochemotherapie (RCT).

3.1.2 Patienten mit kolorektalem Karzinom

Die Einteilung der Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Tumorstadien erfolgte anhand der DUKES bzw. UICC-Kriterien (s. Tab. 3). Bei der Diagnose befand sich ein Patient im Stadium A und 11 Patienten waren im Stadium B nach der DUKES-Klassifikation, hatten also einen auf den Mastdarm begrenzten oder in die unmittelbar benachbarten Strukturen infiltrierenden Tumor ohne regionalen Lymphknotenbefall. Das Stadium C mit lokalem Lymphknotenbefall von 1-3 Lymphknoten (N1) oder mehr als 4 Lymphknoten (N2) wiesen 10 Patienten auf. Bei drei Patienten war zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Fernmetastasierung eingetreten (Stadium D).

Von allen postoperativ behandelten Patienten wurde bei einem Patienten ein Lymphknotenbefall nachgewiesen, bei drei Patienten bestand keine Lymphknotenbeteiligung. Bei den Patienten der neoadjuvanten und Rezidiv-Gruppe wurden neun als nodal negativ und 12 als nodal positiv eingestuft.

DUKES -Stadium	UICC -Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Metastasen
Stadium A	I	T 1-2	N 0	M 0
Stadium B	II	T 3-4	N 0	M 0
Stadium C	III	jedes T	N 1-2	M 0
Stadium D	IV	jedes T	jedes N	M 1

Tab. 3: Einteilung von Patienten mit Rektumkarzinom bezogen auf das TNM-Stadium nach den DUKES- und UICC-Richtlinien.

Ein histologischer Nachweis eines Rektum- oder Sigmakarzinoms liegt bei allen 25 Patienten vor. Die Histologie wurde entweder aus dem Operationspräparat oder einer

Punktion gewonnen. Histologisch konnte bei allen Patienten ein Adeno-CA gesichert werden.

Das histopathologische Grading wurde bei 23 der 25 Patienten erfasst. Davon konnte bei 19 Patienten ein mäßig differenziertes Adeno-CA (G2) und bei vier Patienten ein schlecht differenziertes Adeno-CA (G3) nachgewiesen werden. Bei zwei Patienten waren keine Angaben zum Grading möglich.

Das Patientenkollektiv wurde in drei Behandlungsgruppen unterteilt:

- Adjuvante Radiochemotherapie (n = 4)
- Neoadjuvante Radiochemotherapie (n = 13)
- Rezidiv-Radiochemotherapie (n = 8)

Bei vier Patienten lag ein operables Tumorstadium vor. Bei diesen Patienten wurde der Tumor reseziert und anschließend eine adjuvante Radiochemotherapie durchgeführt. Drei Patienten erhielten eine tiefe anteriore Rektumresektion, die alle histopathologisch als R0-Resektionen eingestuft wurden. Bei einem Patienten mit Tumorsitz im rektosigmoidalen Übergangsbereich wurde eine Sigma- und Rektumresektion durchgeführt. Auch in diesem Fall handelte es sich um eine R0-Resektion. Alle vier resezierten Patienten wurden anschließend mit einer adjuvanten Kombination aus Bestrahlung und simultaner Chemotherapie behandelt. Ein lokal fortgeschrittenes Karzinom lag bei 13 Patienten vor und diese Patientengruppe erhielt eine neoadjuvante Radiochemotherapie. Acht Patienten mit einem lokalen Rezidiv eines Rektumkarzinoms wurden mit einer Rezidiv-Radiochemotherapie behandelt (s. Tab. 4).

	Adjuvante RCT	Neoadjuvante RCT	Rezidiv-RCT	Gesamt
Patientenzahl	4	13	8	25
Geschlecht w / m	2 / 2	3 / 10	0 / 8	5 / 20
Alter Median (Jahre)	65	64	64	64
Altersbereich (Jahre)	54 – 75	47 – 76	47 – 73	47 – 76
UICC I	0	0	1	1
UICC II	3	6	2	11
UICC III	1	6	3	10
UICC IV	0	1	2	3
T 1	0	0	1	1
T 2	0	0	2	2
T 3	3	9	4	16
T 4	1	4	1	6
N 0	3	6	3	12
N 1	1	7	5	13
G 1	0	0	0	0
G 2	3	10	6	19
G 3	1	2	1	4
Keine Klassifikation	0	1	1	2

Tab. 4: Alter der behandelten Patienten mit Rektumkarzinom, Geschlechtsverteilung, Krankheitsstadium nach DUKES-Klassifikation, Lymphknotenstatus und histopathologisches Grading (nicht bei allen Patienten erfaßt). Unterteilung des Patientenkollektivs nach Therapieart in adjuvante, neoadjuvante bzw. Rezidiv-Radiochemotherapie (RCT).

3.1.3 Radiochemotherapie

Eine Radiochemotherapie setzt sich zusammen aus Bestrahlung und simultaner Applikation von Chemotherapeutika.

3.1.3.1 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie des lokalen Befundgebietes wurde in der Regel mit 15 MV Photonen eines Linearbeschleunigers in isozentrischer Drei- oder Vierfeldertechnik und unter Verwendung individueller Kollimation durchgeführt. Sie erfolgte in konventioneller Fraktionierung mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy an fünf Tagen pro Woche. Mit Ausnahme der Rektum-Rezidive wurden insgesamt 25 Bestrahlungsfractionen in fünf Wochen verabreicht. Die applizierte Gesamtdosis betrug im Median 45,0 Gy (Dosierung entsprechend der International Commission of Radiation Units and Measurements, ICRU 50). Vorbehandelte Rektum-Rezidive wurden mit 17 Fractionen von 1,8 Gy bestrahlt. Dies entspricht einer Gesamtdosis von 30,6 Gy.

Das Zielvolumen umfaßte den primären Tumorsitz mit einem Sicherheitsabstand von etwa 2 – 3 cm, sowie die funktionell angrenzenden Lymphknotenstationen. Bei Karzinomen des Pankreaskopfes sind dies die peripankreatischen Lymphknoten, die Leberhilus-Lymphknoten und die zöliakalen Lymphknoten. Die suprapankreatischen Lymphknoten und der Milzhilus gehören mit zum Bestrahlungsfeld bei Malignomen des Pankreaskorpus bzw. –schwanzes.

Bei Patienten mit Rektumkarzinom wurde die Primärtumorregion mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand bestrahlt. Die iliakal-internen und die präsakralen Lymphknoten gehören zum Bestrahlungsfeld. Liegen Tumoren weniger als 6 cm vom Anus entfernt, wird zusätzlich die Analregion bestrahlt.

Die Bestrahlung wurde individuell mittels 3D-Berechnung (HELAX-Planung), CT-Querschnittsbildern und entsprechenden Rekonstruktionen geplant.

3.1.3.2 Chemotherapie

Als Chemotherapeutika wurden beim Pankreakarzinom zwei verschiedene Kombinationen simultan zur Radiotherapie appliziert:

1. Gemcitabine (300 mg/m² KOF) und Cisplatin (30 mg/m² KOF)
2. Gemcitabine (300 mg/m² KOF) und 5-Fluoruracil (350 mg/m² KOF)

Dabei wurde bei der ersten Kombination Gemcitabine und Cisplatin an den Tagen 1, 8, 22 und 29 der Bestrahlung verabreicht. Diese Kombination erhielten 22 Patienten. Alternativ wurde zehn Patienten Gemcitabine an den Tagen 1, 15 und 29 der Bestrahlung und 5-Fluoruracil bestrahlungstäglich gegeben.

Alle Patienten mit kolorektalem Karzinom erhielten das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil. Je nach Therapieart erfolgte die Gabe in unterschiedlicher Dosierung und verschiedenen Abständen. R0-resezierte Patienten erhielten 500 mg/m² KOF als 24-Stunden-Dauerinfusion in der ersten und fünften Woche der Bestrahlung. In der präoperativen oder Rezidiv-Situation wurde den Patienten 350 mg/m² KOF bestrahlungstäglich verabreicht.

3.2 Klinische Bewertung der Therapieeffizienz

Tumorthérapien beruhen auf evidenzbasierten Studien und empirischen Daten. Mittlerweile kennt man zahlreiche zytogenetische Veränderungen, die zu Malignomen führen können. In einem Kollektiv von Tumorpatienten existieren viele verschiedene zytogenetische Mutationen nebeneinander. Die Zusammenhänge zwischen genetischen Veränderungen und Wirkmechanismen von Chemotherapeutika sind nur in Ansätzen erforscht. Daher kann im Einzelfall ein Therapieansprechen nur schwer vorhergesagt werden.

Zur Kontrolle der Therapieeffizienz erfolgen im Verlauf und nach Abschluß der Therapie üblicherweise Staging-Untersuchungen mittels bildgebender Verfahren und bestimmter Blutparameter in definierten Abständen. Je nach Tumorstadium und durchgeführter Therapie werden unterschiedliche Untersuchungen und Tests

empfohlen. Allerdings divergieren diese Empfehlungen erheblich zwischen den großen Organisationen, wie etwa der European Society of Medical Oncology (ESMO), European Group on Tumor Markers (EGTM), des National Comprehensive Cancer Network (NCCN) und der American Society of Clinical Oncology (ASCO) [Van Cutsem 2005 (A), Van Cutsem (B), Engstrom PF 2005 (A), Engstrom PF 2005 (B), Locker 2006].

Die im Klinikum Grosshadern verwendeten Leitlinien empfehlen zur Effizienzkontrolle vor und nach Therapie den Tumormarker CEA bei kolorektalen Karzinomen und CA 19-9 bei Tumoren des Pankreas zu bestimmen. Zusätzlich wird als bildgebendes Verfahren häufig die Computertomographie eingesetzt, meist kombiniert von Thorax und Abdomen. Während einer Radiochemotherapie wird die Therapieeffizienz nicht kontrolliert. Verlaufskontrollen im Anschluss an eine Therapie erfolgen leider uneinheitlich, unter anderem aufgrund fehlender konkreter Richtlinien. Hierbei stellt die mäßige Compliance einiger Patienten eine zusätzliche Problematik dar.

Mittels bildgebender Untersuchungen lässt sich meist erst nach mehreren Wochen bis Monaten das Therapieansprechen einschätzen. Bisher existieren keine geeigneten Methoden, frühzeitiger die Effizienz einer Therapie anzuzeigen. Viele Tumorpatienten verlieren dadurch wertvolle Lebenszeit, bis erkannt wird, dass eine Therapie insuffizient war. Es wäre daher sehr wünschenswert das Ansprechen auf die Tumortherapie frühzeitiger abschätzen zu können, um Nebenwirkungen verhindern und eine Therapie optimieren oder wechseln zu können.

Zudem ist die Beurteilung bildgebender Untersuchungen oft nicht standardisiert und variiert deutlich, abhängig von verwendeter Technik und vom Erfahrungsgrad des Untersuchers. Die im Anschluß an eine Radiochemotherapie auftretenden postradiogenen Veränderungen des Tumors sowie des umgebenden Gewebes erschweren zusätzlich die Beurteilung bildgebender Verfahren. In dieser Arbeit wurden daher alle bildgebenden Befunde durch einen erfahrenen Radiologen erneut detailliert validiert.

In unserer Studie wurde die Therapieeffizienz beim Pankreaskarzinom mittels CA 19-9 und Computertomographie vor und nach Therapie überprüft. Im Anschluss an eine Therapie wurden in etwa dreimonatigen Abständen CA 19-9 bestimmt und

Computertomographien durchgeführt. Das progressionsfreie Intervall wurde definiert als Zeitraum ohne Anstieg des prätherapeutischen CA 19-9-Wertes um mehr als 100%. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen schwierigen und untersuchervariierenden Beurteilung bildgebender Verfahren wurde diese Diagnostik für die Progressbeurteilung zugunsten von CA 19-9 zurückgestellt [Heinemann 1999, Stemmler 2003, Boeck 2006].

Bei kolorektalen Karzinomen wurde die Therapieeffizienz mittels CEA und Computertomographie prä- und postoperativ kontrolliert. Zusätzlich wurde bei präoperativ behandelten Patienten das klinische Staging vor Therapiebeginn mit dem histopathologischen Staging nach Tumorresektion verglichen. Dies stellte die präziseste Untersuchung dar. Alle postoperativ behandelten Patienten wurden in etwa halbjährlichem Abstand klinisch und laborchemisch kontrolliert. Kein Patient entwickelte ein Lokalrezidiv oder Metastasen. Daher wurden diese Patienten als Kontrollkollektiv ohne Tumorlast (R0-Resektion) herangezogen.

3.3 Methoden

3.3.1 Gewinnung und Vorbehandlung der Serumproben

Die Zeitpunkte der Blutentnahme wurden so gewählt, dass sie im normalen klinischen Ablauf vorgenommen werden konnten. Nach Möglichkeit wurden sie mit anfallenden Routineabnahmen zusammengelegt. Die eigenhändig durchgeführten Blutabnahmen erfolgten vor Beginn der Therapie, sechs Stunden nach der ersten Bestrahlung, täglich innerhalb der ersten Woche, einmal wöchentlich während der folgenden Wochen und am Ende der Therapie. Bei einigen Patienten wurden zusätzlich, zum Zeitpunkt der Kontrolluntersuchungen, einige Monate nach der Radiochemotherapie Blutproben entnommen.

Aus einer Cubitalvene wurde möglichst hämolysefrei 10 ml Blut in ein Kaolin-Kugeln enthaltendes Röhrchen (Fa. Kabe) entnommen. Für die Bestimmung der Nukleosomen verwendeten wir Serumproben. Die präanalytische Behandlung der Proben erfolgte in der von Holdenrieder et al. beschriebenen Weise [Holdenrieder 2001

(B)]. Im Einzelfall wurde das Vollblut spätestens ein bis zwei Stunden nach der Entnahme für etwa 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand vom Blutkuchen wurde abesert. 900 µl diese Serums wurden mit 100 µl einer 100 mM EDTA-Lösung (Ethyldiamin-Tetraacetat) versetzt, gut gemischt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Möglichst bald wurden die stabilisierten Seren in 2 ml Plastikgefäße der Fa. Greiner mit Schraubverschluss gefüllt. Insgesamt wurden zwei Aliquots mit EDTA-versetztem Serum und drei weitere mit nativem Serum, jeweils mit etwa 500 µl Volumen, bei -80 °C tiefgefroren. Innerhalb eines halben Jahres wurde von jeder Blutabnahme eines der stabilisierten EDTA-Seren aufgetaut und darin durch mich persönlich die Konzentration der Nukleosomen sowie der biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 gemessen.

3.3.2 Bestimmung der Nukleosomen

Für die Quantifizierung der Konzentration von Nukleosomen im Serum wurde der Cell Death Detection-ELISA^{plus} (CDDE-Test) von Roche Diagnostics, Mannheim (Katalog-Nummer 1774425) verwendet. Dieser nicht-kompetitive Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) beruht auf dem Sandwichprinzip. Dabei werden die Nukleosomen spezifisch von zwei monoklonalen Maus-Antikörpern, die gegen Histone und DNA gerichtet sind, gebunden. Der Anti-Histon-Antikörper bindet zusätzlich an die Mikrotiterplatte und stellt den Festphasen-Antikörper dar. Der Anti-DNA-Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase markiert, welches das Substrat ABTS (2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)) umsetzt (s. Abb. 4). Damit es zu einer Farbreaktion kommt, müssen beide Nukleosomenkomponenten, Histone und DNA, vorhanden sein. Die Anzahl an Nukleosomen, die von Antikörpern gebunden wird, ist proportional zur entstehenden Farbentwicklung. Dies ermöglicht die photometrische Messung und Quantifizierung der Nukleosomen in einer Serumprobe mit Hilfe einer Kalibrationskurve.

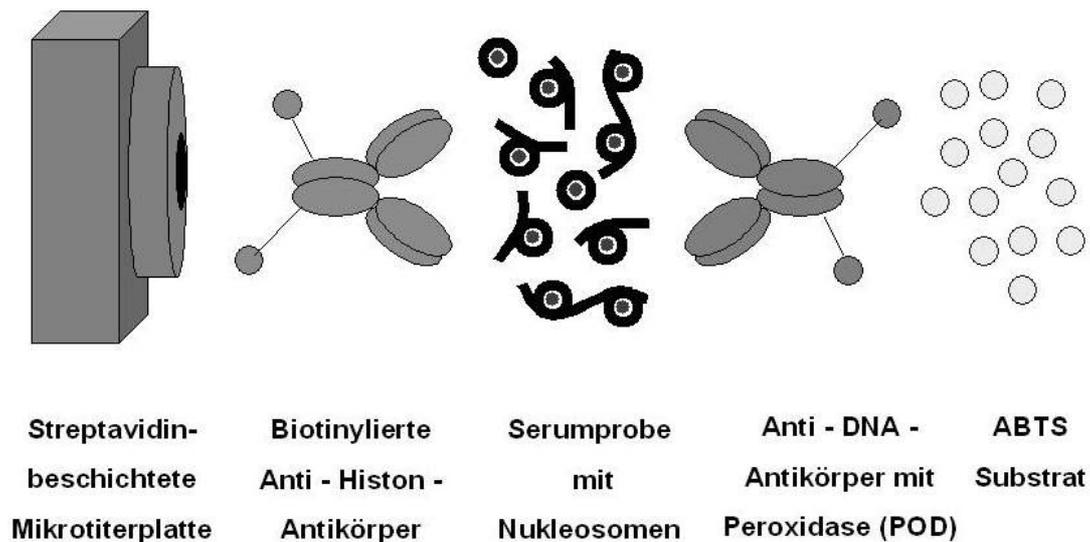


Abb. 4: Testprinzip des Cell-Death-Detection-ELISA^{plus} (CDDE-Test).

Für diesen ELISA werden verschiedene Materialien benötigt, die teils gebrauchsfertig mitgeliefert werden oder vor dem Test hergestellt werden müssen:

- **PBS (Phosphate Buffer Saline)**: Gebrauchsfertige Lösung, die 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O und 0,2 g KH₂PO₄ in einem Liter Wasser enthält und auf pH = 7,4 justiert ist.
- **Inkubationspuffer**: Gebrauchsfertige Lösung, die PBS mit 1% Rinderserumalbumin, 0,5% Tween 20 und 1 mM EDTA enthält.
- **Anti-Histon-Biotin**: Tablette eines lyophilisierten und biotinylierten Anti-Histon-AK Panels, die in 450 µl bidestillierten Wasser aufgelöst wird.
- **Anti-DNA-POD**: Tablette eines lyophilisierten und Peroxidase markierten Anti-DNA-AK Panels, die in 450 µl bidestillierten Wasser aufgelöst wird.
- **Immunreagens**: 1/20 Volumenanteile der biotinylierten Anti-Histon-Antikörper und 1/20 Volumenanteile der Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper werden vorsichtig mit 18/20 Volumenanteilen Inkubationspuffer homogenisiert.
- **Substratpuffer**: Gebrauchsfertige Lösung, die 1047,5 mg Zitronensäure, 62,5 mg Natriumperborat * 3 H₂O, 9,77 mg CaCl₂ * H₂O, 1335 mg Na₂HPO₄ * 2 H₂O in 125 ml enthält und auf pH = 4,5 justiert ist.

- Substrat: Drei Tabletten mit 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat) (ABTS), die unmittelbar vor Gebrauch in 15 ml Substratpuffer gelöst werden und lichtgeschützt gelagert werden müssen.
- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte und Adhäsiv-Folien.

Die für diesen CDDE-Test verwendeten Anti-Histon-Antikörper stammen aus dem Mausklon H 11-4 und besitzen eine spezifische Affinität für die Histone H2a, H2b, H3 und H4. Die Anti-DNA-Antikörper wurden im Mausklon M-CA-33 gezüchtet und erkennen Einzel- und Doppelstrang-DNA. Durch das Sandwichverfahren werden nur nukleäre Mono- und Oligonukleosomen aus eukaryontischen Zellen erfaßt. In Mitochondrien und prokaryontischen Zellen, wie Bakterien, Rickettsien und Viren ist die DNA nicht mit Histonen assoziiert und kann deshalb auch nicht in Form von Nukleosomen vorliegen. Auch RNA ist nicht an Histone gebunden und wird ebenfalls beim CDDE-Test nicht detektiert [Plattner 1997].

Die Testdurchführung erfolgte wie von Holdenrieder et al. beschrieben [Holdenrieder 2001 (B)]: Nach dem Auftauen wurden die Proben für drei Sekunden mit dem Vortex homogenisiert und mit dem Inkubationspuffer im Verhältnis 1:4 (20 µl Serum und 60 µl Inkubationspuffer) verdünnt. Diese verdünnten Serumproben wurden nochmals für drei Sekunden „gevortext“ und daraus je 20 µl in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden 80 µl des Immunreagens, bestehend aus biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern, Peroxidase-markierten, Anti-DNA-Antikörpern und Inkubationspuffer, gegeben, mit einer Adhäsivfolie bedeckt und für zwei Stunden auf einem Mikrotiterplatten-Rüttler bei etwa 500 U/min inkubiert.

Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Proteinkomponente der Nukleosomen und fixiert diesen Komplex mit Hilfe des Biotins an der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen.

Die nicht gebundenen Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit je 300 bis 400 µl Inkubationspuffer entfernt. Die fixierten Antikörper-Komplexe werden mit 100 µl ABTS (2,2'-Azinodi(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)) inkubiert, anschließend die

Mikrotiterplatte mit einer Adhäsivfolie verschlossen und bei 500 U/min gerüttelt. Das Substrat reagiert mit dem Enzym Peroxidase der Anti-DNA-Antikörper und bewirkt eine zu den gebundenen Antikörpern proportionale Farbveränderung, die photometrisch bei $\delta = 405$ nm gegen die Substratlösung als Blank (Referenzwellenlänge $\delta = 492$ nm) quantifiziert wird.

Für eine direkte Quantifizierung der Nukleosomen mit hoher Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Testläufen wurde eine Standardkurve aus nukleosomenreichem Referenzmaterial hergestellt. Dieses Referenzmaterial wurde vor der Durchführung des Tests mit Inkubationspuffer so verdünnt, dass nach einer definierten Farbentwicklungszeit von 30 Minuten die niedrigste Verdünnungsstufe Extinktionswerte von etwa 2500 milli-Units (mU) optischer Dichte erreichte. Dieser Wert liegt im oberen Meßbereich des Photometers. Diese Verdünnung setzte sich aus einem Volumenanteil Referenzmaterial und 23 Volumenanteilen Inkubationspuffer zusammen (1:24). Durch weitere Verdünnungsschritte (1:32, 1:48, 1:64, 1:96) wurde eine lineare Standardkurve erstellt, die durch den Ursprung des Koordinatensystems läuft.

Ursprünglich wurden als Meßeinheit sogenannte Arbitrary Units (AU) definiert. Diese geschätzten Units geben eine an der Standardkurve orientierte, relative Konzentrationsangabe der Nukleosomen im getesteten Material an. Definitionsgemäß erhielt der höchste Standardwert einen relativen Wert von 1000 AU. Durch die Bestimmung des DNA-Gehalts in einem definierten Standard konnte eine Umrechnung von Arbitrary Units auf Nanogramm pro Milliliter erfolgen. 1000 AU entsprechen dabei 572 ng/ml.

3.3.3 Messung von Tumormarkern

Aus jeder Blutprobe wurden neben den Nukleosomen auch Tumor-assoziierte Antigene bestimmt. Aus den nativen Seren der Rektum- und Pankreas-Patienten wurden Carcino-Embryonale Antigen (CEA), Cancer Antigen 19-9 (CA 19-9) sowie Cytokeratin 19-Fragmente (CYFRA 21-1) bestimmt (s. Tab. 5). Alle Messungen wurden am ElecSys 2010 (s. Abb. 5) vorgenommen, ein vollautomatisches,

softwaregesteuertes Analysensystem von Roche Diagnostics.

Tumor-assoziierte Antigene	Methode	Grenzwert	Median der Gesunden
Carcino-Embryonales Antigen (CEA)	ElecSys 2010 (Roche)	3,3 ng/ml	1,3 ng/ml
Cancer Antigen 19-9 (CA 19-9)	ElecSys 2010 (Roche)	37 U/ml	3,1 U/ml
Cytokeratin 19 (CYFRA 21-1)	ElecSys 2010 (Roche)	3,0 ng/ml	0,7 ng/ml

Tab. 5: In den Patientenseren gemessene Tumor-assoziierte Antigene mit dem Median der Gesunden und dem Grenzwert (sog. cut off). Dieser Grenzwert entspricht der 95% Perzentile gesunder Personen.

Der ElecSys 2010 ist ein Analysensystem für die Bestimmung von immunologischen Tests nach dem Elektro-Chemi-Lumineszenz-Verfahren (ECL-Verfahren). Die Elektrochemilumineszenz ist ein Prozeß, bei dem aus stabilen Ausgangsstoffen durch Anlegen einer Spannung hochreaktive Stoffe erzeugt werden. Diese hochreaktiven Stoffe reagieren dann in einer Reaktion, bei der Licht emittiert wird. Im ElecSys 2010 basiert dieses Verfahren auf der Verwendung eines Ruthenium(II)-tris(bipyridyl)-Komplexes. Das Testprinzip beruht wie der Nukleosomennachweis auf einem Sandwichprinzip. Im ersten Schritt werden 10 µl (CEA-Bestimmung) bzw. 20 µl (CA 19-9- und CYFRA 21-1-Bestimmung) Serum, ein biotinylierter monoklonaler spezifischer Antikörper und ein mit dem Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler spezifischer Antikörper inkubiert. Diese Substanzen bilden einen Sandwich-Komplex. Je nach Kit sind die Antikörper spezifisch für CEA, CA 19-9 und Cytokeratin 19. In einem zweiten Schritt werden nach Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln die Komplexe über eine

Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin an die Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wird in die Meßzelle überführt, in der die Mikropartikel durch magnetische Felder auf der Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Mit ProCell-Puffer werden die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Emission der Chemolumineszenz induziert, welche mit dem Photomultiplier gemessen wird. Anhand einer Kalibrationskurve werden die Ergebnisse ermittelt. Die Gesamtdauer des Tests beträgt etwa 18 Minuten. Die sehr präzise Steuerung der Reaktion stellt einen wesentlichen Vorteil dieses Verfahrens gegenüber anderen Meßmethoden dar.

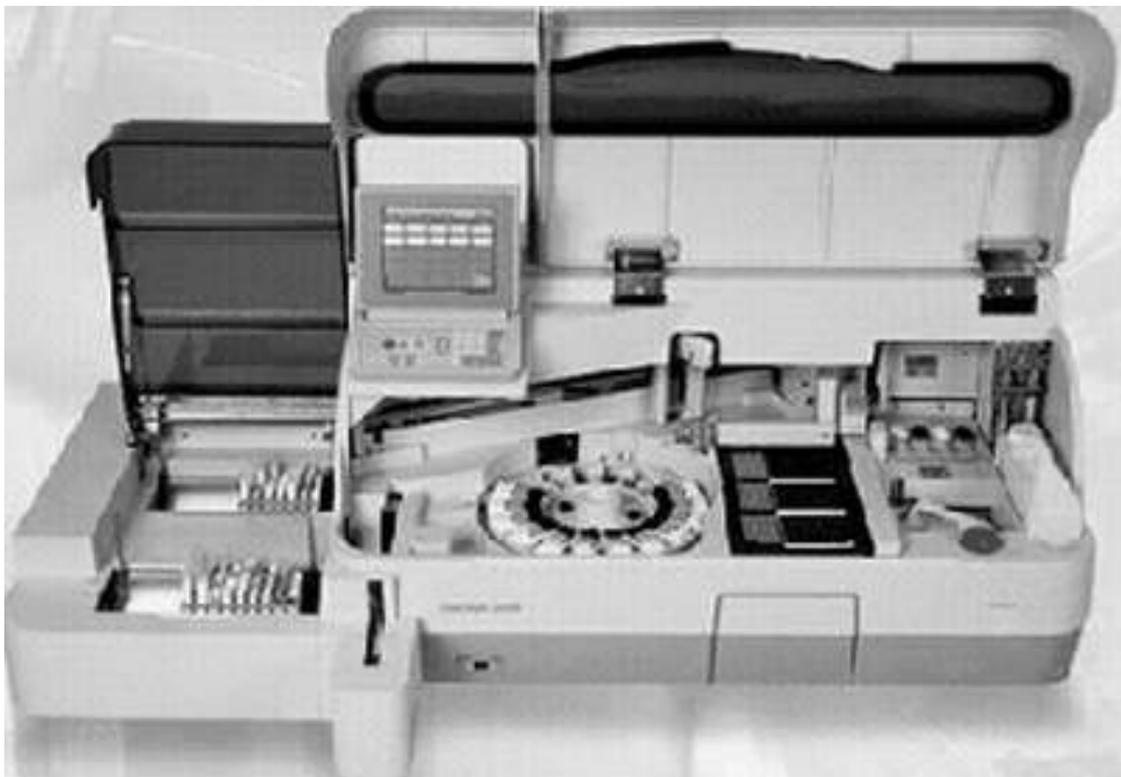


Abb. 5: ElecSys 2010 von Roche Diagnostics, an dem die Tumormarker bestimmt wurden.

3.3.4 Statistik

Die Ergebnisse dieser Dissertation werden deskriptiv anhand von Diagrammen, Tabellen, Verlaufsabbildungen und Dot-plots dargestellt. Innerhalb von Tabellen sind

alle Messwerte in Form von Medianen und Bandbreiten, also Minimal- und Maximalwert, zusammengefasst. Dot-plot-Graphiken präsentieren dagegen sehr anschaulich alle Einzelwerte. Letztere haben den Vorteil, dass Verteilungsmuster besser beurteilbar sind. Verlaufsabbildungen sollen beispielhaft die Veränderungen einzelner Parameter eines Patienten während des Behandlungszeitraumes darlegen.

Für die statistische Auswertung zweier Therapiegruppen (z.B. postoperative versus primäre Therapie) wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Der Wilcoxon-Test ist ein statistischer Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Stichproben, der sowohl Richtung als auch Stärke der Differenzen zwischen diesen Stichproben berücksichtigt. Im Gegensatz zum Student T-Test kann dieser Test verwendet werden, wenn das erwartete Verteilungsmuster nicht einer Normalverteilung entspricht.

Zu den analysierten Variablen gehören die Konzentrationen von Nukleosomen sowie die der biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9. Zunächst wurden in beiden Patientenkollektiven (Pankreaskarzinome und kolorektale Karzinome) die wöchentlichen Werte dieser Parameter untersucht und dabei die Therapiegruppen miteinander verglichen. In gleicher Weise wurden die Werte an den einzelnen Tagen während der ersten Woche einer Radiochemotherapie analysiert.

Die weitere Auswertung konzentrierte sich auf die Auswertung der Patientengruppen anhand ihres Therapieansprechens (Progression versus Keine Progression). Dies erfolgte bei allen Patienten mit Pankreaskarzinom sowie allen neoadjuvant behandelten Patienten mit kolorektalem Karzinom. Insbesondere wurde dabei auf den Beginn einer Radiochemotherapie fokussiert und die Werte aller Parameter der ersten drei Tage analysiert. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der einzelnen Parameter während der initialen Therapiephase als Kurve unter der Fläche (AUC 1-3, area under the curve) zusammengefasst. Sie beinhaltet die Konzentrationen nach 6 Stunden (Tag 1, 6 Stunden) sowie am 2. Tag (Tag 2, 24 Stunden) und 3. Tag (Tag 3, 48 Stunden). Die zeitlichen Abstände zwischen den einzelnen Variablen sind ungleichmäßig. Um sie zu normisieren und vergleichbar zu machen, wurde die AUC 1-3 durch die Anzahl der Tage geteilt.

Bei den kolorektalen Karzinomen wurde zusätzlich mittels Varianzanalyse die

Abhängigkeit der logarithmischen Konzentrationen von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 bezogen auf die Behandlungsgruppe (postoperative, präoperative und Rezidiv-Therapie) und auf die Zeit [vor (Tag 1, 0 Stunden) und nach (Tag 1, 6 Stunden bis Tag 3) Beginn der Radiochemotherapie] berechnet. Diese Analysen wurden mit der SAS Prozedur MIXED durchgeführt, die Abhängigkeiten wiederholter Werte gleicher Patienten berücksichtigt. Zusätzlich wurden „angepasste“ p-Werte (adjusted p-values) entsprechend der Anzahl der durchgeführten Vergleiche zwischen den drei Behandlungsgruppen berechnet. In gleicher Weise wurden die Konzentrationen der Nukleosomen und biologischen Marker bei Patienten mit neoadjuvanter Radiochemotherapie verglichen. Dabei wurde zwischen Patienten unterschieden, die keine Progression aufwiesen und solchen mit Progression ihrer Erkrankung.

Das progressionsfreie Intervall im Kollektiv der Pankreaskarzinome wurde mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven und log-rank Test bestimmt. Als cut-offs wurden dabei die Mediane des gesamten Kollektivs herangezogen.

Signifikanz wurde bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art unter 5% angenommen ($p < 0,05$). Alle statistischen Kalkulationen wurden mit der Software SAS durchgeführt (Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Deskriptive Statistik und Diagramme wurden in Microsoft Excel und Power Point, Microsoft Office XP 2005, erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Nukleosomen- und Tumormarker-Konzentrationen bei Patienten mit Pankreas-Karzinom

Ingesamt wurden 32 Patienten untersucht, die sich aufgrund eines Karzinoms der Bauchspeicheldrüse einer Radiochemotherapie unterzogen. Bei allen Patienten erfolgten Blutabnahmen vor Beginn der Therapie, sechs Stunden nach der ersten Bestrahlung, täglich während der ersten Woche, einmal wöchentlich in den folgenden Wochen und nach Abschluss der Therapie. In allen Proben wurden die Konzentrationen von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 gemessen. Zunächst soll auf das Freisetzungsmuster vor Therapiebeginn (Tag 1, 0h) eingegangen werden.

4.1.1 Freisetzungsmuster vor Start der Therapie

Die Freisetzung von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 bei Patienten mit einem Malignom der Bauchspeicheldrüse sind den Abbildungen 6 bis 9 zu entnehmen. Zur exakteren Darstellung wurden alle Einzelwerte als dot-plot-Graphik abgebildet. Dabei wurden jeweils die beiden Therapiegruppen, adjuvante (N = 10) und primäre bzw. Rezidiv-Radiochemotherapie (N = 22), in einer Graphik zusammengefaßt. Auf den folgenden Seiten sind Patienten mit primärer (N = 21) und Rezidiv- (N = 1) Radiochemotherapie zusammengefasst. Da dieser eine Rezidivfall lediglich ein Lokalrezidiv ohne Fernmetastasierung aufwies, welches identisch einer primären Radiochemotherapie behandelt wurde, wird er nicht mehr separat erwähnt.

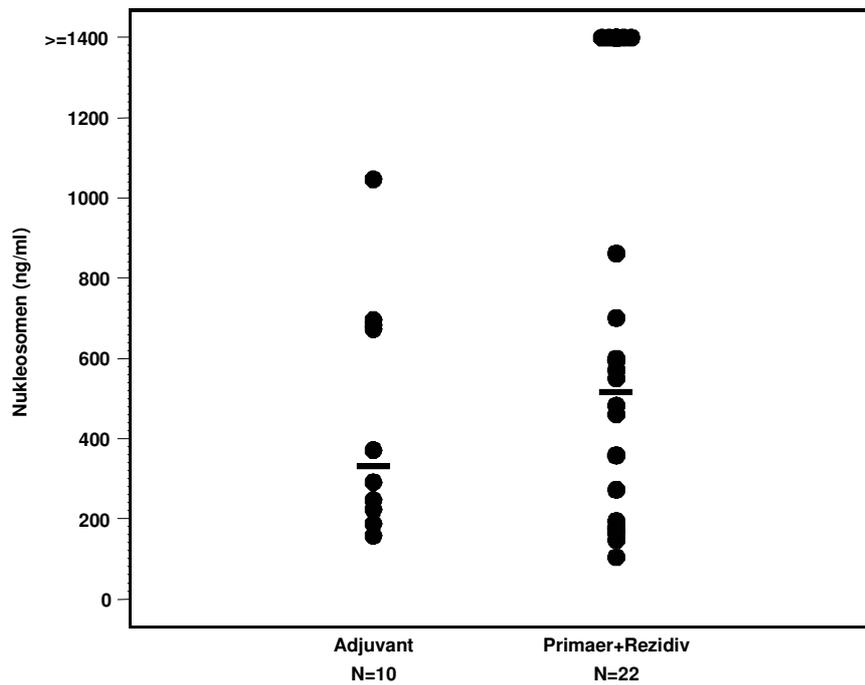


Abb. 6: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit Pankreaskarzinom unterteilt nach adjuvanter und primärer Radiochemotherapie.

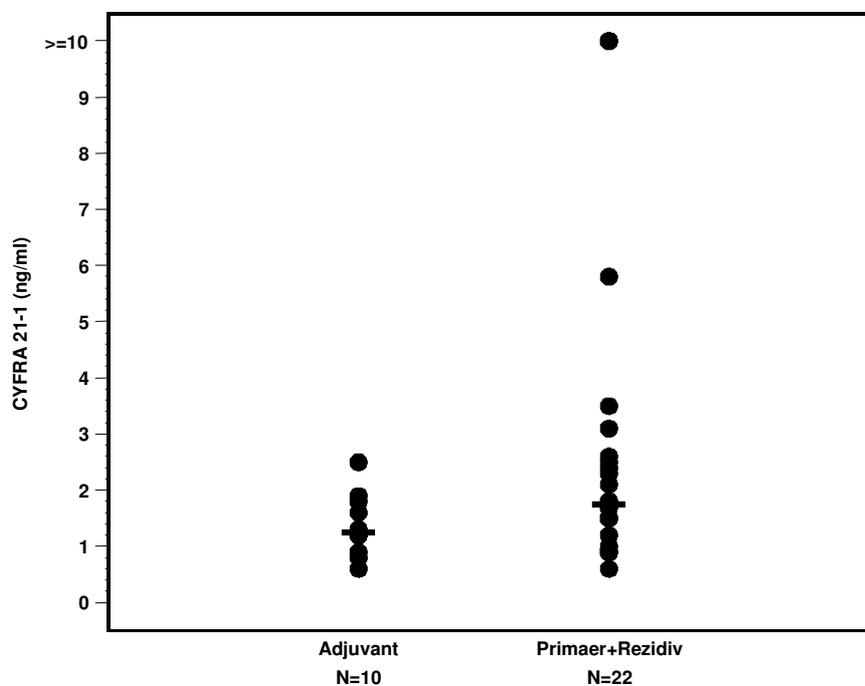


Abb. 7: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit Pankreaskarzinom unterteilt nach adjuvanter und primärer Radiochemotherapie.

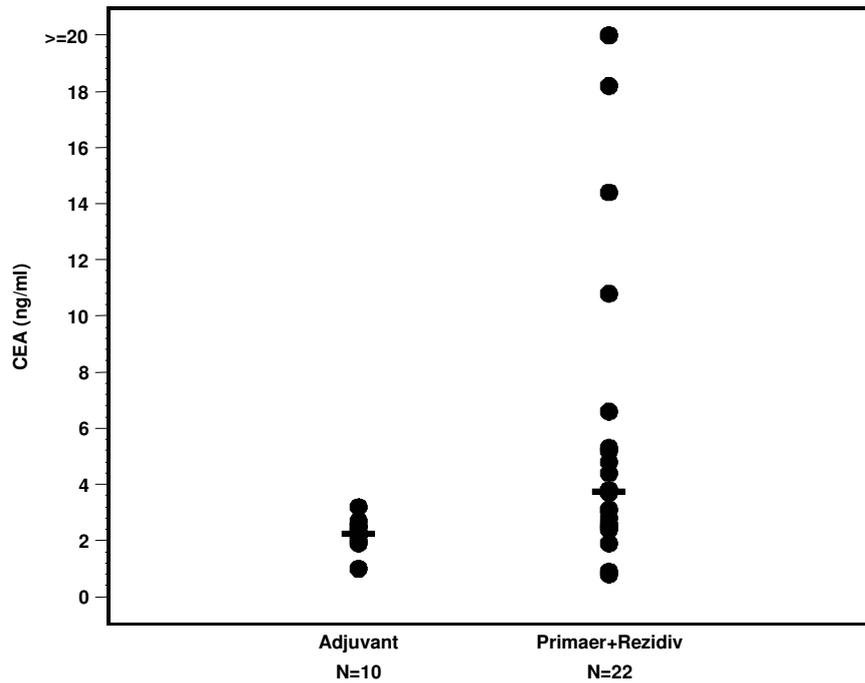


Abb. 8: CEA-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit Pankreaskarzinom unterteilt nach adjuvanter und primärer Radiochemotherapie.

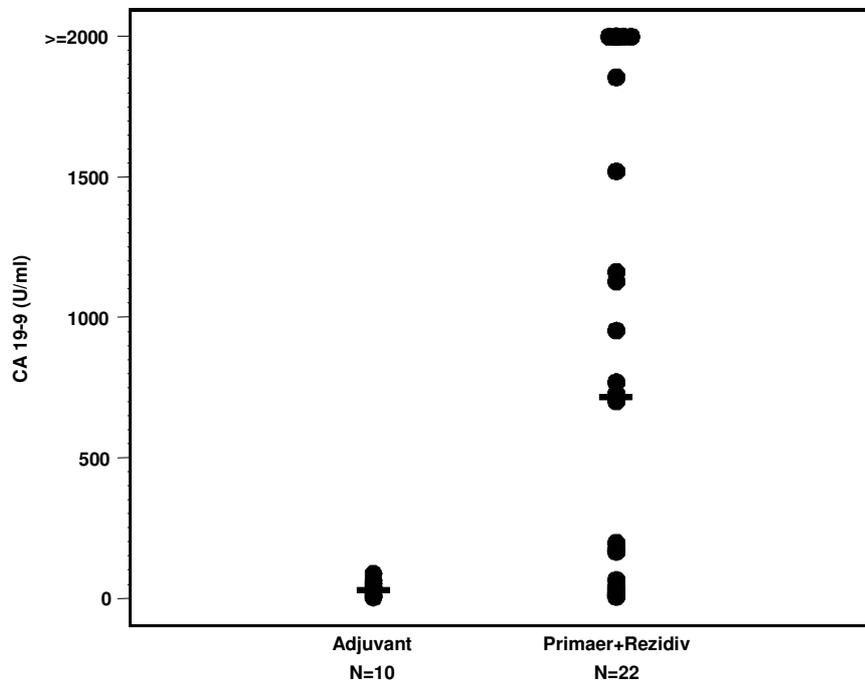


Abb. 9: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit Pankreaskarzinom unterteilt nach adjuvanter und primärer Radiochemotherapie.

Zum Vergleich soll an dieser Stelle erneut auf die Mediane und Grenzwerte für Nukleosomen und Tumormarker eines gesunden Kontrollkollektivs eingegangen werden (s. Tab. 5). Der Grenzwert wird auch als sog. cut-off-Wert bezeichnet und gibt die 95%-Perzentile gesunder Personen an. Dies bedeutet, dass lediglich 5 % aller Gesunden Werte oberhalb dieses Wertes aufweisen. Gesunde Personen weisen im Median für Nukleosomen 14 ng/ml auf, die 95 %-Perzentile liegt bei 56 ng/ml. Für die Tumormarker betragen die Mediane gesunder Personen 1,3 ng/ml für das carcinoembryonale Antigen, 3,1 U/ml für das Cancer Antigen 19-9 und 0,7 ng/ml für das Cytokeratinfragment 19. Der sogenannte cut-off-Wert, die 95%-Perzentile gesunder Personen, liegt bei 3,3 ng/ml für CEA, 37 U/ml für CA 19-9 und 3,0 ng/ml für CYFRA 21-1 (s. Tab. 5).

4.1.2 Freisetzungsmuster unter Therapie

4.1.2.1 Wöchentliche Werte

Unter Therapie wurden zunächst die wöchentlichen Konzentrationen von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 betrachtet. Die folgenden Abbildungen zeigen alle wöchentlichen Einzelwerte für Nukleosomen und biologischer Marker unterteilt nach Therapiegruppe im Verlauf der Radiochemotherapie. Zunächst wird jeweils eine Abbildung zu Patienten mit Pankreaskarzinom während einer primären Radiochemotherapie dargestellt. Anschließend folgen jeweils Nukleosomen und biologische Marker aller Patienten mit Pankreaskarzinom, die nach einer Resektion des Tumors eine adjuvante kombinierte Strahlen- und Chemotherapie erhielten (s. Abb. 10 – 17).

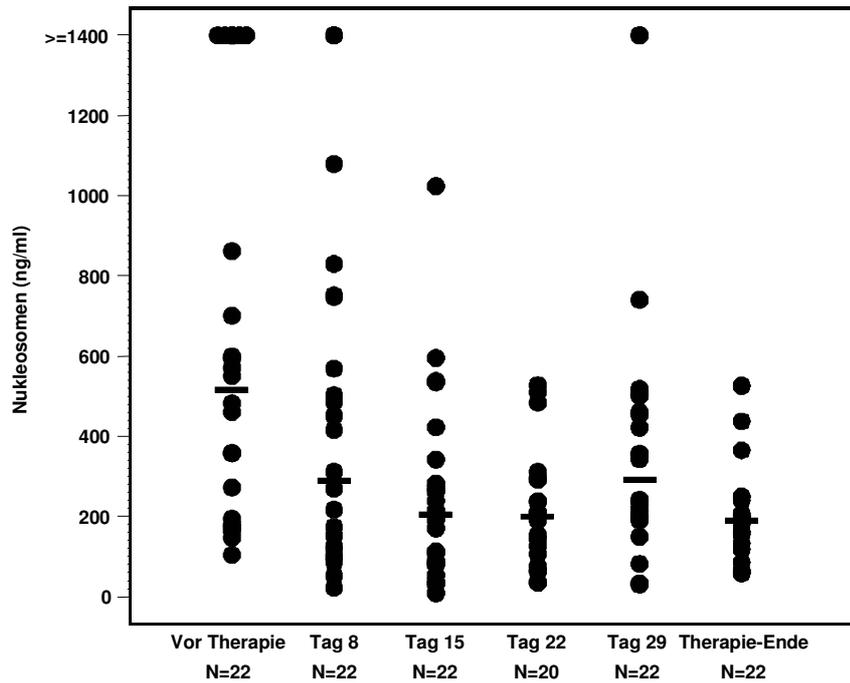


Abb. 10: Wöchentliche Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom während primärer Radiochemotherapie.

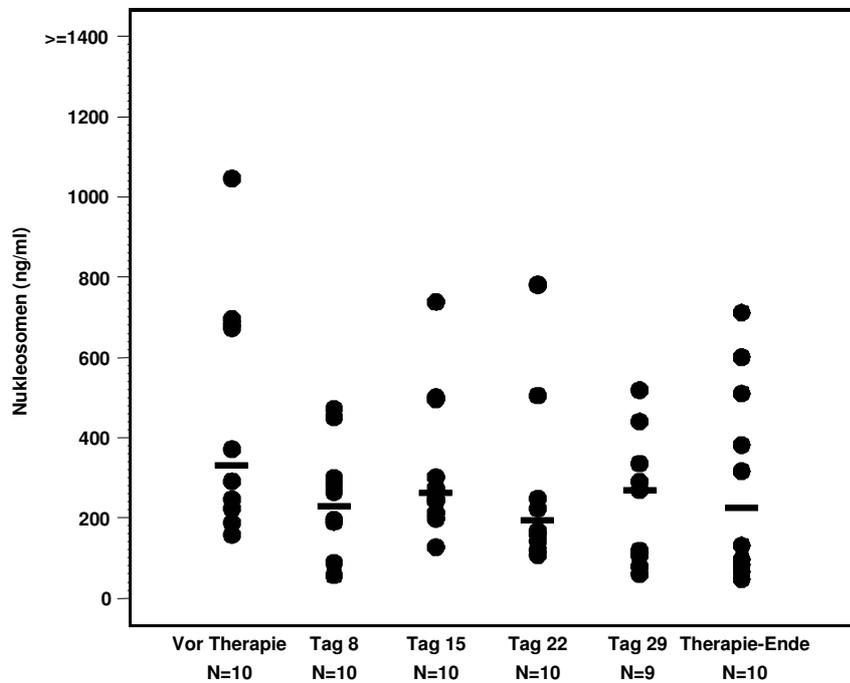


Abb. 11: Wöchentliche Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

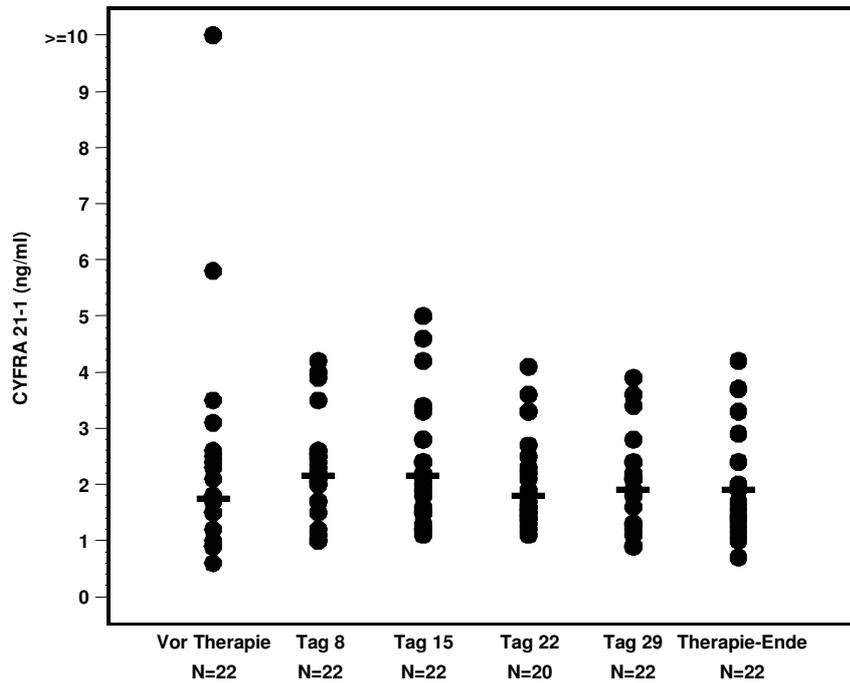


Abb. 12: Wöchentliche CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom während primärer Radiochemotherapie.

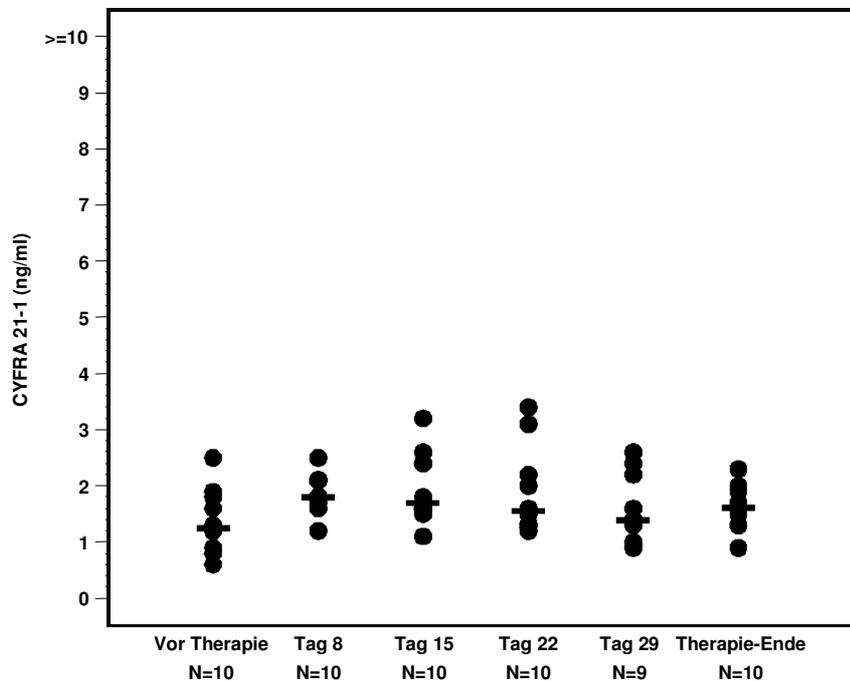


Abb. 13: Wöchentliche CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

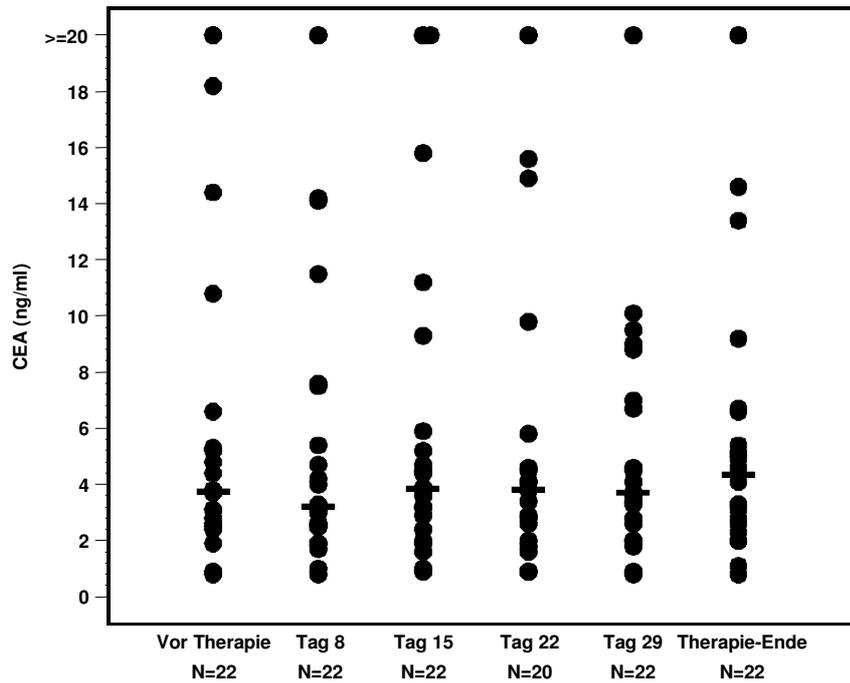


Abb. 14: Wöchentliche CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom während primärer Radiochemotherapie.

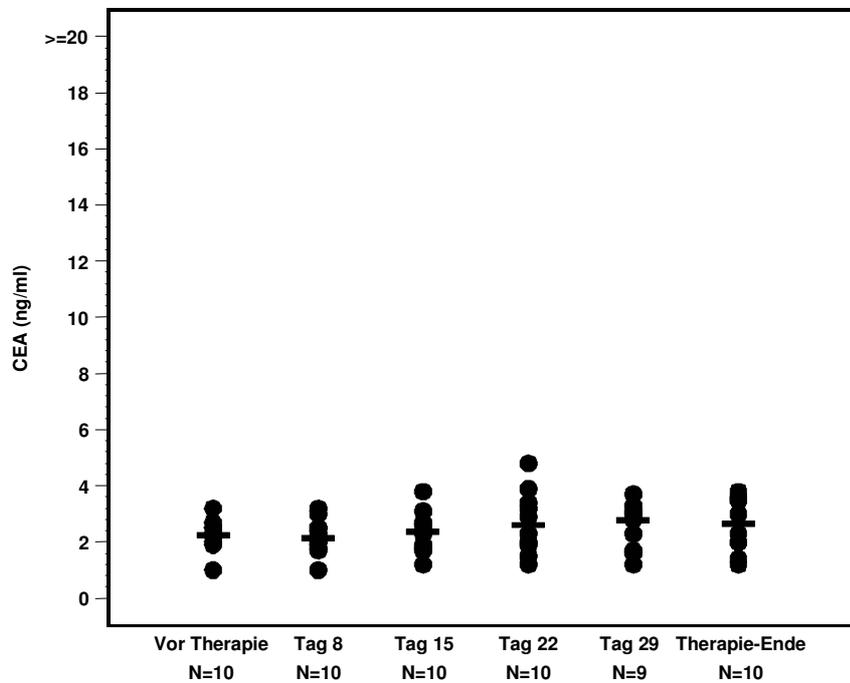


Abb. 15: Wöchentliche CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

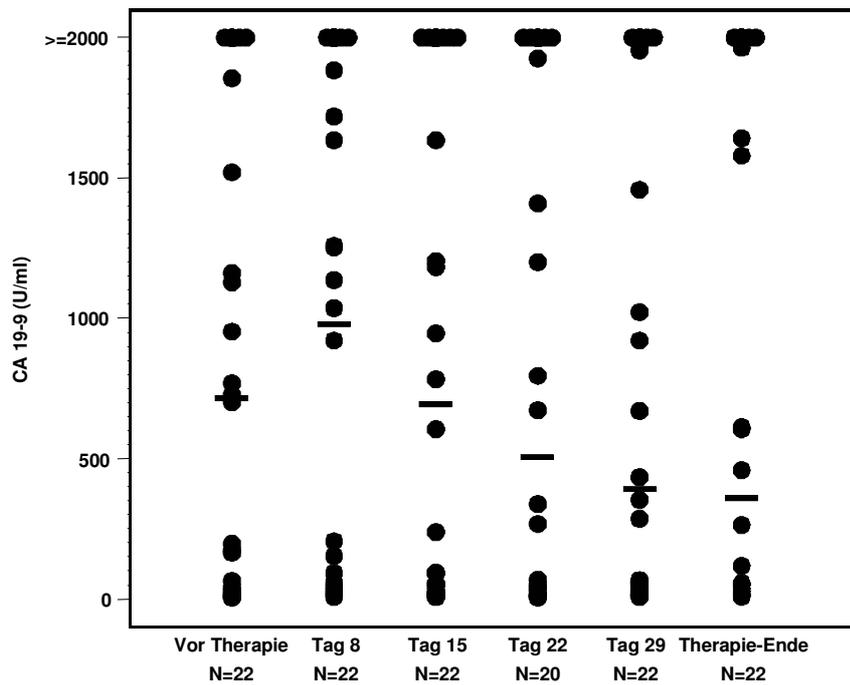


Abb. 16: Wöchentliche CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom während primärer Radiochemotherapie.

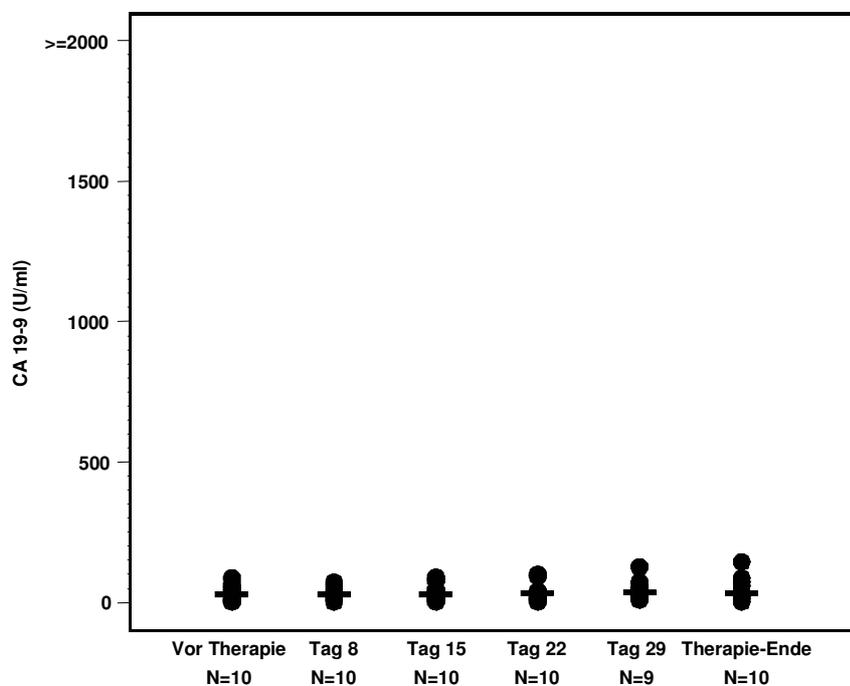


Abb. 17: Wöchentliche CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

	Nukleosomen [ng/ml]	CEA [ng/ml]	CYFRA 21-1 [ng/ml]	CA 19-9 [U/ml]
Postoperative RCT (N = 10)				
Vor Therapie (Tag 1, 0h)	331 (159-1047)	2.3 (1.0-3.2)	1.3 (0.6-2.5)	30.9 (2.6-86.8)
Tag 8	231 (57-473)	2.2 (1.0-3.2)	1.8 (1.2-2.5)	29.3 (2.6-71.5)
Tag 15	261 (127-739)	2.4 (1.2-3.8)	1.7 (1.1-3.2)	30.5 (2.6-89.0)
Tag 22	196 (107-782)	2.6 (1.2-4.8)	1.6 (1.2-3.4)	32.1 (2.6-100)
Tag 29	270 (60-519)	2.8 (1.2-3.7)	1.4 (0.9-2.6)	36.5 (9.8-127)
Therapie-Ende	224 (47-712)	2.7 (1.2-3.8)	1.6 (0.9-2.3)	34.3 (2.6-145)
Primäre RCT (N = 22)				
Vor Therapie (Tag 1, 0h)	516 (104-2184)	3.8 (0.8-22.9)	1.8 (0.6-12.3)	715 (5.6-13531)
Tag 8	290 (23-2383)	3.2 (0.8-24.4)	2.2 (1.0-4.2)	979 (7.2-5783)
Tag 15	204 (9-1024)	3.9 (0.9-31.0)	2.2 (1.1-5.0)	694 (6.6-6648)
Tag 22	200 (35-528)	3.8 (0.9-21.9)	1.8 (1.1-4.1)	506 (5.7-5396)
Tag 29	293 (31-1676)	3.7 (0.8-23.0)	1.9 (0.9-3.9)	394 (7.6-3879)
Therapie-Ende	189 (58-527)	4.4 (0.8-21.7)	1.9 (0.7-4.2)	362 (8.5-7993)

Tab. 6: Mediane und Schwankungsbereiche von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 der Patienten mit postoperativer und primärer Radiochemotherapie. Es sind die Werte vor der Therapie (Tag 1, 0h), die wöchentlichen Werte und die Werte nach Therapie-Ende aufgelistet.

Die Tabelle 6 faßt alle wöchentlichen Werte für Nukleosomen sowie der biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 nochmals übersichtlich zusammen. Dargestellt sind Mediane und Schwankungsbereiche der jeweiligen Parameter. Wie

auch in den dot-plot-Abbildungen wird hierbei ersichtlich, dass primär behandelte Patienten vor allem bei den biologischen Markern höhere Absolutwerte sowie höhere Mediane ausweisen. Dagegen unterschieden sich die freigesetzten Nukleosomenkonzentrationen deutlich geringfügiger und liegen teils in identischen Wertlagen.

4.1.2.2 Werte während der ersten Woche

Die initialen Veränderungen zu Beginn einer Therapie waren von besonderem Interesse. In dieser Phase der Radiochemotherapie waren die Ergebnisse am homogensten und daher am besten zu vergleichen. Dies lag unter anderem daran, dass Patienten eine Radiochemotherapie an den ersten drei Tagen einer Woche, also von Montag bis Donnerstag begannen. So wurden während der ersten drei Tage bei allen Patienten die Nukleosomenfreisetzung durch zweimalige Applikation von 1,8 Gy gemessen. An den folgenden Tagen wurden einige Patienten weiterbestrahlt, während sich andere bereits im bestrahlungsfreien Wochenende befanden. Im weiteren Verlauf einer Radiochemotherapie erschwerten zusätzlich aufgetretene Komplikationen wie Infektionen oder Entzündungen den Vergleich einzelner Nukleosomenwerte. Daher wurde speziell auf die erste Woche einer Radiochemotherapie fokussiert. In diesem Zeitraum erfolgte eine Blutentnahme sechs Stunden (Tag 1, 6h) nach der ersten Bestrahlung und täglich an den darauffolgenden Tagen. Die folgenden Abbildungen fassen diesen Zeitraum sortiert nach Marker und Therapiegruppe übersichtlich zusammen (s. Abb. 18 – 25). Zunächst werden alle Einzelwerte von Nukleosomen sowie der biologischen Marker für primär behandelte Patienten dargestellt. Zu jedem Parameter folgen die Werte von Patienten, die nach Tumorresektion eine postoperative Radiochemotherapie erhielten.

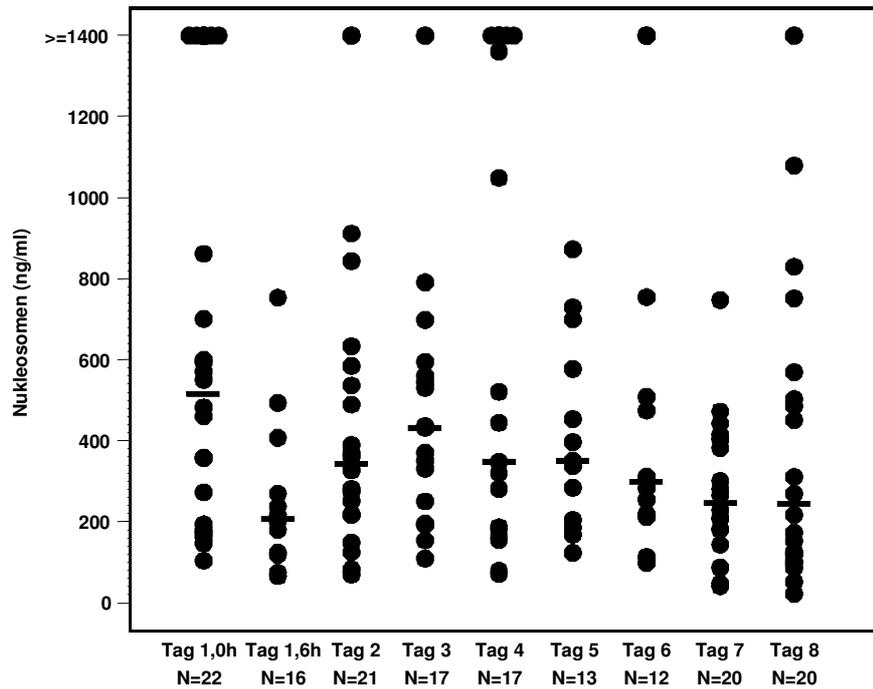


Abb. 18: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer primären Radiochemotherapie.

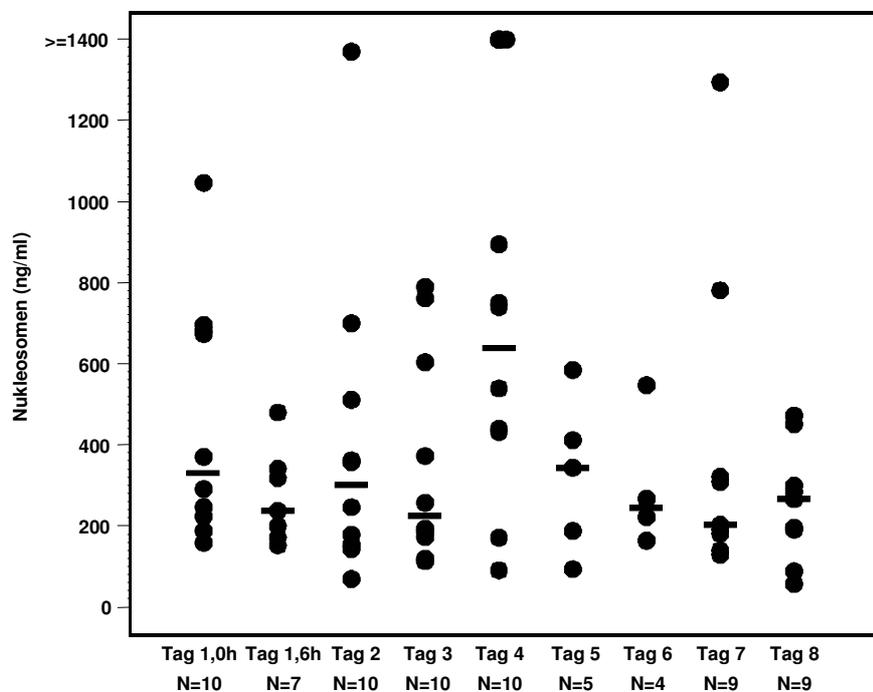


Abb. 19: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

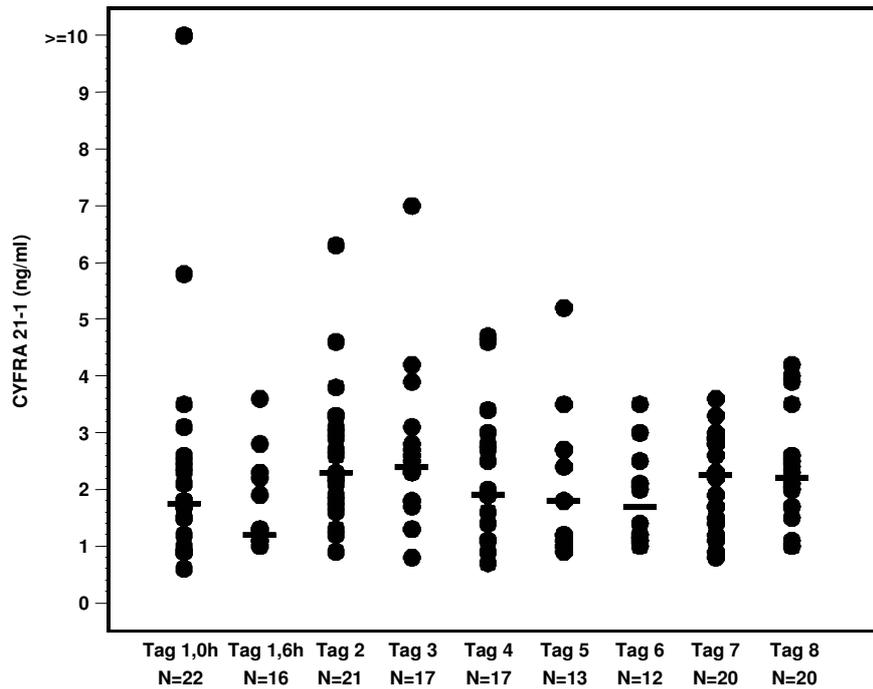


Abb. 20: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer primären Radiochemotherapie.

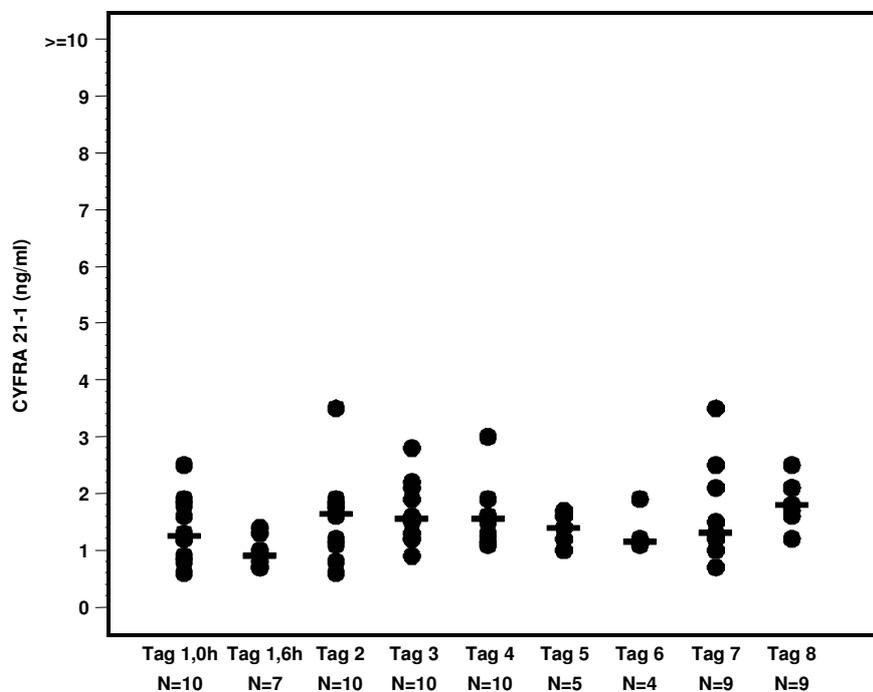


Abb. 21: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

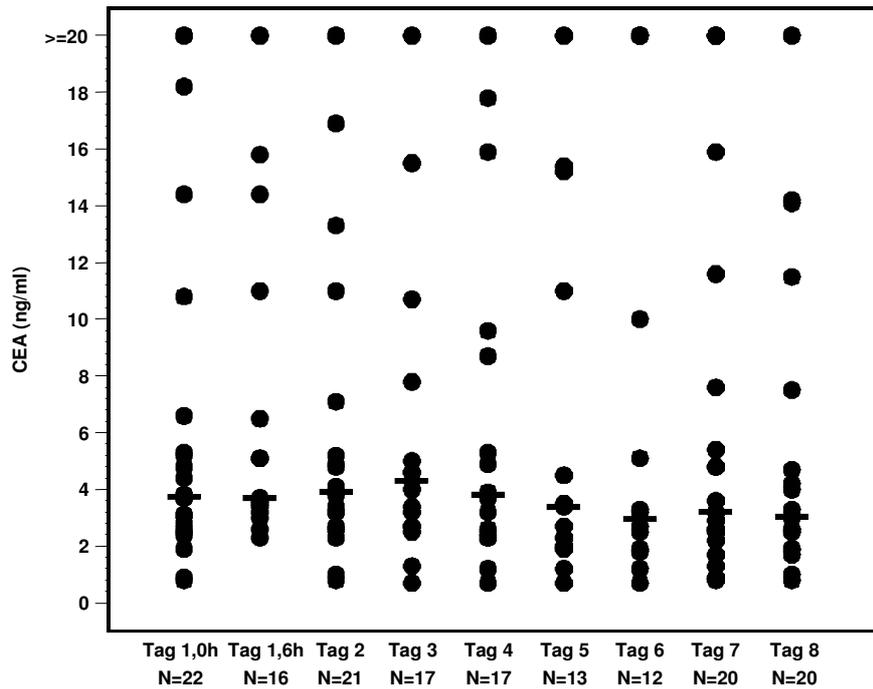


Abb. 22: CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer primären Radiochemotherapie.

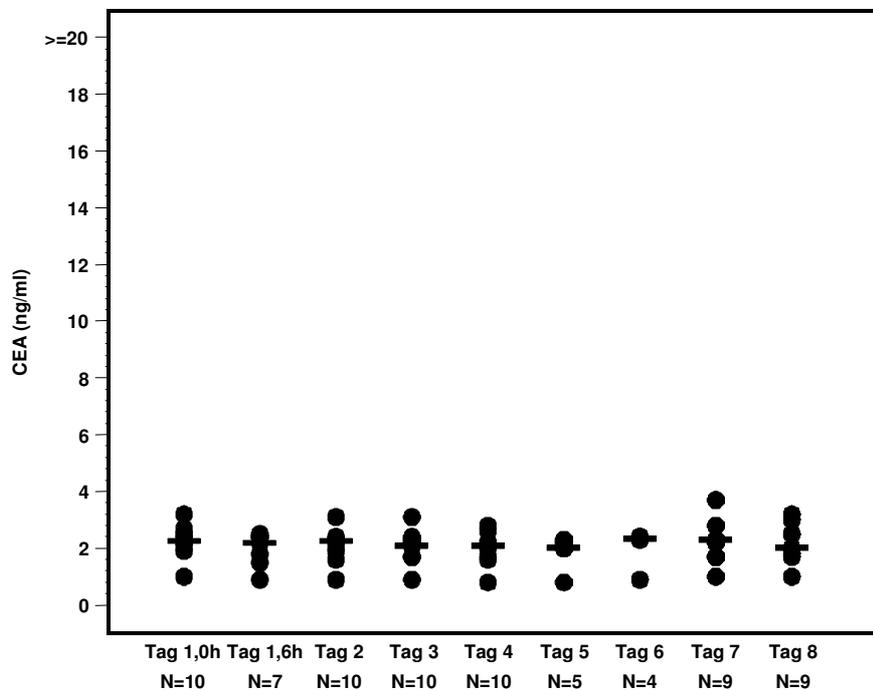


Abb. 23: CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

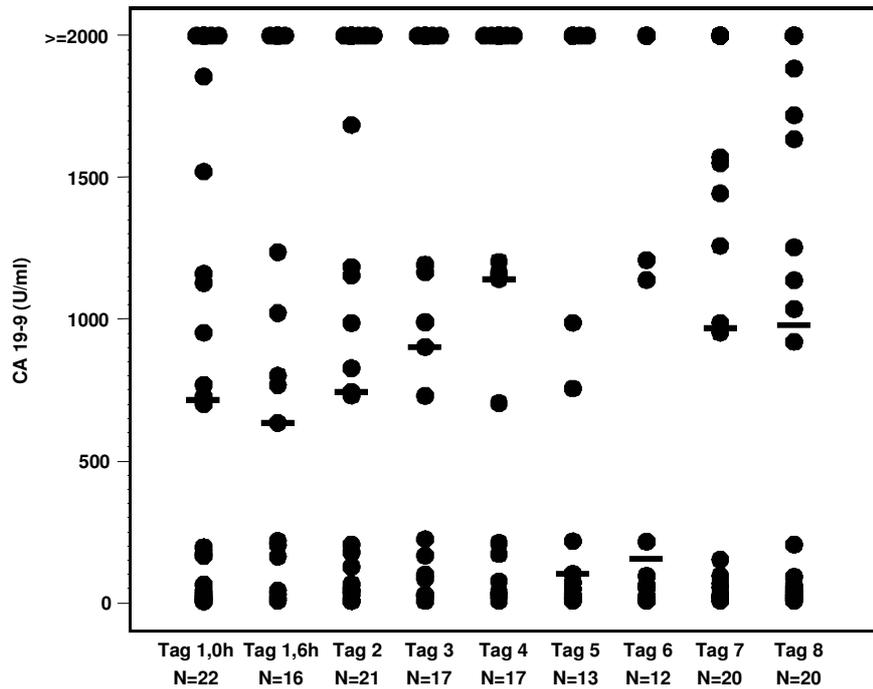


Abb. 24: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer primären Radiochemotherapie.

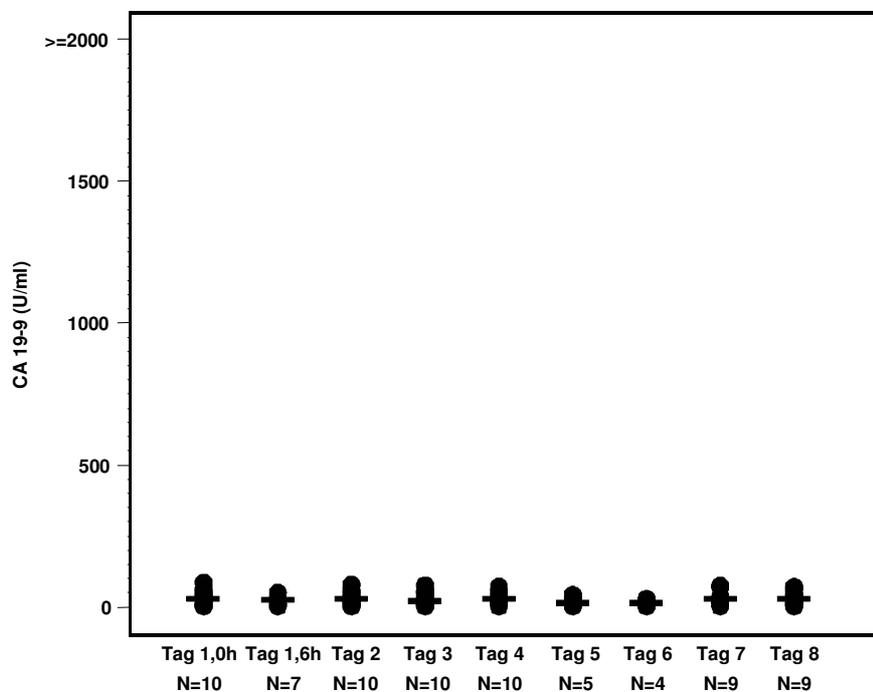


Abb. 25: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

	Nukleosomen [ng/ml]	CEA [ng/ml]	CYFRA 21-1 [ng/ml]	CA 19-9 [U/ml]
Postoperative RCT (N = 10)				
Tag 1, 0h	331 (159-1047)	2.3 (1.0-3.2)	1.3 (0.6-2.5)	30.9 (2.6-86.8)
Tag 1, 6h	237 (152-480)	2.2 (0.9-2.5)	0.9 (0.7-1.4)	26.5 (2.6-5145)
Tag 2	302 (69-1370)	2.3 (0.9-3.1)	1.7 (0.6-3.5)	29.3 (2.6-78.7)
Tag 3	226 (113-790)	2.1 (0.9-3.1)	1.6 (0.9-2.8)	23.8 (2.6-76.7)
Primäre RCT (N = 22)				
Tag 1, 0h	516 (104-2184)	3.8 (0.8-22.9)	1.8 (0.6-12.3)	715 (5.6-13531)
Tag 1, 6h	207 (66-754)	3.7 (2.3-24.5)	1.2 (1.0-3.6)	635 (7.4-7286)
Tag 2	343 (70-3626)	3.9 (0.8-22.6)	2.3 (0.9-6.3)	744 (6.0-17380)
Tag 3	432 (110-1643)	4.3 (0.7-23.3)	2.4 (0.8-7.0)	903 (6.4-9745)

Tab. 7: Mediane und Schwankungsbereiche von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 der Patienten mit postoperativer und primärer Radiochemotherapie. Es sind die Werte vor der Therapie (Tag 1, 0h), 6 Stunden nach der ersten Bestrahlung (Tag 1, 6h), am zweiten Tag (Tag 2, 24h) und dritten Tag (Tag 3, 48h) aufgelistet.

Die Tabelle 7 gibt die Mediane und Schwankungsbereiche von Nukleosomen sowie der biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 der ersten drei Tage einer Radiochemotherapie übersichtlich wieder. Dabei fällt auf, dass sich die Freisetzungsmuster der biologischen Marker zwischen beiden Therapiegruppen deutlich unterscheiden. Sehr anschaulich präsentieren diese Unterschiede auch die als dot-plots dargestellten Einzelwerte in den Abbildungen 18 – 25. Primär behandelte Patienten wiesen im Vergleich zu postoperativ bestrahlten Patienten leicht höhere Konzentrationen für CEA und CYFRA 21-1 auf. Deutlich signifikanter unterschieden sich beide Therapiegruppen beim Cancer Antigen 19-9. Dieser Unterschied spiegelte sich bei den Nukleosomen nicht so deutlich wieder. Patienten, die eine postoperative Radiochemotherapie erhielten, setzten durchschnittlich so

viele Nukleosomen frei, wie primär therapierte Patienten. Dieses überraschende Ergebnis veranlasste eine erneute, ausführliche Analyse der histopathologischen Ergebnisse aller operierten Patienten. Dabei wurde festgestellt, dass bei allen Patienten mit Pankreaskarzinom die Tumorzellen bis an die Resektionsränder heranreichten. Nach der Operation war bei diesen Patienten also restliches Tumorgewebe vorhanden und somit alle R1-reseziert worden. Man kann daher annehmen, dass die erhöhten Nukleosomenkonzentrationen der Patienten mit operiertem Pankreaskarzinom auf verbleibende Tumorzellen zurückzuführen sind, welche unter der Radiochemotherapie irreparabel geschädigt werden und Nukleosomen freisetzen.

4.1.3 Vergleich der Therapiegruppen

Die Verläufe zwischen den einzelnen Patienten weisen eine deutliche Heterogenität auf. Daher wurden die Freisetzungsmuster zwischen den Therapiegruppen, post-operativer (N = 10) und primärer (N = 22) Radiochemotherapie, analysiert. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen typische Verläufe der Nukleosomenkonzentration und der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 während einer postoperativen und einer primären Radiochemotherapie. Um alle Parameter in einer Abbildung miteinander vergleichen zu können, wurden sie durch den Median gesunder Personen geteilt und logarithmisch aufgetragen. Die Mediane gesunder Personen betragen für Nukleosomen 14 ng/ml, für CEA 1,3 mg/ml, 0,7 ng/ml für CYFRA 21-1 und 3,1 U/ml für CA 19-9. Betrachtet man die Verläufe der Nukleosomenkonzentrationen unter Radiochemotherapie zeigten die meisten Patienten einen signifikanten Abfall innerhalb von sechs Stunden nach der ersten applizierten Bestrahlung. Danach stiegen die Nukleosomenwerte rasch wieder an und erreichten ein Maximum an den folgenden Tagen.

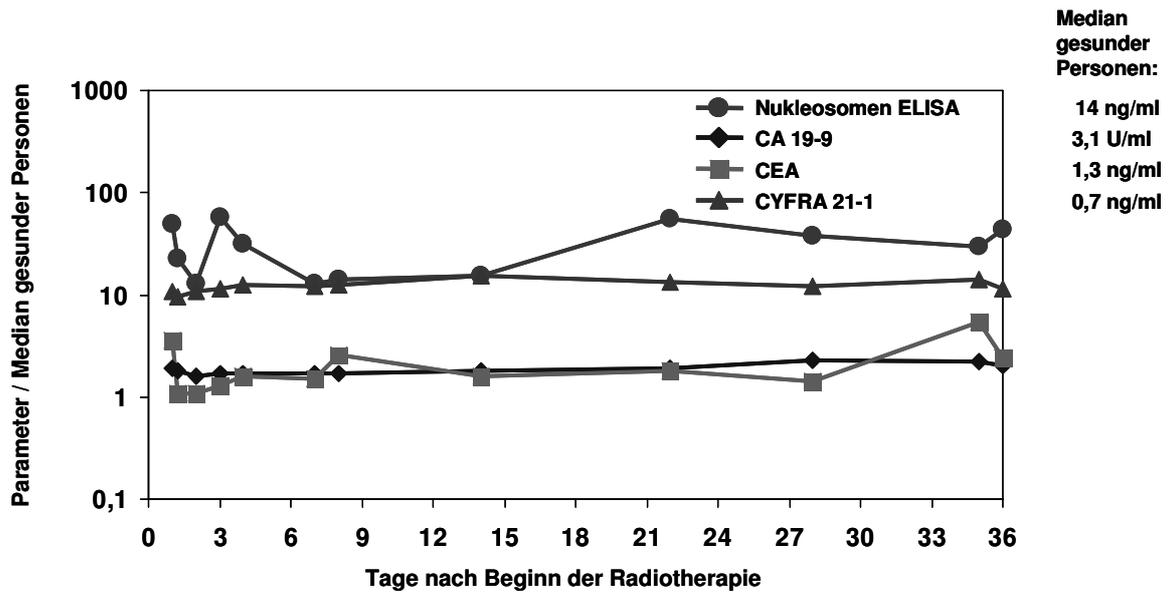


Abb. 26: Logarithmische Darstellung der Verläufe von Nucleosomen und Tumormarker bei einem Patienten mit Pankreaskarzinom während einer postoperativen Radiochemotherapie.

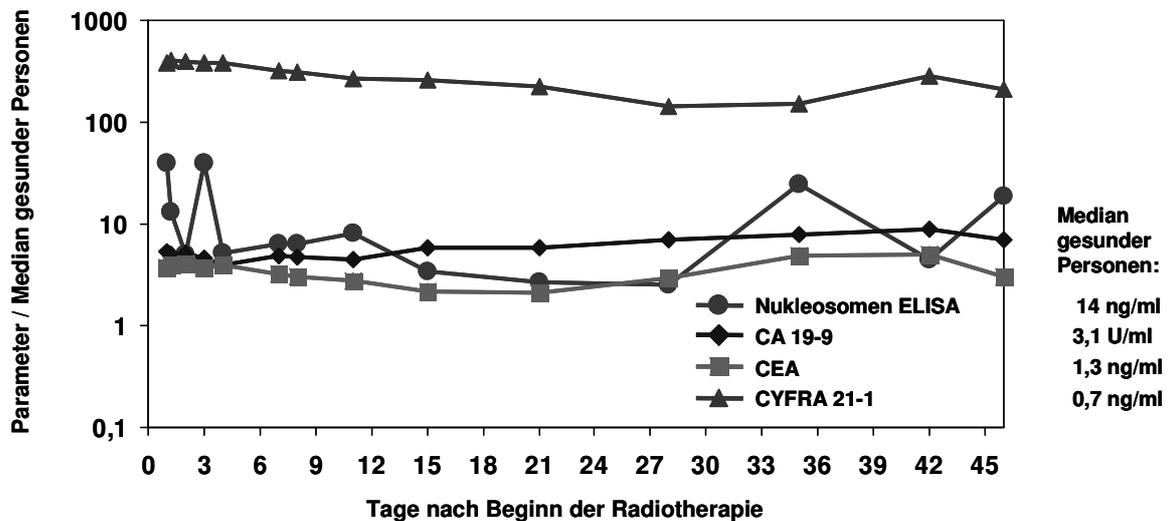


Abb. 27: Logarithmische Darstellung der Verläufe von Nucleosomen und Tumormarker bei einem Patienten mit Pankreaskarzinom während einer primären Radiochemotherapie.

Zwischen den Gruppen der postoperativ und primär behandelten Patienten mit Pankreaskarzinom wurden bezüglich der Nucleosomenfreisetzung keine signifikanten Unterschiede beobachtet (s. Abb. 18 und 19, sowie Tab. 7). Dies gilt für

den prätherapeutischen Wert (Tag 1, 0h) sowie die Werte der folgenden Tage (Tag 1, 6h bis Tag 3). Auch klinisch unterschieden sich beide Kollektive bezüglich Grading, Lymphknotenstatus und Tumorgröße nicht signifikant. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass praktisch alle Patienten trotz Tumorresektion ein Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden werden [Li 2004]. Aufgrund dieser identischen laborchemischen und klinischen Daten wurden postoperative und primär behandelte Patienten mit Pankreaskarzinom zu einem Kollektiv zusammengefasst. Die weitere Auswertung und die Evaluierung der Therapieeffizienz sowie des progressionsfreien Intervalls erfolgten anhand dieses Gesamtkollektivs.

4.1.4 Therapieansprechen

Beim Pankreaskarzinom ist es schwierig, das Therapieansprechen anhand bildgebender Verfahren zu bewerten. Ausführlich wurde diese Problematik bereits im Kapitel 3.2 erläutert. Deshalb wird die Therapieeffizienz immer häufiger mittels des biologischen Markers CA 19-9 abgeschätzt. Auch alle in diese Studie aufgenommenen Patienten mit Pankreaskarzinom wurden auf den Verlauf dieses Parameters untersucht. Entsprechend den Veränderungen von CA 19-9 wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt. Gemäß den Angaben in der Literatur wurde ein Absinken um mindestens 50% des prätherapeutischen CA 19-9-Wertes als partielle Remission eingestuft [Ishii 1997, Heinemann 1999, Boeck 2006]. Eine Progression der Erkrankung wurde als Erhöhung von CA 19-9 um mindestens 100% definiert [Nishida 1999], wobei dieser Anstieg durch zwei Verlaufskontrollen bestätigt werden musste. Bei Patienten mit gleich bleibender Erkrankung sank CA 19-9 um weniger als die Hälfte ab oder stieg auf weniger als das Doppelte des Ausgangswerts (s. Tab. 8). Als prätherapeutische CA 19-9-Werte wurden die Ergebnisse vor Therapiebeginn herangezogen (Tag 1, 0h). Die posttherapeutischen Werte von CA 19-9 wurden, wie auch in der Literatur angegeben, in einem Zeitraum von bis zu acht Wochen nach Beendigung der Radiochemotherapie ermittelt. Innerhalb dieses zeitlichen Fensters kann davon ausgegangen werden, dass nachwirkende Effekte einer Radiochemotherapie abgeklungen sind.

	Partial Remission (n = 8)	Stable Disease (n = 17)	Progressive Disease (n = 7)
Veränderung von CA 19-9	Abfall ≥ 50 %	Abfall < 50 % oder Anstieg < 100 %	Anstieg ≥ 100 %

Tab. 8: Einteilung des Therapieansprechens aller Pankreas-Patienten anhand der Veränderung des biologischen Markers CA 19-9.

Um die Validität des CA 19-9-Verlaufs als Referenzkriterium für den Erfolg der Radiochemotherapie zu prüfen, wurde in diesem Patientenkollektiv die Veränderung der CA 19-9-Werte mit der Überlebensdauer korreliert. Patienten, die biochemisch keine Progression (Anstieg von CA 19-9 $< 100\%$) zeigten, überlebten signifikant länger als Patienten mit einer biochemischen Progression der Erkrankung (Anstieg von CA 19-9 $\geq 100\%$; $p = 0.025$; s. Abb. 28). Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen Daten. Damit konnte die Einteilung der Patienten anhand des CA 19-9-Verlaufs bezogen auf die therapeutische Effizienz als sinnvoll erachtet werden.

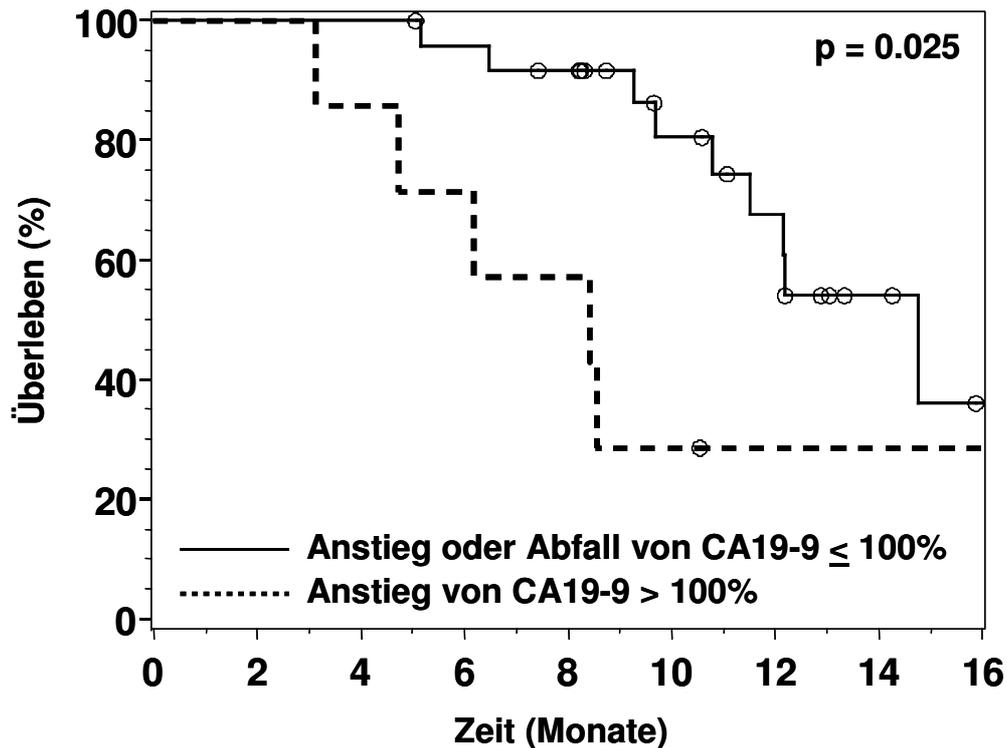


Abb. 28: Prozentualer Anteil überlebender Patienten mit einem CA 19-9-Anstieg um mehr als 100% (Progression) bzw. mit einem Abfall oder Anstieg von CA 19-9 von höchstens 100% (Keine Progression). Patienten mit einer Progression des biologischen Markers CA 19-9 lebten signifikant kürzer, als Patienten ohne Anstieg dieses Parameters über 100% ($p = 0.025$).

Ingesamt erhielten 32 Patienten eine Radiochemotherapie wegen eines Karzinoms der Bauchspeicheldrüse (s. Abb. 29).

- Wie bereits beschrieben erfolgte bei 10 von diesen 32 Patienten die Radiochemotherapie postoperativ. Nach dem Kriterium des CA 19-9-Verlaufs hatten von dieser postoperativ behandelten Gruppe
 - 0 Patienten (0%) eine Remission
 - 8 Patienten (80%) eine gleich bleibende Erkrankung und
 - 2 Patienten (20%) eine Progression
- Die übrigen 22 Patienten wurden primär behandelt. Bei 21 von diesen 22 Patienten war die Behandlung wegen eines nicht mehr operablen Tumors beim primären Staging. Ein Patient wurde aufgrund eines ausschließlichen Lokal-Rezidivs behandelt und daher zu den primär behandelten Patienten

gezählt. Von dieser Gruppe hatten

- 8 Patienten (36%) eine Remission
- 9 Patienten (41%) eine gleich bleibende Erkrankung und
- 5 Patienten (23%) eine Progression

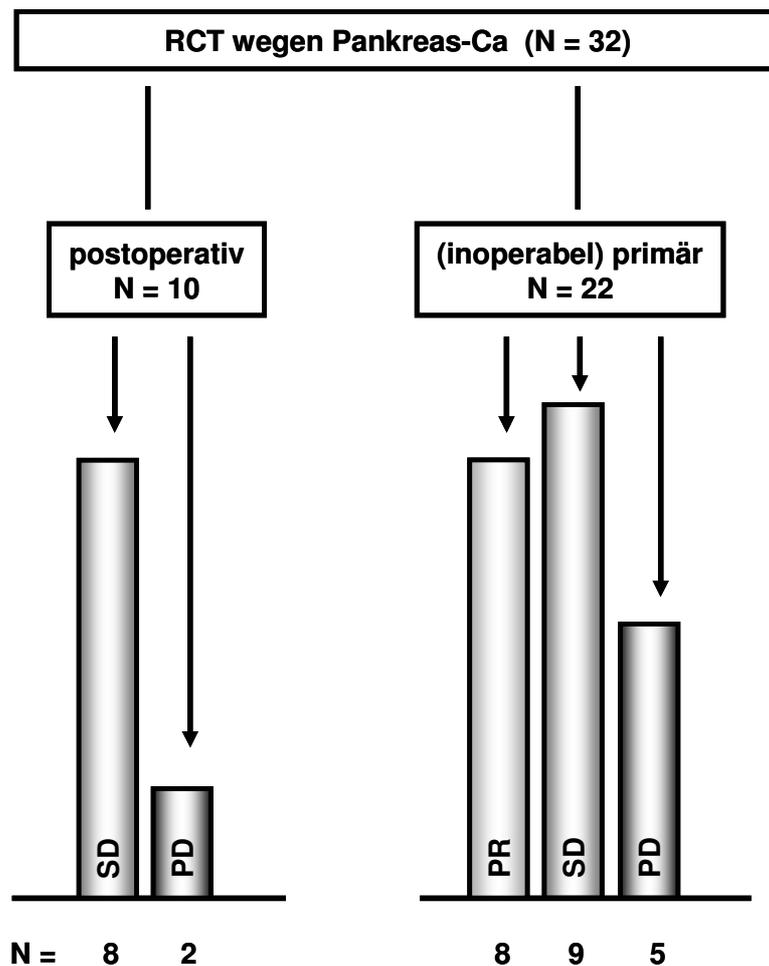


Abb. 29: Einteilung der 32 Patienten mit Pankreaskarzinom entsprechend des Therapieansprechens (ermittelt durch die Veränderungen des biologischen Markers CA 19-9). Unterteilt wurden die Patienten dabei in die jeweilige Therapiegruppe (postoperative versus primäre Radiochemotherapie). PR: Partial Remission; SD: Stable Disease; PD: Progressive Disease.

4.1.4.1 Wöchentliche Werte

Für die weitere Auswertung wurden die Patienten mit Partieller Remission und die mit gleichbleibender Erkrankung zur Gruppe „Keine Progression“ (KP) zusammengefaßt. Die Patientengruppe mit fortschreitender Erkrankung wird als Gruppe „mit Progression“ (P) bezeichnet. In den Abbildungen 30 – 33 wurden zunächst die wöchentlichen Werte der Nukleosomen und der biologischen Marker CYFRA 21-1, CEA und CA 19-9 beider Kollektive miteinander verglichen. Helle Punkte entsprechen Patienten ohne Progression, dunkle Punkte solchen mit Progression. Dabei unterschieden sich die Freisetzungsmuster beider Gruppen nicht signifikant sowohl bei den Konzentrationen von Nukleosomen als auch von den biologischen Markern.

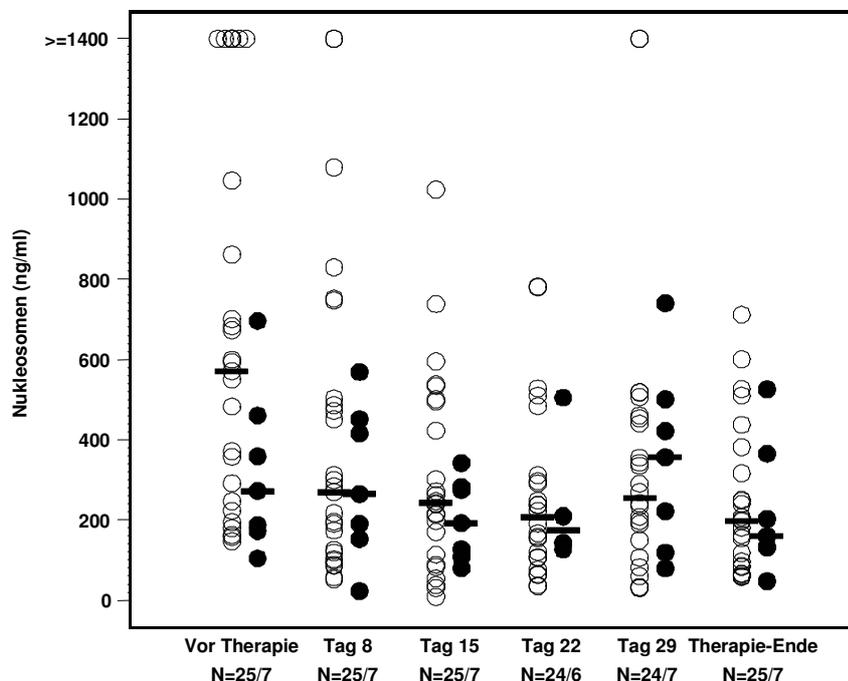


Abb. 30: Wöchentliche Nukleosomenwerte während Radiochemotherapie bei Patienten mit Pankreaskarzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

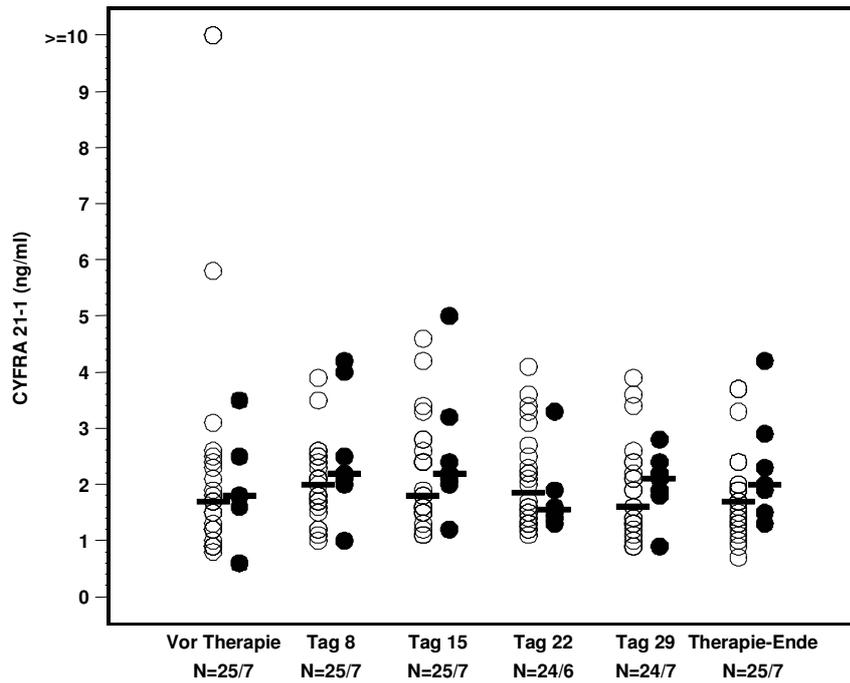


Abb. 31: Wöchentliche CYFRA 21-1-Werte während Radiochemotherapie bei Patienten mit Pankreaskarzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

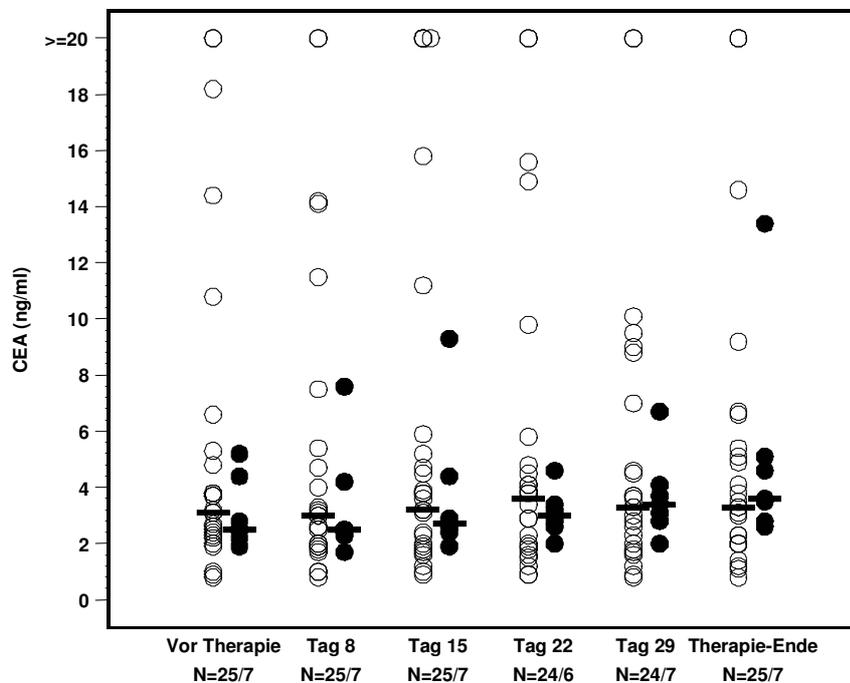


Abb. 32: Wöchentliche CEA-Werte während Radiochemotherapie bei Patienten mit Pankreaskarzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

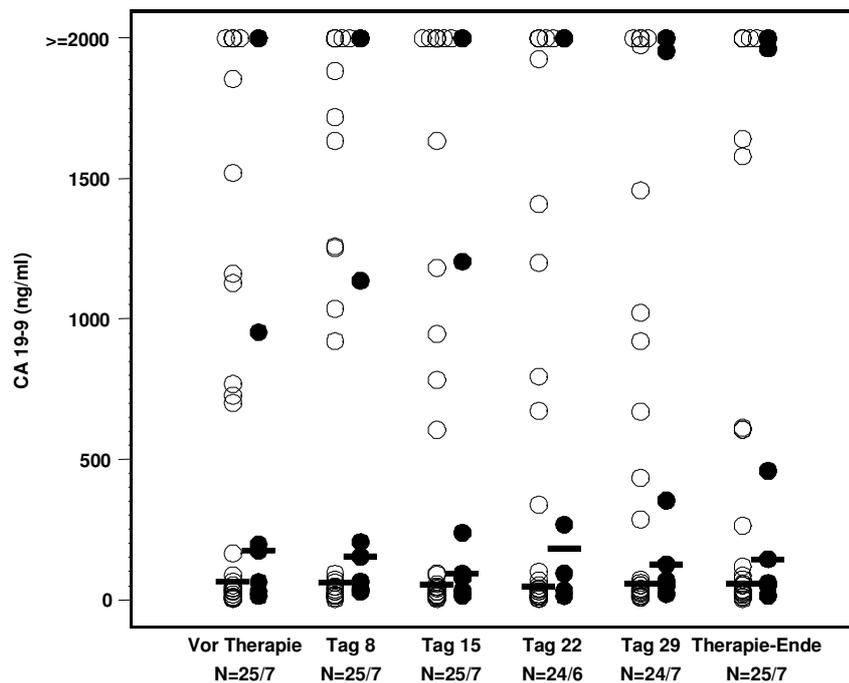


Abb. 33: Wöchentliche CA 19-9-Werte während Radiochemotherapie bei Patienten mit Pankreaskarzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

4.1.4.2 Werte während der ersten Woche

Anschließend wurde das Therapieansprechen mit den Konzentrationen der Nukleosomen während der initialen Therapie korreliert. Die Beurteilung der Therapieeffizienz erfolgte anhand der Veränderungen von CA 19-9 (s. Tab. 8). Nimmt man wiederum den CA 19-9-Anstieg nach Radiochemotherapie als Kriterium für die Krankheitsprogression unter Therapie, dann wiesen Patienten ohne Progression (KP) geringfügig niedrigere Nukleosomenwerte auf als Patienten mit Progression (P). Dies gilt für den sechs Stundenwert (Median: 210 ng/ml; KP: 50% > Median, P: 67% > Median; $p = 0.590$), den Wert am Tag 1 (Median: 345 ng/ml; KP: 48% > Median; P: 67% > Median; $p = 0.411$), den Wert am Tag 2 (Median: 373 ng/ml; KP: 50% > Median; P: 57% > Median; $p = 0.745$) und besonders für die Fläche unter der Kurve der ersten drei Tage (AUC 1-3; Median: 325 ng/ml; KP: 44% > Median; P: 100% > Median; $p = 0.073$). Allerdings handelte es sich nur um eine grenzwertige Signifikanz (s. Abb. 34).

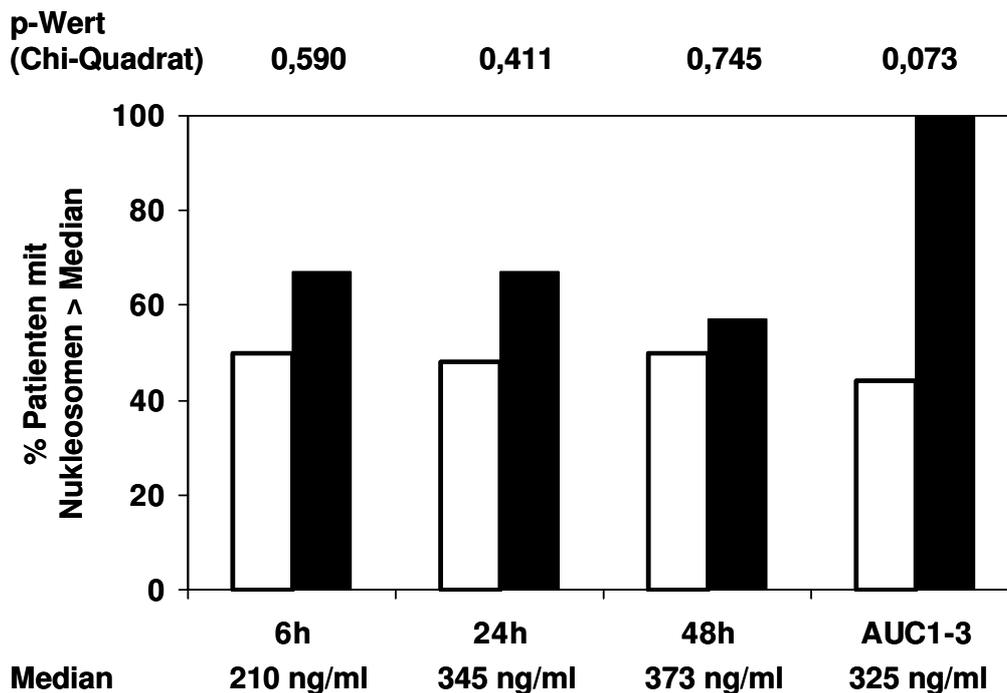


Abb. 34: Prozentsatz der Patienten mit erhöhten Nucleosomenwerten nach Radiochemotherapie, unterteilt nach Patienten ohne Progression und mit Progression. Auf der Abszisse ist die Zeit seit Beginn der Radiochemotherapie bzw. die Fläche unter der Kurve der Nucleosomenwerte während der ersten drei Tage aufgetragen. Die Höhe der Säulen gibt den Prozentsatz der Patienten an, deren Nucleosomenwerte über dem zugehörigen Medianwert aller Patienten lagen. Die diskriminierende Stärke für beide Gruppen wird durch den p-Wert (Chi-Quadrat) aufgezeigt für die Nucleosomenkonzentrationen 6 (Tag 1, 6h), 24 (Tag 2) und 48 (Tag 3) Stunden nach Therapiebeginn und für die Fläche unter der Kurve (AUC 1-3), welche alle Variablen der initialen Therapie integriert.

Analog zu den wöchentlichen Werten wurden alle Einzelwerte der ersten drei Behandlungstage sowie die Flächen unter der Kurve dieses Zeitraums (AUC 1-3) für Nucleosomen, CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 in den Graphiken 35 – 38 zusammengefasst. Helle Punkte entsprechen Patienten ohne Progression, dunkle Punkte solchen mit Progression. Dabei unterschieden sich die Freisetzungsmuster beider Gruppen weder signifikant bei den biologischen Markern noch bei den Nucleosomen. Lediglich die AUC 1-3 der Nucleosomen lag bei allen Patienten mit einem Progress oberhalb des Medians (s. Abb. 34). Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Wilcoxon-Tests berechnet.

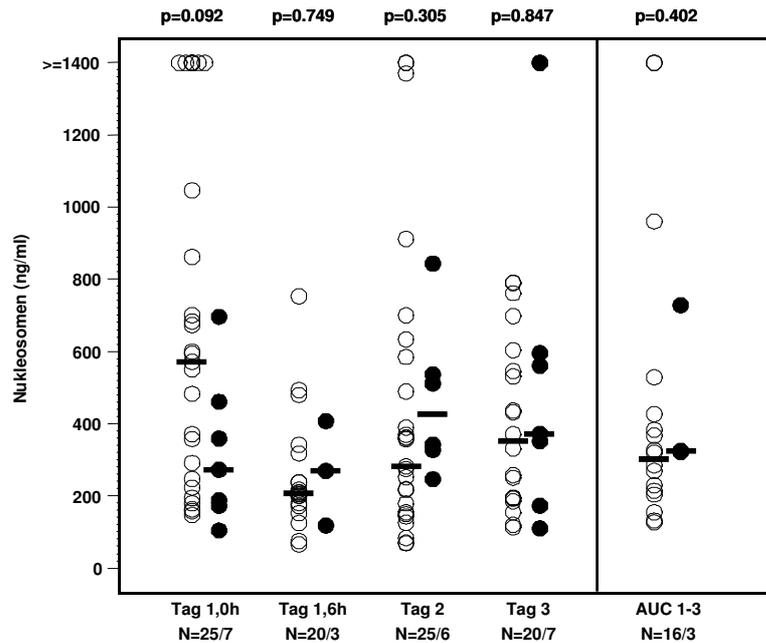


Abb. 35: Verteilung der Nukleosomenkonzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in präoperativ behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,402$ (Wilcoxon-Test).

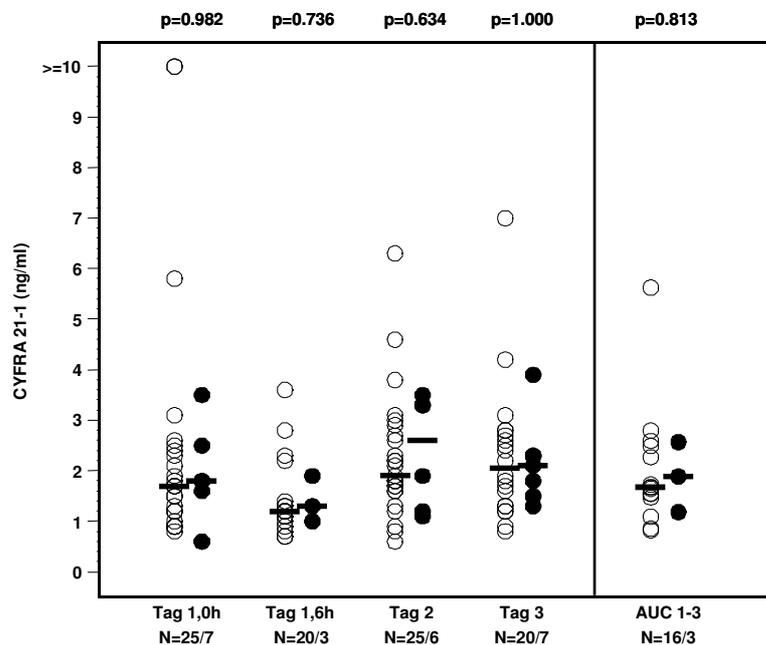


Abb. 36: Verteilung der CYFRA 21-1-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in präoperativ behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,813$ (Wilcoxon-Test).

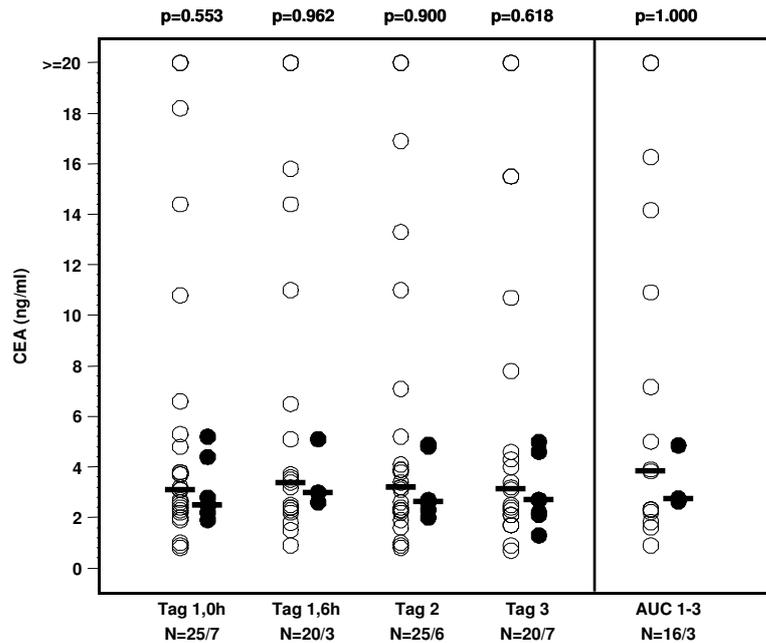


Abb. 37: Verteilung der CEA-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in präoperativ behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 1,000$ (Wilcoxon-Test).

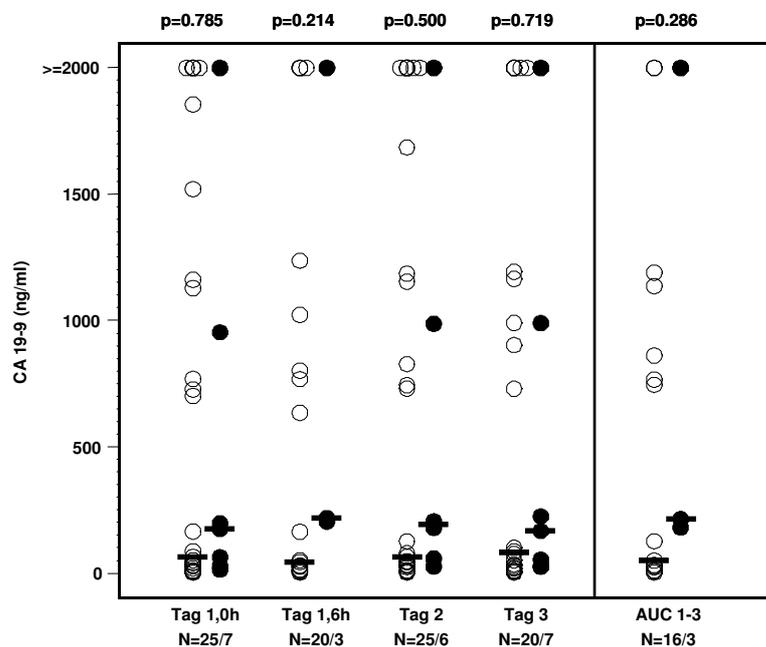


Abb. 38: Verteilung der CA 19-9-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in präoperativ behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,286$ (Wilcoxon-Test).

4.1.5 Progressionsfreies Intervall

Während sich das Therapieansprechen auf den Zeitraum der Therapie bezieht, beinhaltet das progressionsfreie Intervall den Zeitraum bis zum Fortschreiten der Grunderkrankung im Anschluß an die Therapie. Da die Wirkung der Therapie sich in einigen Fällen erst nach Therapieende vollends manifestiert, ist die Bewertung des progressionsfreien Intervalls, also des Zeitraums bis zum Auftreten einer Progression beim Pankreaskarzinom, möglicherweise aussagekräftiger. Das progressionsfreie Intervall wurde definiert als Zeitraum ohne Anstieg des prätherapeutischen CA 19-9-Wertes um mehr als 100%. Bezogen auf das progressionsfreie Intervall wiesen 15 der 32 Patienten während des Beobachtungszeitraums keine Progression ihrer Grunderkrankung auf (Median: 9,7 Monate). Bei 17 Patienten kam es im Anschluß an die Therapie zu einem Anstieg des CA 19-9-Wertes über 100%. Alle Patienten mit einem Progress des biologischen Markers entwickelten systemische Metastasen innerhalb des Beobachtungszeitraums (Median: 6,1 Monate). Die Beobachtungszeit aller Patienten lag zwischen 1,7 und 16 Monaten.

Die Fläche unter der Kurve der Tage 1 bis 3 (AUC 1-3) integriert über alle während der initialen Therapiephase gemessenen Nukleosomenwerte eines Patienten. Es zeigte sich, dass diese Fläche die frühzeitige Abschätzung des progressionsfreien Intervalls ermöglicht. Eine AUC 1-3 kleiner als der Median (325 ng/ml) korrespondierte bei den entsprechenden Patienten mit einem signifikant längeren progressionsfreien Intervall verglichen mit denjenigen Patienten, die höhere Werte aufzeigten ($p = 0.008$; s. Abb. 39).

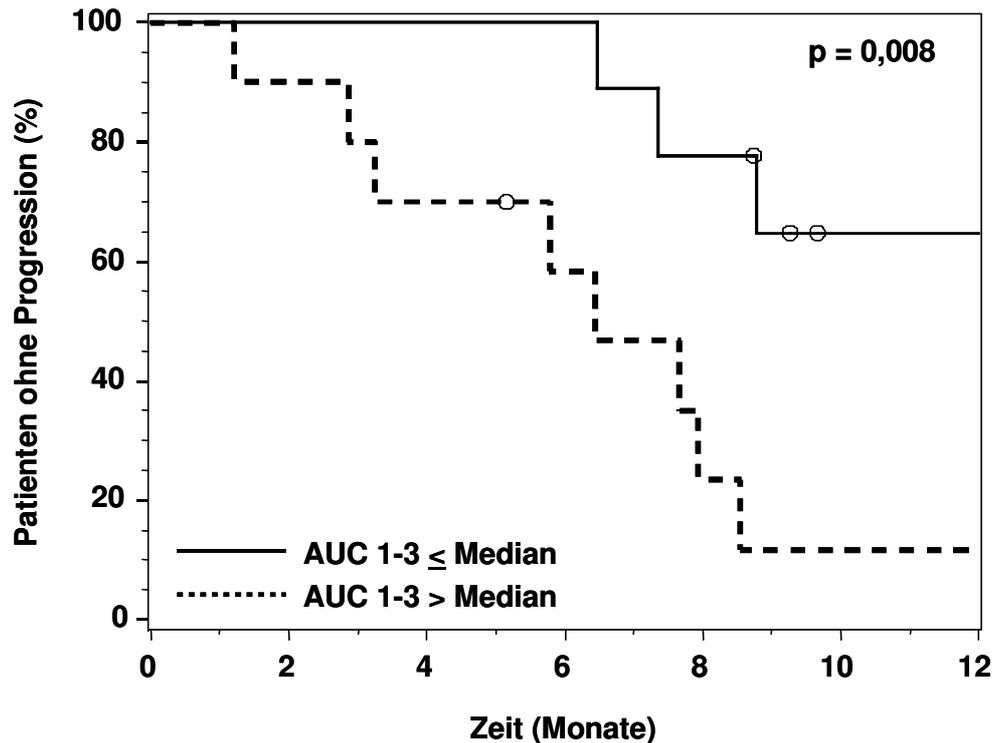


Abb. 39: Anteil progressionsfrei bleibender Patienten gegenüber der Zeit seit Beginn der Radiochemotherapie, unterteilt nach Patienten mit $AUC\ 1-3 \leq Median$ (durchgezogene Linie) bzw. $AUC\ 1-3 > Median$ (gestrichelte Linie). Patienten mit Werten unterhalb des Medians wiesen ein signifikant längeres progressionsfreies Intervall auf, als solche mit Werten oberhalb des Medians.

Zur weiteren Veranschaulichung dieser Daten zeigen die Abbildungen 40 und 41 typische Verläufe der Nukleosomenkonzentrationen und der CA 19-9 Werte während Radiochemotherapie je eines Patienten mit langem und kurzem progressionsfreiem Intervall. So zeigt die Graphik 40 einen Patienten mit niedriger Fläche unter der Kurve ($AUC\ 1-3$) und langem progressionsfreiem Intervall. Im Gegensatz dazu erlitt der in Abbildung 36 dargestellte Patient mit hoher $AUC\ 1-3$ einen frühen Progress seiner malignen Grunderkrankung.

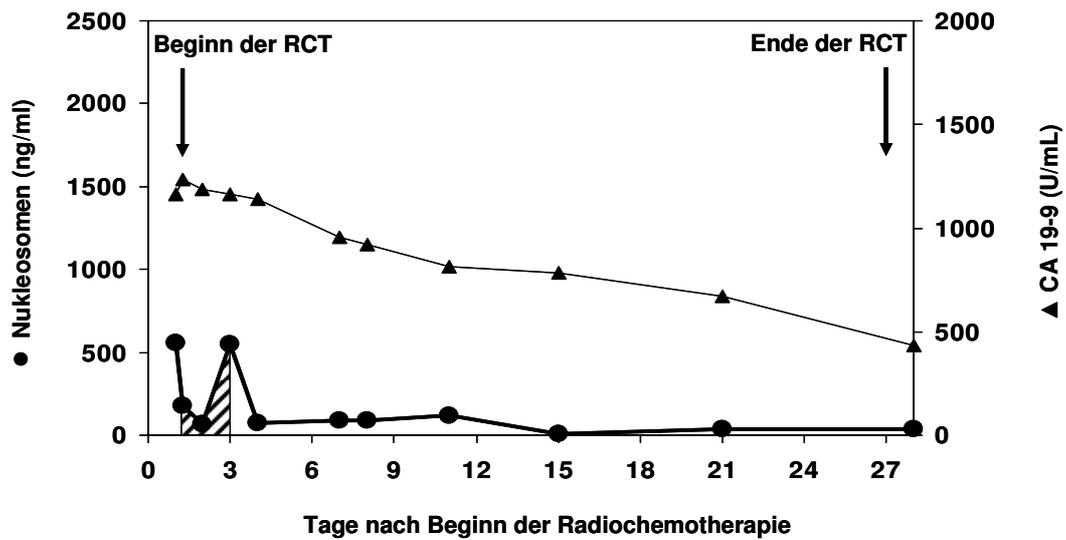


Abb. 40: Verlauf der Nukleosomenkonzentration eines Patienten mit Pankreaskarzinom unter primärer Radiochemotherapie mit langem progressionsfreien Intervall. Auf der linken Ordinate sind die Konzentrationen für Nukleosomen, auf der rechten die für CA 19-9 aufgetragen.

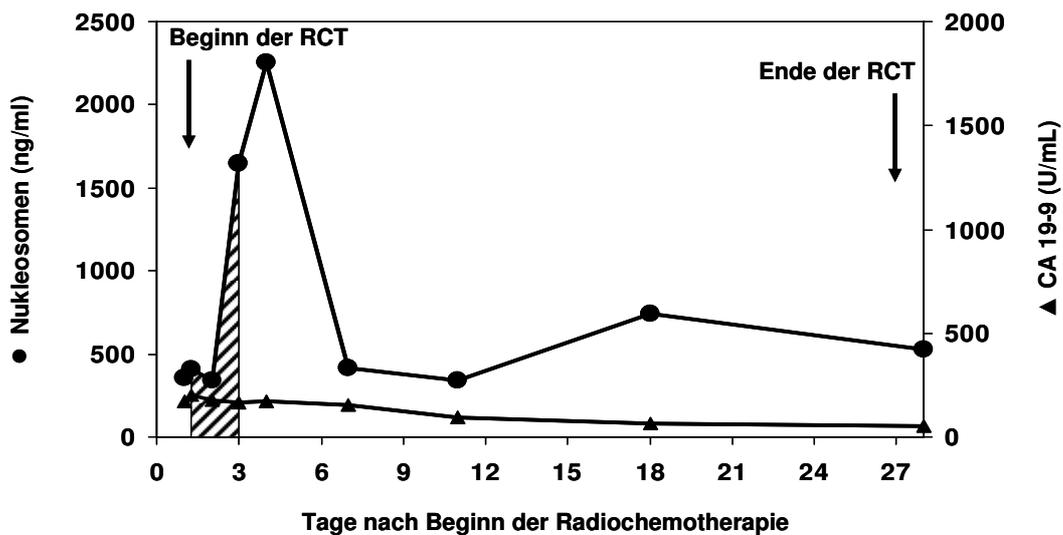


Abb. 41: Verlauf der Nukleosomenkonzentration eines Patienten mit Pankreaskarzinom unter primärer Radiochemotherapie mit kurzem progressionsfreien Intervall. Auf der linken Ordinate sind die Konzentrationen für Nukleosomen, auf der rechten die für CA 19-9 aufgetragen.

4.2 Nukleosomen- und Tumormarker-Konzentrationen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

Untersucht wurden 25 Patienten, die wegen eines Karzinoms des Dickdarms eine Radiochemotherapie erhielten. Analog den Patienten mit Pankreaskarzinom erfolgten Blutabnahmen vor Beginn der Therapie, sechs Stunden nach der ersten Bestrahlung, täglich während der ersten Woche, einmal wöchentlich in den folgenden Wochen und nach Abschluss der Therapie. In allen Proben wurden ebenfalls die Konzentrationen von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 gemessen. Zunächst wurde erneut auf das Freisetzungsmuster vor Therapiebeginn (Tag 1, 0h) fokussiert.

4.2.1 Freisetzungsmuster vor Start der Therapie

Die Freisetzung von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 vor Beginn einer Radiochemotherapie sind den Abbildungen 42 bis 45 zu entnehmen. Bei dieser Darstellung der Werte als dot-plot-Graphiken wurden jeweils die drei Therapiegruppen, adjuvante (N = 4), neoadjuvante (N = 13) und Rezidiv-Radiochemotherapie (N = 8), miteinander verglichen.

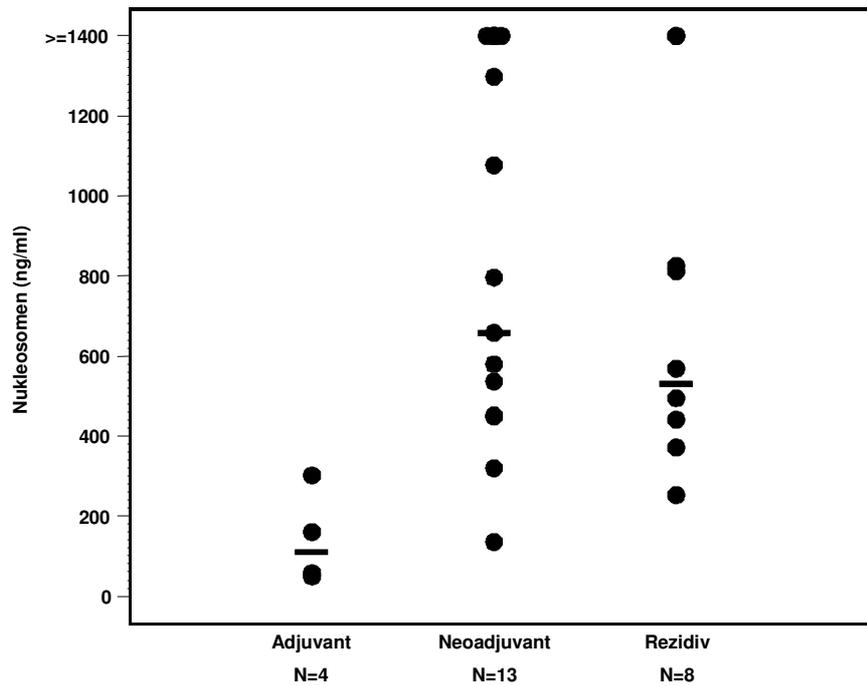


Abb. 42: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unterteilt nach adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie.

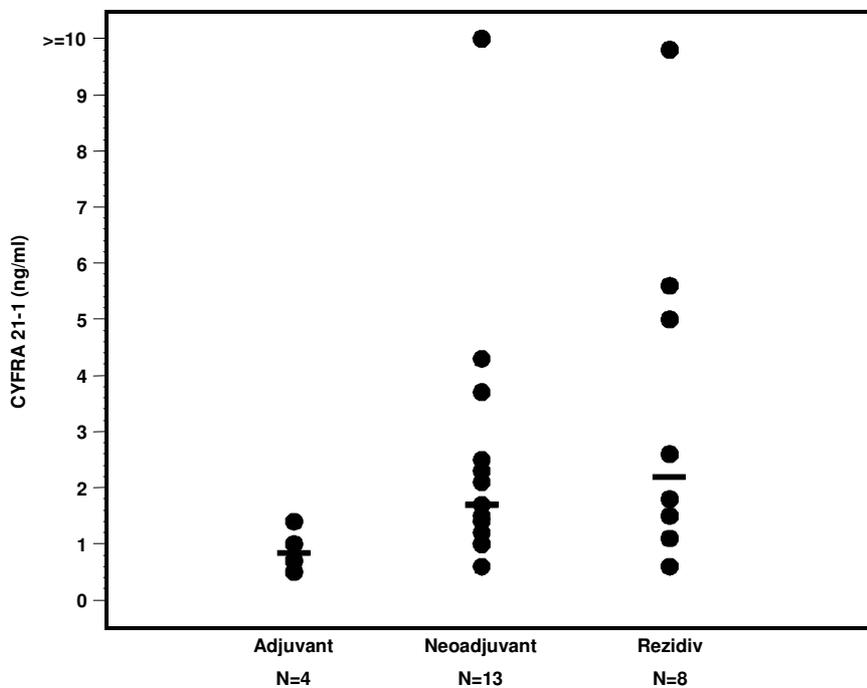


Abb. 43: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unterteilt nach adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie.

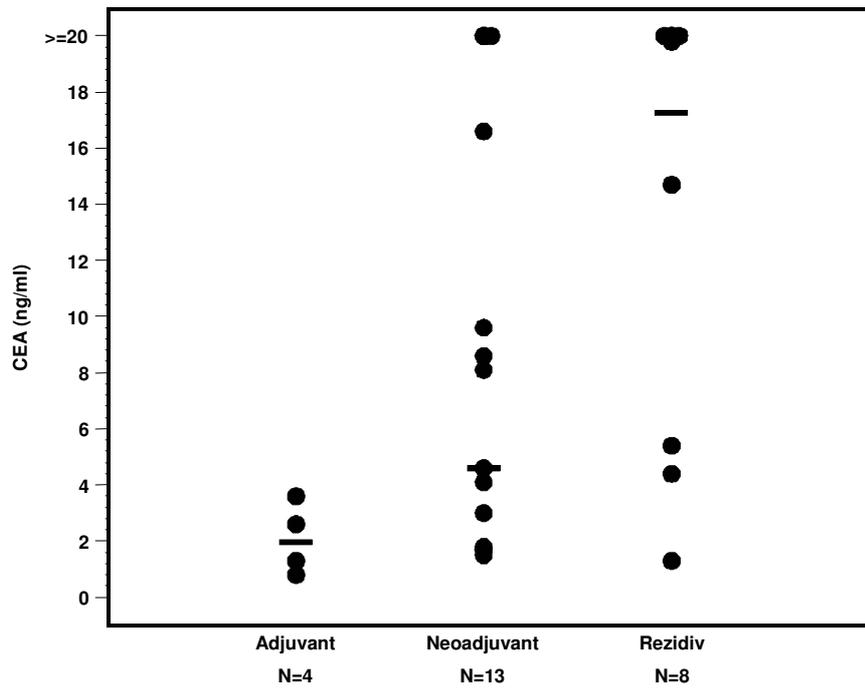


Abb. 44: CEA-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unterteilt nach adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie.

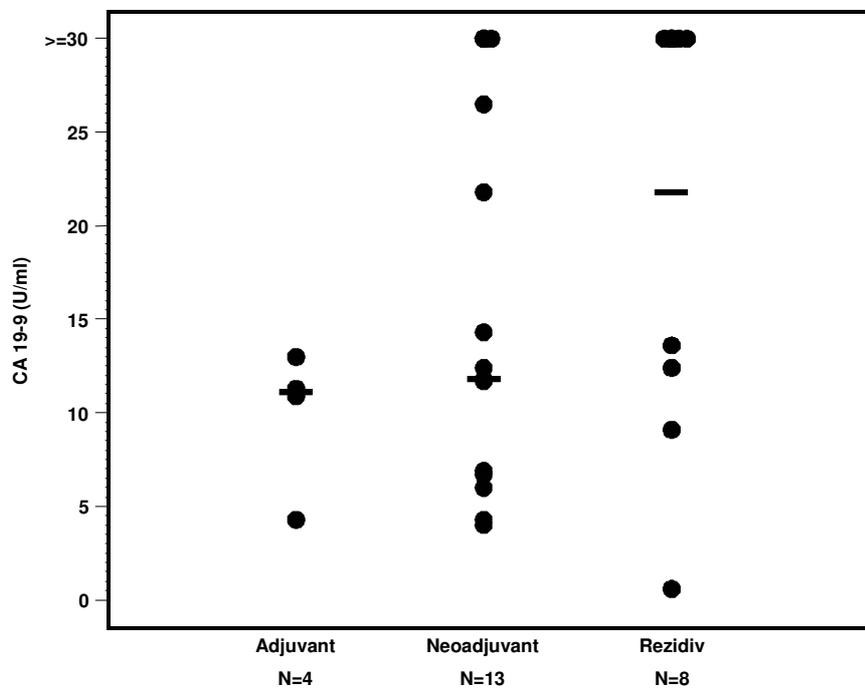


Abb. 45: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane vor Therapiebeginn bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unterteilt nach adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie.

4.2.2 Freisetzungsmuster unter Therapie

4.2.2.1 Wöchentliche Werte

Zunächst wurden bei den Patienten mit kolorektalem Karzinom die wöchentlichen Werte von Nukleosomen sowie der Tumormarker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 genauer analysiert. In den folgenden Graphiken sind sowohl alle wöchentlichen Einzelwerte als auch die Mediane im Verlauf der Radiochemotherapie in Form von dot-plots dargestellt (s. Abb. 46 – 57). Nacheinander folgen die Abbildungen der drei Therapiegruppen. Zuerst Patienten während neoadjuvanter, anschließend unter adjuvanter und zuletzt unter Rezidiv-Radiochemotherapie. An dieser Stelle soll nochmals auf die Mediane und Grenzwerte für Nukleosomen und Tumormarker eines gesunden Kontrollkollektivs, die in Tab. 5 übersichtlich zusammengefasst sind, hingewiesen werden.

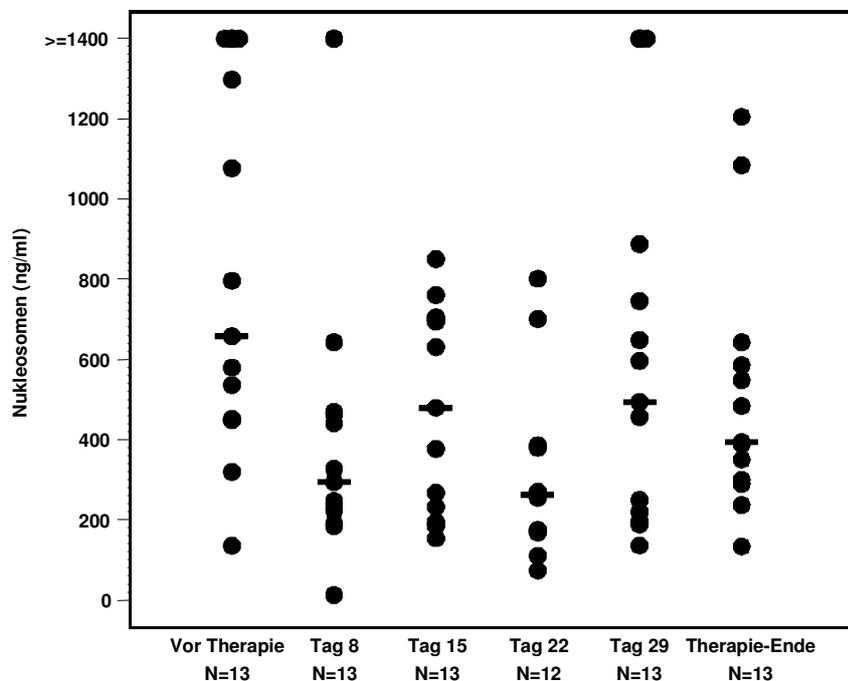


Abb. 46: Wöchentliche Nukleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während neoadjuvanter Radiochemotherapie.

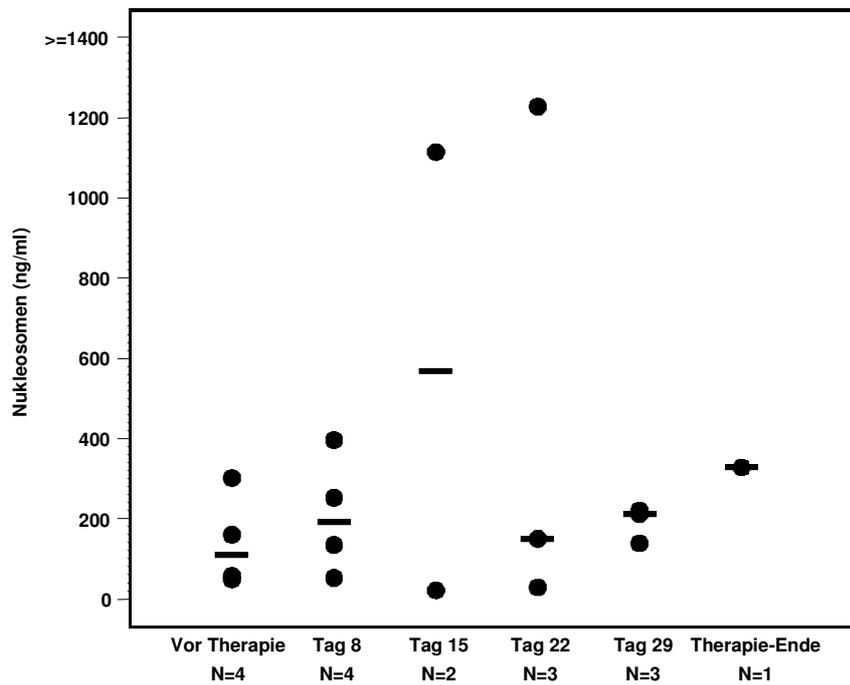


Abb. 47: Wöchentliche Nukleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

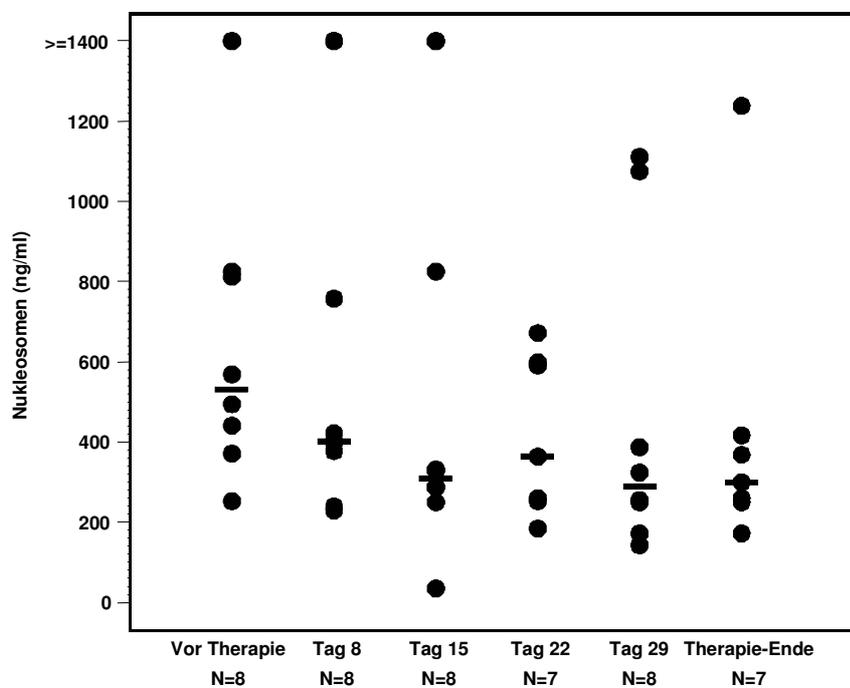


Abb. 48: Wöchentliche Nukleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während Rezidiv-Radiochemotherapie.

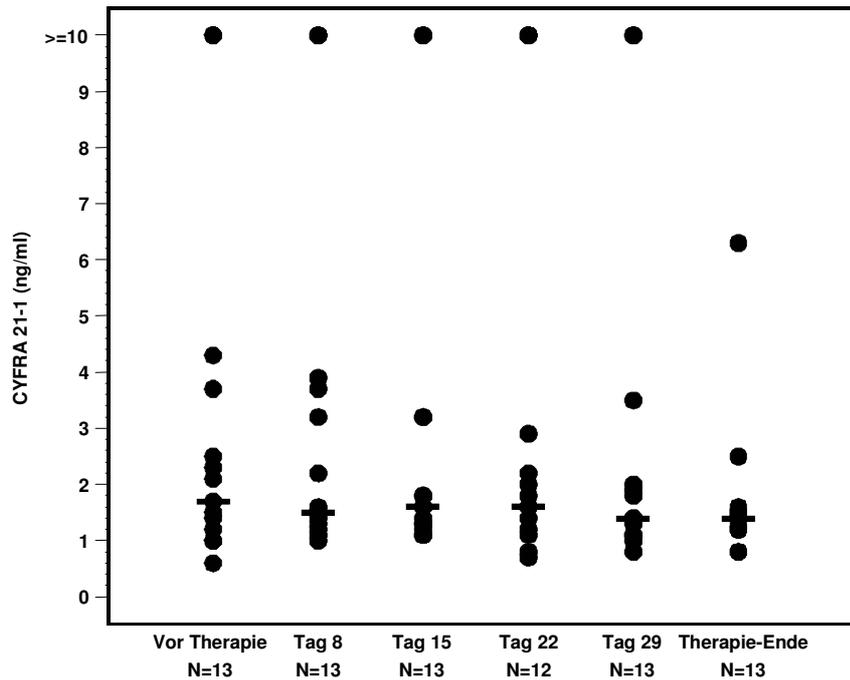


Abb. 49: Wöchentliche CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während neoadjuvanter Radiochemotherapie.

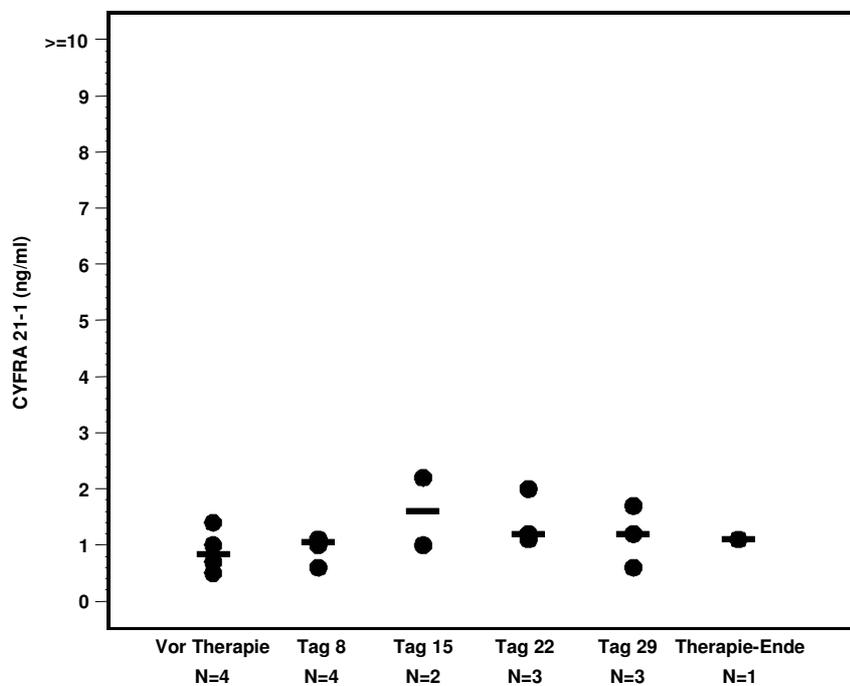


Abb. 50: Wöchentliche CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

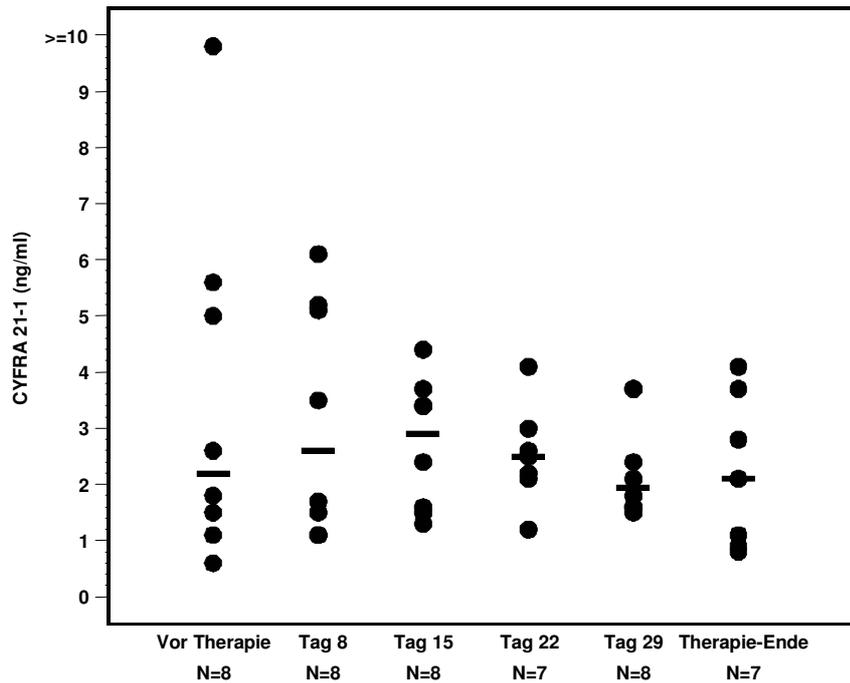


Abb. 51: Wöchentliche CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während Rezidiv-Radiochemotherapie.

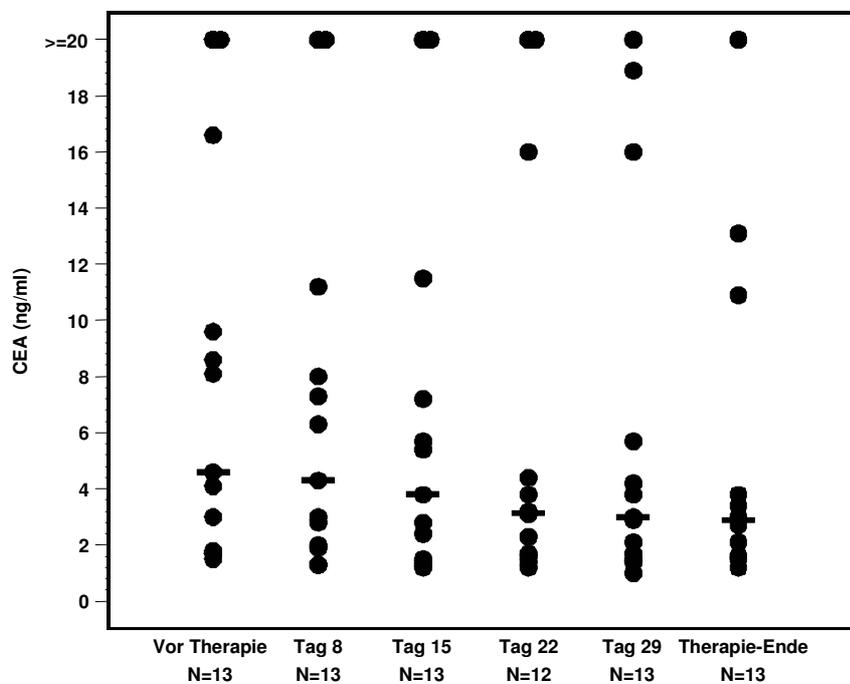


Abb. 52: Wöchentliche CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während neoadjuvanter Radiochemotherapie.

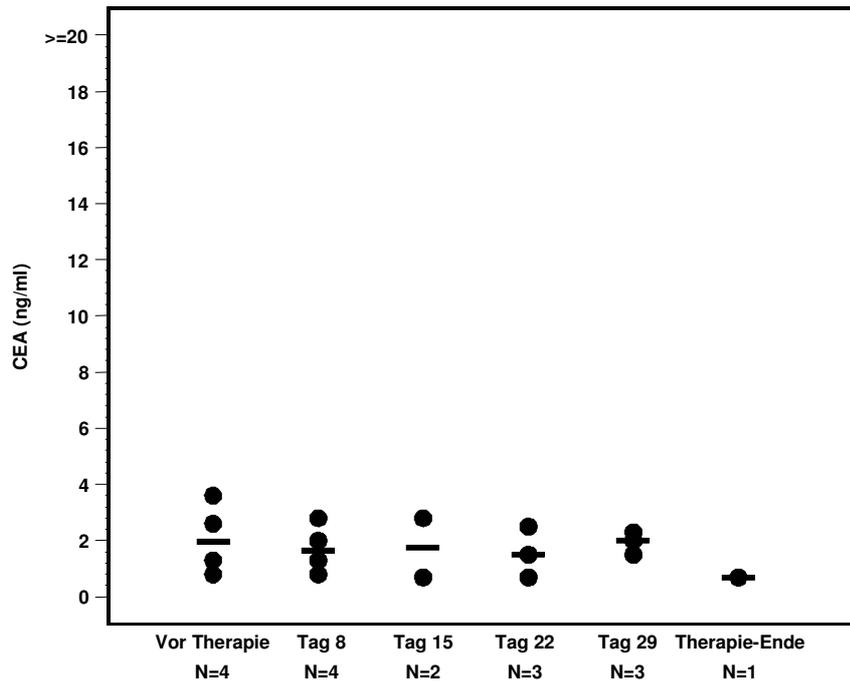


Abb. 53: Wöchentliche CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit Pankreaskarzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

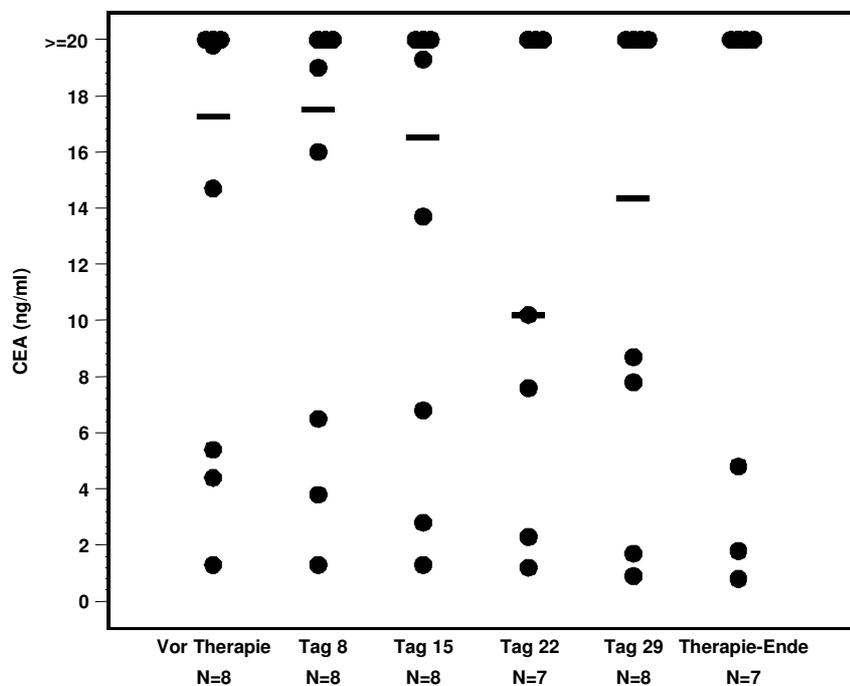


Abb. 54: Wöchentliche CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während Rezidiv-Radiochemotherapie.

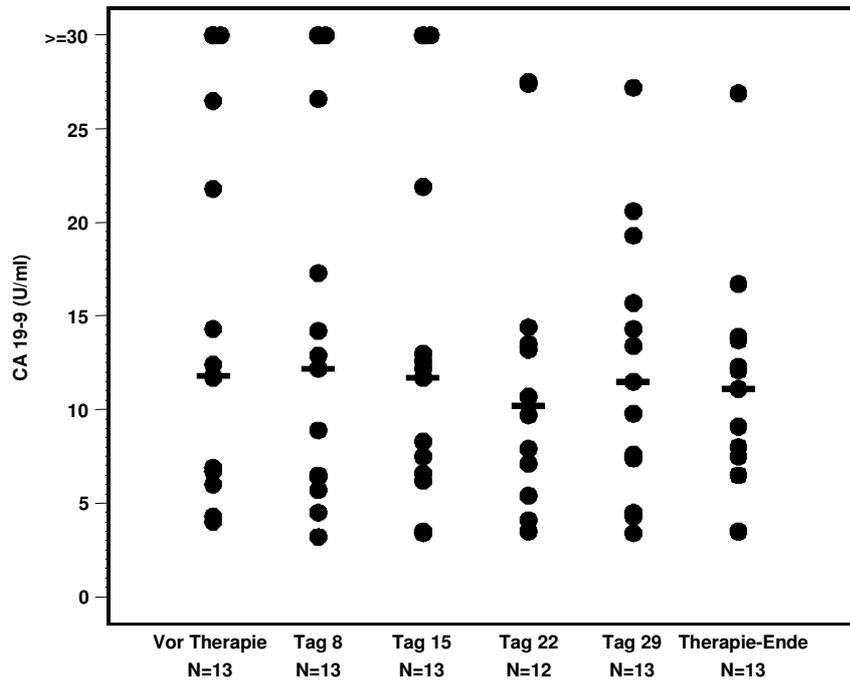


Abb. 55: Wöchentliche CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während neoadjuvanter Radiochemotherapie.

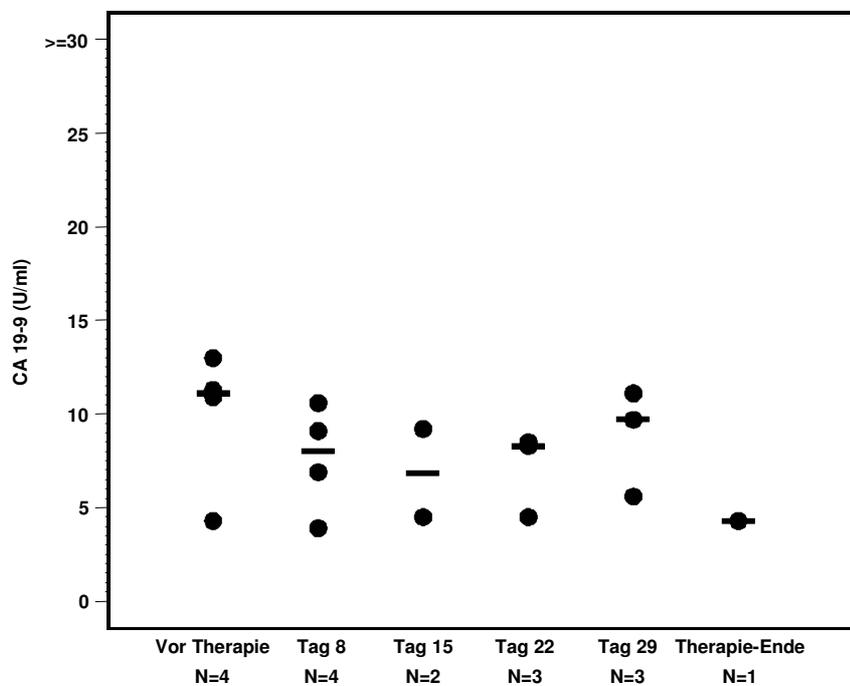


Abb. 56: Wöchentliche CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unter adjuvanter Radiochemotherapie.

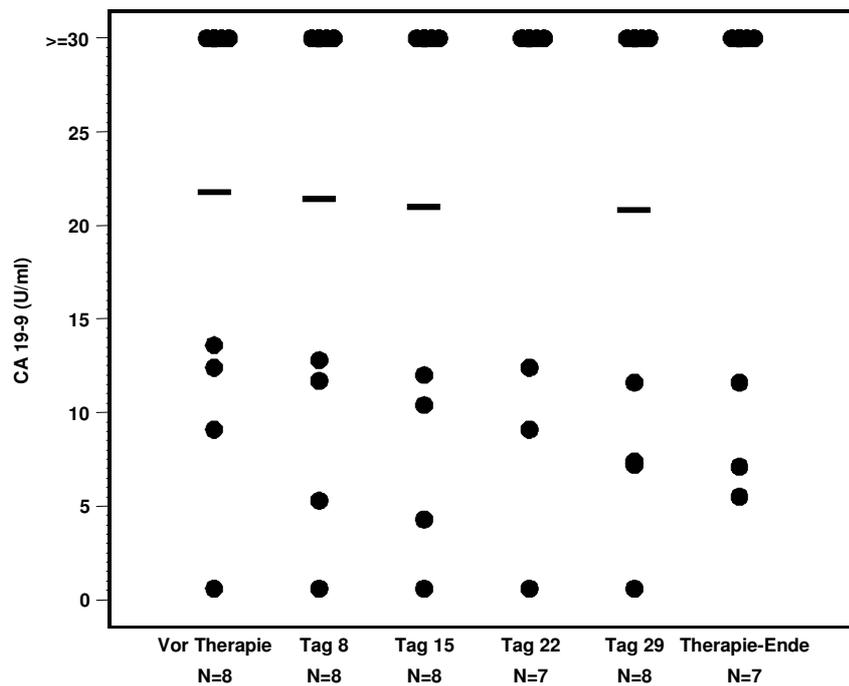


Abb. 57: Wöchentliche CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während Rezidiv-Radiochemotherapie.

	Nukleosomen [ng/ml]	CEA [ng/ml]	CYFRA 21-1 [ng/ml]	CA 19-9 [U/ml]
Neoadjuvante RCT (N = 13)				
Vor Therapie (Tag 1, 0h)	658 (136-2521)	4.6 (1.5-43.3)	1.7 (0.6-39.4)	11.8 (4.0-65.4)
1. Woche	294 (13.0-2181)	4.3 (1.3-45.6)	1.5 (1.0-28.3)	12.2 (3.2-53.5)
2. Woche	480 (154-850)	3.8 (1.2-44.9)	1.6 (1.1-11.9)	11.7 (3.4-51.4)
3. Woche	262 (74.1-801)	3.2 (1.2-45.2)	1.6 (0.7-12.3)	10.2 (3.5-27.5)
4. Woche	494 (136-1780)	3.0 (1.0-65.1)	1.4 (0.8-10.0)	11.5 (3.4-27.2)
Therapie-Ende	394 (134-1205)	2.9 (1.2-39.3)	1.4 (0.8-6.3)	11.1 (3.5-26.9)

Fortsetzung der Tabelle	Nukleosomen [ng/ml]	CEA [ng/ml]	CYFRA 21-1 [ng/ml]	CA 19-9 [U/ml]
Adjuvante RCT (N = 4)				
Vor Therapie (Tag 1, 0h)	109 (49.2-302)	2.0 (0.8-3.6)	0.9 (0.5-1.4)	11.1 (4.3-13.0)
1. Woche	194 (52.9-397)	1.7 (0.8-2.8)	1.1 (0.6-1.1)	8.0 (3.9-10.6)
2. Woche	568 (21.9-1115)	1.8 (0.7-2.8)	1.6 (1.0-2.2)	6.9 (4.5-9.2)
3. Woche	151 (29.4-1228)	1.5 (0.7-2.5)	1.2 (1.1-2.0)	8.3 (4.5-8.5)
4. Woche	212 (139-221)	2.0 (1.5-2.3)	1.2 (0.6-1.7)	9.7 (5.6-11.1)
Therapie-Ende	328 (328-328)	0.7 (0.7-0.7)	1.1 (1.1-1.1)	4.3 (4.3-4.3)
Rezidiv RCT (N = 8)				
Vor Therapie (Tag 1, 0h)	532 (253-2095)	17.3 (1.3-117)	2.2 (0.6-9.8)	68.8 (0.6-532)
1. Woche	400 (229-1894)	17.5 (1.3-118)	2.6 (1.1-6.1)	59.4 (0.6-605)
2. Woche	309 (35.3-1506)	16.5 (1.3-118)	2.9 (1.3-4.4)	63.0 (0.6-499)
3. Woche	364 (185-672)	10.2 (1.2-129)	2.5 (1.2-4.1)	92.7 (0.6-474)
4. Woche	290 (143-1111)	17.4 (0.9-152)	2.0 (1.5-3.7)	51.5 (0.6-615)
Therapie-Ende	300 (172-1238)	26.3 (0.8-129)	2.1 (0.8-4.1)	57.7 (5.5-474)

Tab. 9: Mediane und Schwankungsbereiche von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 der Patienten mit neoadjuvanter, adjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie. Es sind die Werte vor der Therapie (Tag 1, 0h), die wöchentlichen Werte und die Werte nach Therapie-Ende aufgelistet.

Alle wöchentlichen Werte für Nukleosomen sowie die biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 sind nochmals in Tabelle 9 übersichtlich zusammengefaßt. Dargestellt sind Mediane und Schwankungsbereiche der jeweiligen Parameter. Wie auch in den dot-plot-Abbildungen wird hierbei ersichtlich, dass Patienten, denen eine neoadjuvante oder Rezidiv-Radiochemotherapie appliziert wurde, sowohl bei

Nukleosomen und biologischen Markern höhere Absolutwerte sowie höhere Mediane ausweisen. Teilweise setzen Patienten mit einem lokoregionalen Tumorrezidiv noch höhere Konzentrationen an Nukleosomen bzw. biologischen Markern frei.

4.2.2.2 Werte während der ersten Woche

Analog zu den Pankreaskarzinomen wurde speziell auf die erste Woche einer Radiochemotherapie fokussiert. In diesem Zeitraum erfolgte eine Blutentnahme sechs Stunden (Tag 1, 6h) nach der ersten Bestrahlung und täglich an den darauf folgenden Tagen. Die folgenden Abbildungen fassen diesen Zeitraum sortiert nach Marker und Therapiegruppe übersichtlich zusammen (s. Abb. 58 – 69). Zunächst werden alle Einzelwerte von Nukleosomen sowie der biologischen Marker für Patienten dargestellt, die mittels einer neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelt wurden. Zu jedem Parameter folgen die Werte von Patienten, die nach Tumorresektion eine adjuvante Radiochemotherapie erhielten. Zuletzt sind die dot-plots aller Patienten mit Tumorrezidiv abgebildet.

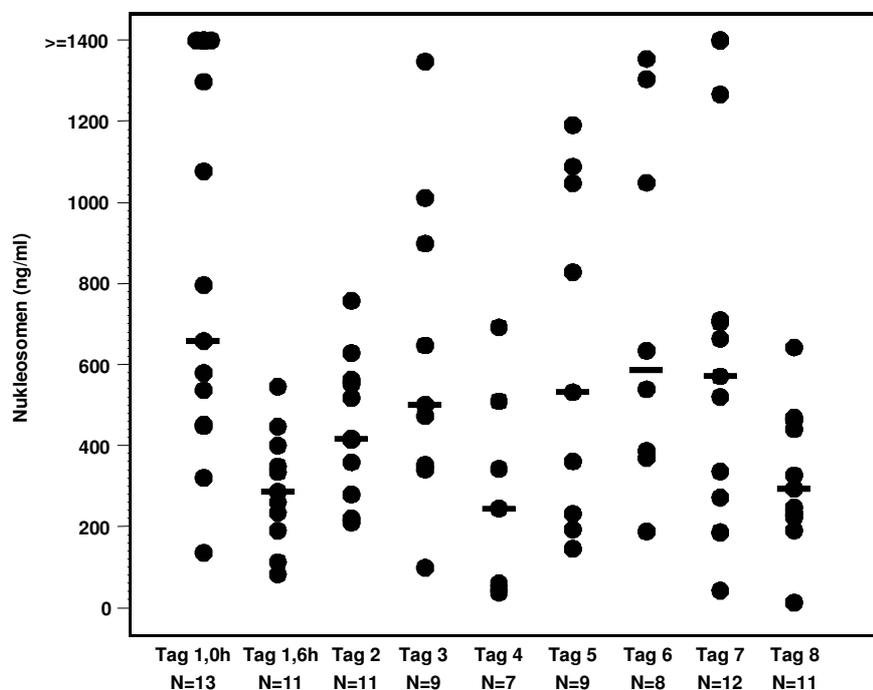


Abb. 58: Nukleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

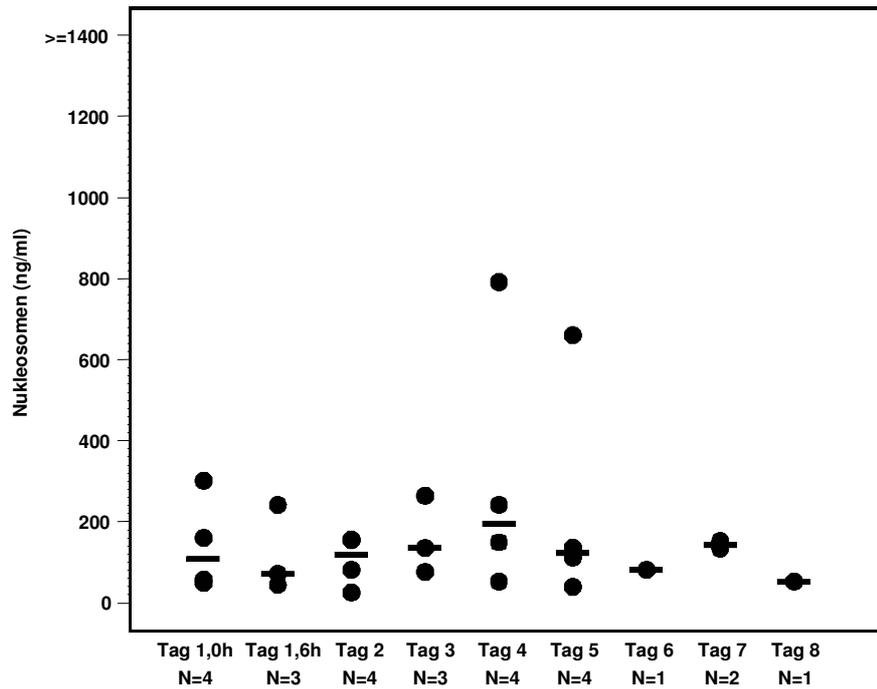


Abb. 59: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

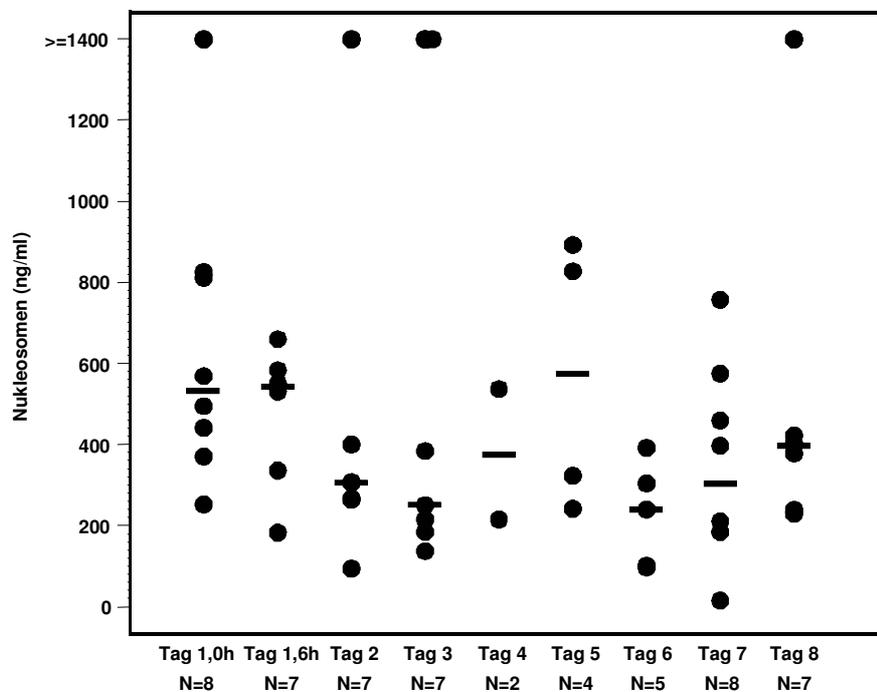


Abb. 60: Nucleosomen-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer Rezidiv-Radiochemotherapie.

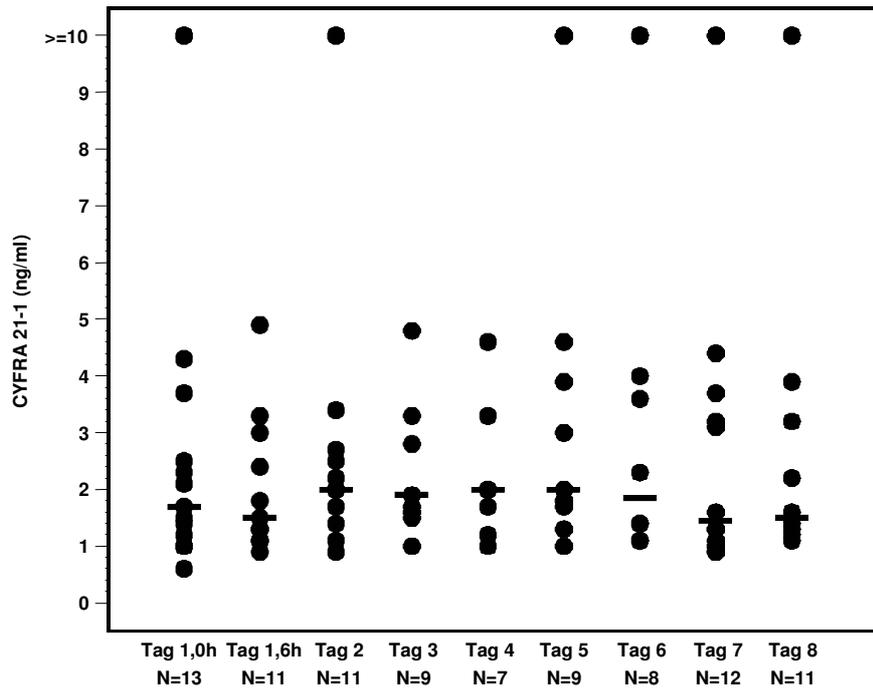


Abb. 61: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

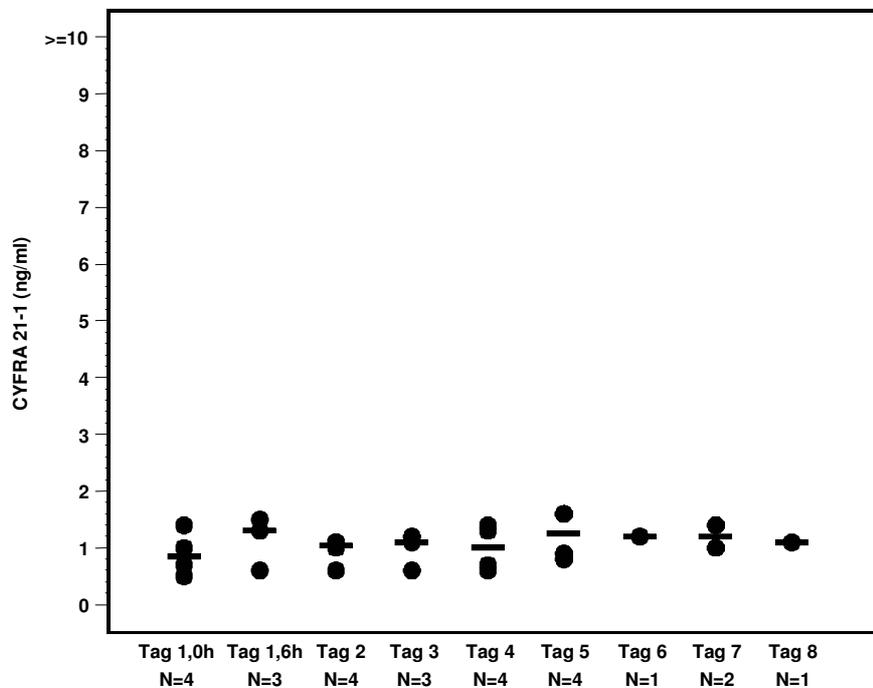


Abb. 62: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

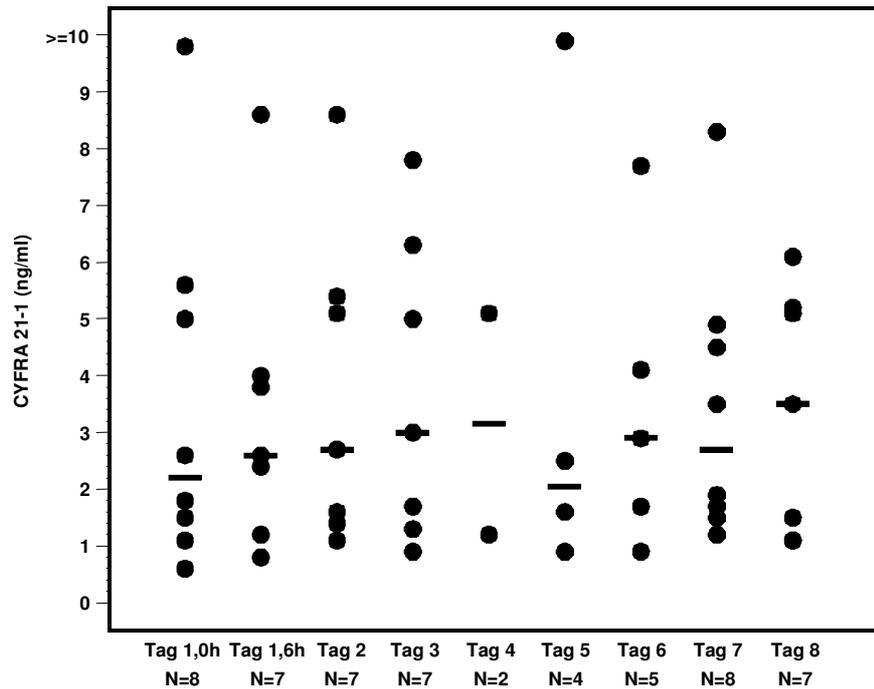


Abb. 63: CYFRA 21-1-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer Rezidiv-Radiochemotherapie.

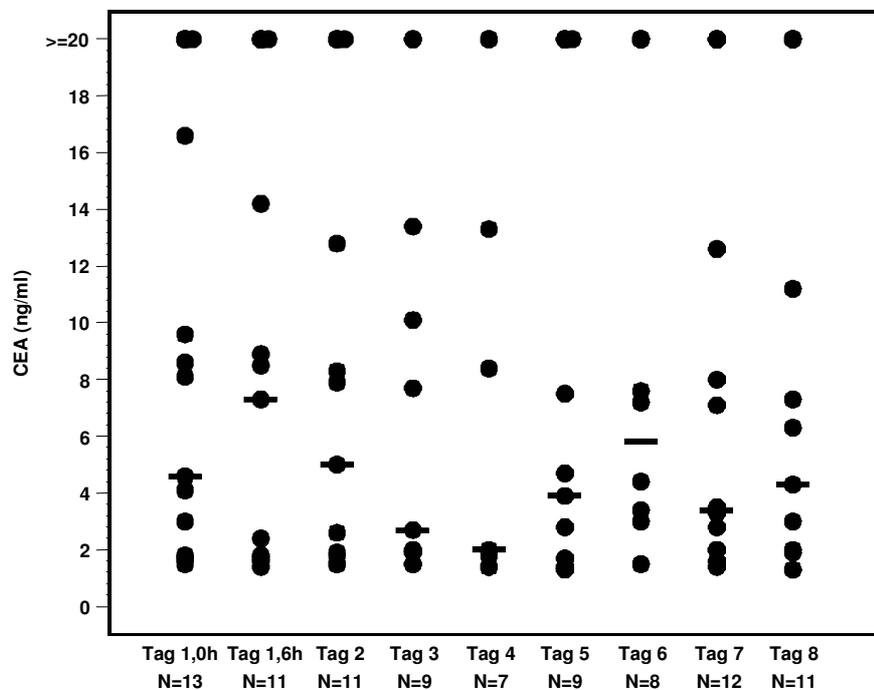


Abb. 64: CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

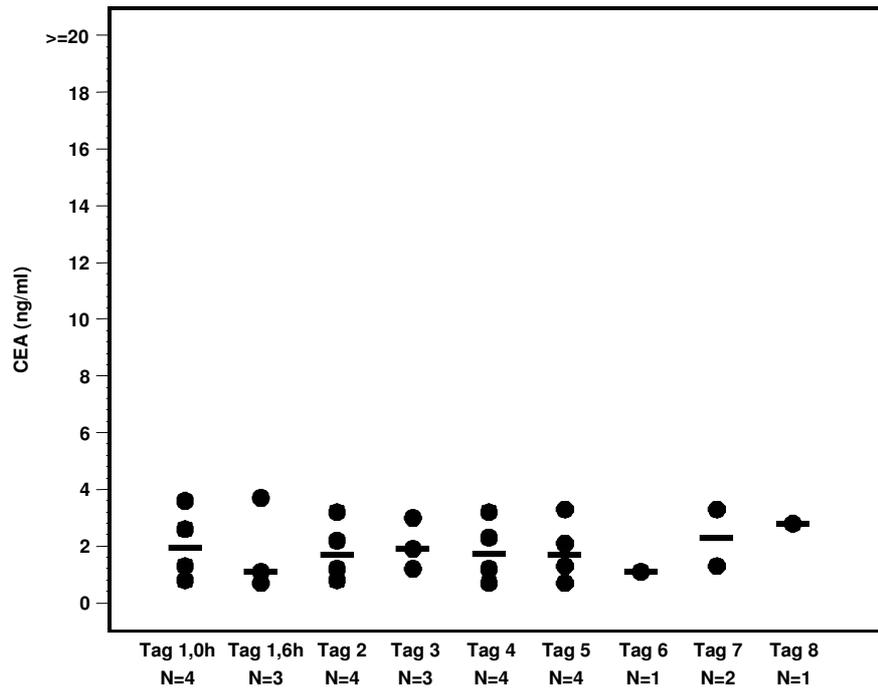


Abb. 65: CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

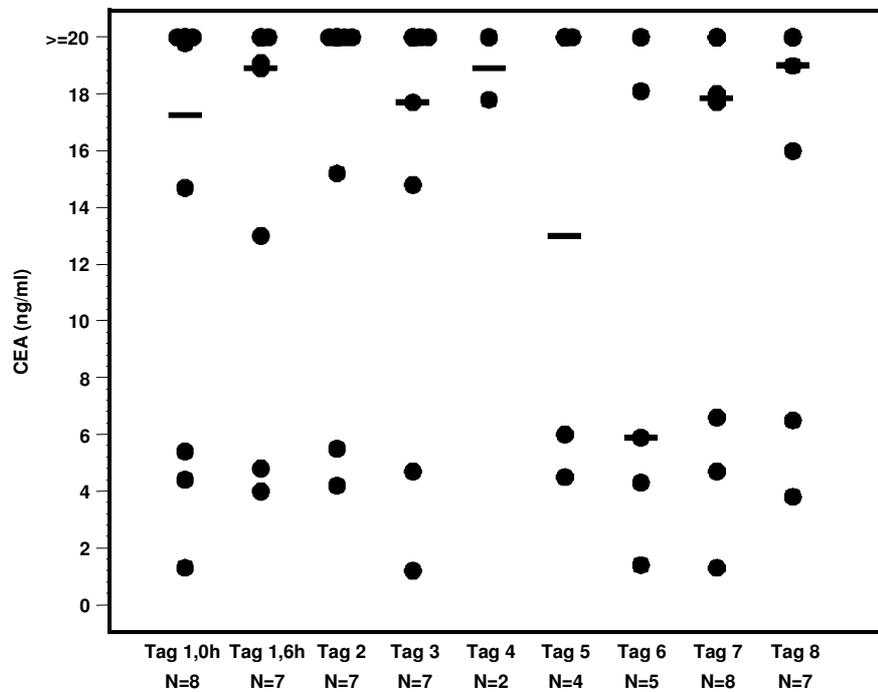


Abb. 66: CEA-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer Rezidiv-Radiochemotherapie.

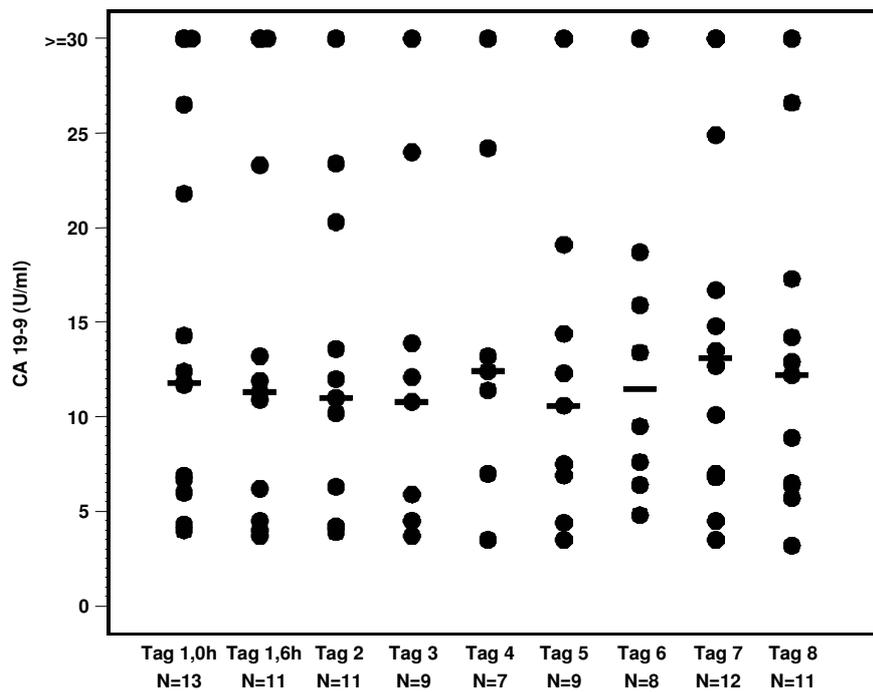


Abb. 67: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

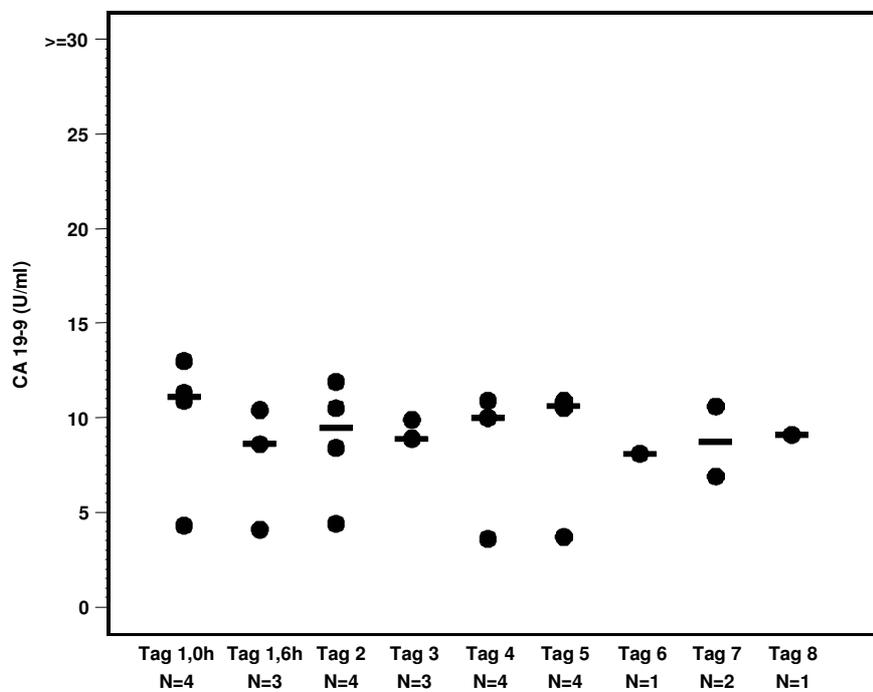


Abb. 68: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer adjuvanten Radiochemotherapie.

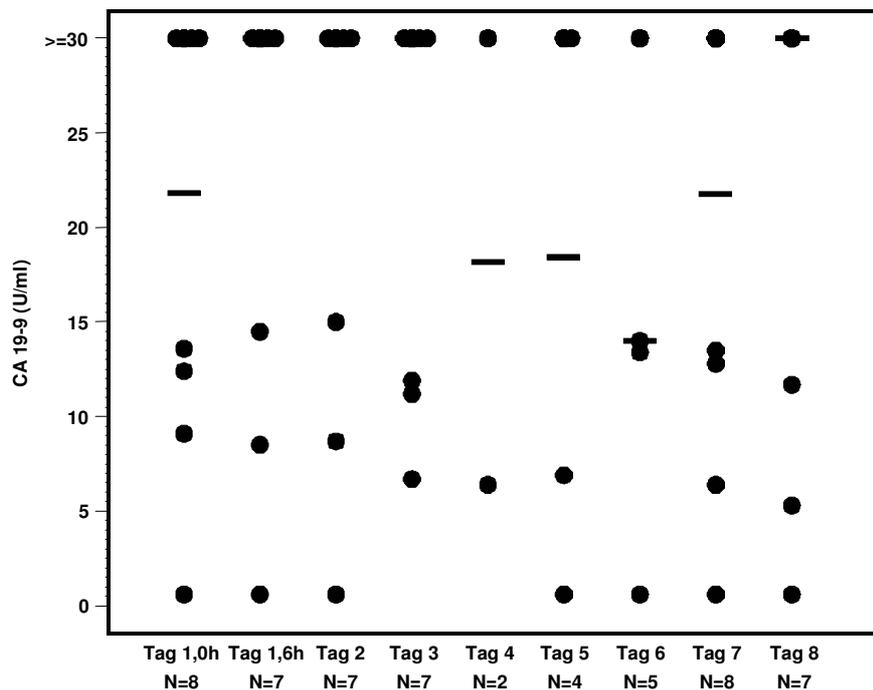


Abb. 69: CA 19-9-Einzelwerte und Mediane bei Patienten mit kolorektalem Karzinom innerhalb der ersten Woche einer Rezidiv-Radiochemotherapie.

4.2.3 Vergleich der Therapiegruppen

Insgesamt erhielten 25 Patienten eine Radiochemotherapie wegen eines Karzinoms des Dick- oder Mastdarms.

- Bei 4 von diesen 25 Patienten erfolgte die Radiochemotherapie adjuvant (postoperativ) nach vollständiger Tumorresektion (R0-Resektion).
- Eine neoadjuvante (präoperative) Radiochemotherapie erhielten 13 Patienten. Der Tumor wurde bei dieser Gruppe einige Wochen nach Beendigung der Therapie reseziert.
- Acht Patienten wurden mit einer Rezidiv-Radiochemotherapie behandelt. In diesen Fällen handelte es sich ausschließlich um Patienten mit lokoregionalem Tumorrezidiv.

In den folgenden drei Abbildungen sind Nukleosomen- und Tumormarkerverläufe jeweils von einem Patienten während adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie exemplarisch abgebildet. Um alle Parameter in einer Abbildung darstellen zu können, wurden die Konzentrationen von Nukleosomen und biologischer Marker jeweils durch den Median gesunder Personen geteilt und logarithmisch aufgetragen. Die Mediane gesunder Personen betragen für Nukleosomen 14 ng/ml, für CEA 1,3 mg/ml, 0,7 ng/ml für CYFRA 21-1 und 3,1 U/ml für CA 19-9. Patienten, die nach vollständiger Resektion des Tumors, mit einer adjuvanten Therapie behandelt wurden, setzten nur geringe Mengen an Nukleosomen vor und während der Therapie frei. Der Anstieg während der ersten Woche fiel lediglich geringfügig aus (s. Abb. 70).

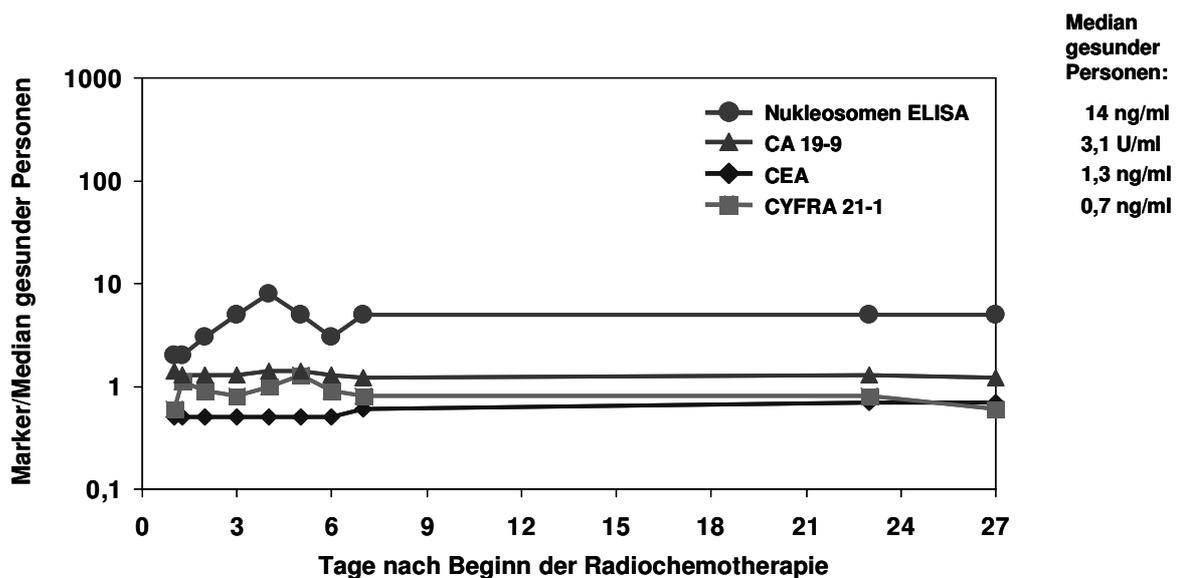


Abb. 70: Logarithmische Darstellung der Verläufe von Nukleosomen und Tumormarker bei einem Patienten mit Rektumkarzinom (pT3, pN0, M0, G3) während einer adjuvanten Radiochemotherapie.

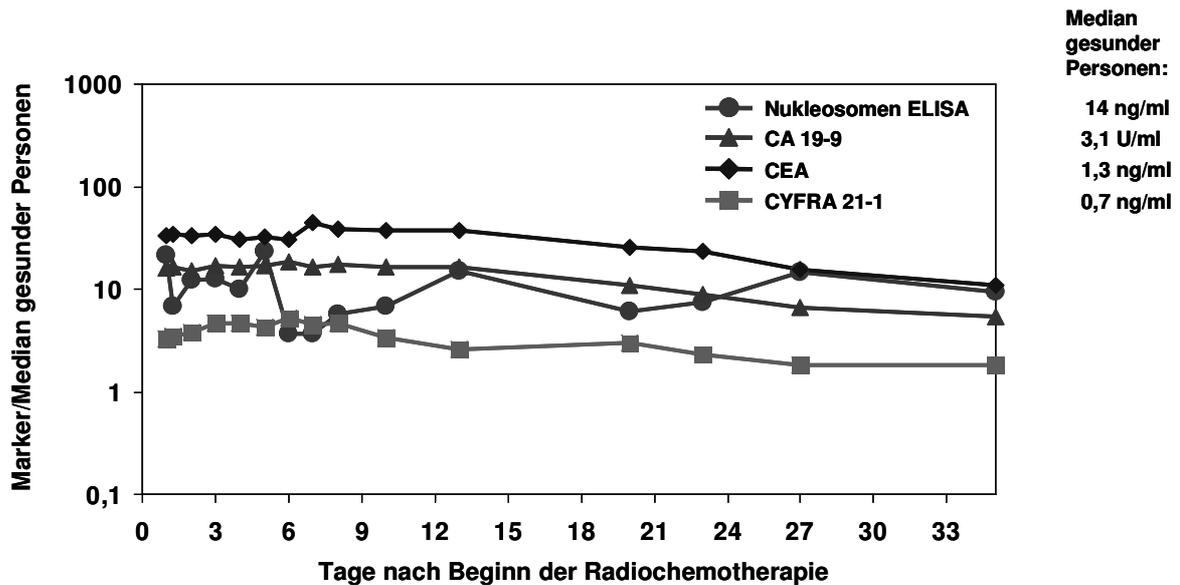


Abb. 71: Logarithmische Darstellung der Verläufe von Nucleosomen und Tumormarker bei einem Patienten mit Rektumkarzinom (T3, N1, M0, G3) während einer neoadjuvanten Radiochemotherapie.

Deutlich höhere Konzentrationen an Nucleosomen und stärkere Anstiege wurden bei Patienten beobachtet, die eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhielten. Ähnlich den Verläufen bei den Patienten mit Pankreaskarzinomen, fielen die Konzentrationen der Nucleosomen nach sechs Stunden deutlich ab. In den folgenden Tagen erhöhten sich die Nucleosomenwerte rasch und erreichten meist innerhalb der ersten Woche ein Maximum. Exemplarisch wird dies in Abbildung 71 aufgezeigt.

Bei Patienten mit lokoregionalem Rezidiv der Grunderkrankung wurden teilweise noch höhere Nucleosomenkonzentrationen gemessen (s. Abb. 72). Signifikant unterschied sich die Höhe der Nucleosomenfreisetzung zwischen adjuvant und neoadjuvant behandelten Patienten, sowie zwischen Patienten mit adjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie (s. Tab. 10).

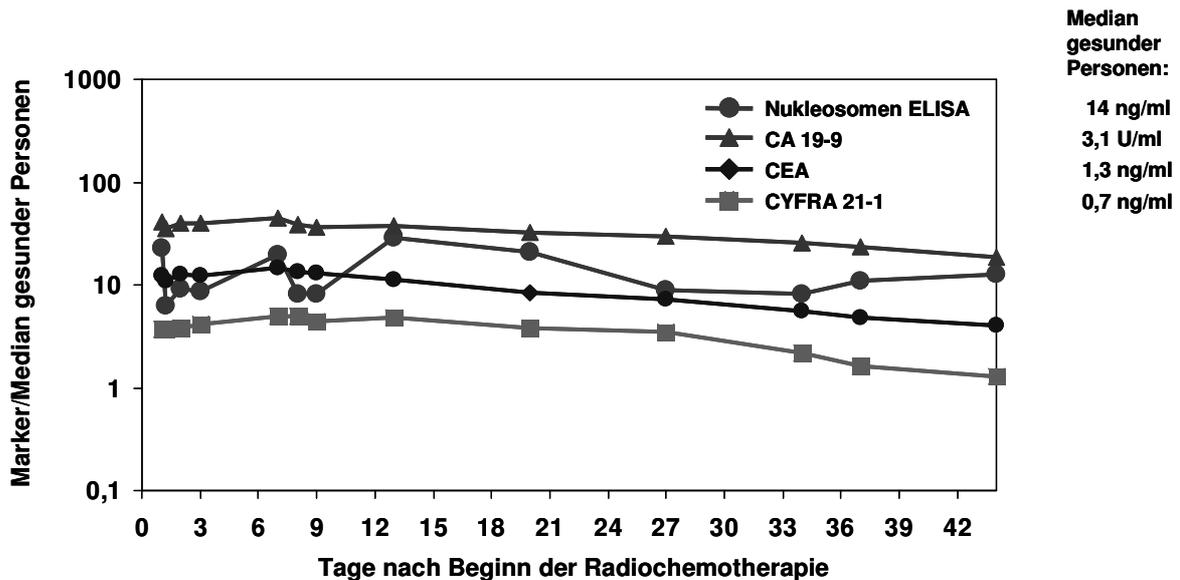


Abb. 72: Logarithmische Darstellung der Verläufe von Nucleosomen und Tumormarker bei einem Patienten mit Rektumkarzinom (T3, N0, M0, G3) während einer Rezidiv-Radiochemotherapie.

Zwischen adjuvant und neoadjuvant behandelten Patienten wurden signifikante Unterschiede bei der Freisetzung von Nucleosomen und der tumorassoziierten Antigene CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 beobachtet. Nach vollständiger Tumorresektion wurden im Serum von Patienten während der adjuvanten Radiochemotherapie deutlich niedrigere Wertlagen gemessen. Neoadjuvant therapierte Patienten mit noch vorhandenen Tumormassen wiesen im Vergleich deutlich höhere Konzentrationen vor allem für Nucleosomen, aber auch für CEA und CYFRA 21-1 auf. Die Wertlagen der biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 waren teils noch stärker erhöht bei Patienten, die an einem Tumorrezidiv litten im Vergleich zu den neoadjuvant behandelten Patienten. Die Tabellen 10 und 11 geben Mediane und Schwankungsbereiche von Nucleosomen sowie der biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 während der ersten drei Tage einer Radiochemotherapie detailliert wieder.

	Nukleosomen [ng/ml]	CEA [ng/ml]	CYFRA 21-1 [ng/ml]	CA 19-9 [U/ml]
Neoadjuvante RCT (N = 13)				
Tag 1, 0h	658 (136-2521)	4.6 (1.5-43.3)	1.7 (0.6-39.4)	11.8 (4.0-65.4)
Tag 1, 6h	287 (89-547)	7.3 (1.4-45.2)	1.5 (0.9-4.9)	11.3 (3.7-59.7)
Tag 2	419 (212-760)	5.0 (1.5-45.5)	2.0 (0.9-36.9)	11.0 (3.9-47.1)
Tag 3	503 (99-1353)	2.7 (1.5-41.7)	1.9 (1.0-4.8)	10.8 (3.7-52.6)
Adjuvante RCT (N = 4)				
Tag 1, 0h	192 (86-530)	2.0 (0.8-3.6)	0.9 (0.5-1.4)	11.1 (4.3-13.0)
Tag 1, 6h	126 (78-424)	1.1 (0.7-3.7)	1.3 (0.6-1.5)	8.6 (4.1-10.4)
Tag 2	208 (45-274)	1.7 (0.8-3.2)	1.1 (0.6-1.1)	9.5 (4.4-11.9)
Tag 3	238 (135-464)	1.9 (1.2-3.0)	1.1 (0.6-1.2)	8.9 (8.9-9.9)
Rezidiv RCT (N = 8)				
Tag 1, 0h	532 (253-2095)	17.3 (1.3-117)	2.2 (0.6-9.8)	68.8 (0.6-532)
Tag 1, 6h	545 (184-662)	18.9 (4.0-101)	2.6 (0.8-8.6)	105 (0.6-494)
Tag 2	307 (94-1450)	20.0 (4.2-94.1)	2.7 (1.1-8.6)	98.9 (0.6-461)
Tag 3	252 (138-2262)	17.7 (1.2-99.2)	3.0 (0.9-7.8)	107 (6.7-509)

Tab. 10: Mediane und Schwankungsbereiche von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 der Patienten mit adjuvanter, neoadjuvanter und Rezidiv-Radiochemotherapie. Es sind die Werte vor der Therapie (Tag 1, 0h), 6 Stunden nach der ersten Bestrahlung (Tag 1, 6h), am zweiten Tag (Tag 2, 24h) und dritten Tag (Tag 3, 48h) aufgelistet.

Varianzanalyse	Nukleosomen		CEA		CYFRA 21-1		CA 19-9	
	p-Wert	p korr	p-Wert	p korr	p-Wert	p korr	p-Wert	p korr
Adjuvant vs Neoadjuvant								
Effekt der Therapiegruppe	<0.001	<0.001	ns		ns		ns	
Effekt der Therapietage	ns		ns		ns		ns	
Effekt von Interaktionen	ns		ns		ns		ns	
Adjuvant vs Rezidiv								
Effekt der Therapiegruppe	0.001	0.003	0.012	0.036	0.031	0.093	ns	
Effekt der Therapietage	ns		0.008	0.024	ns		0.002	0.006
Effekt von Interaktionen	ns		ns		ns		ns	
Neoadjuvant vs Rezidiv								
Effekt der Therapiegruppe	ns		ns		ns		ns	
Effekt der Therapietage	0.011	0.033	0.001	0.003	ns		ns	
Effekt von Interaktionen	ns		ns		ns		ns	

Tab. 11: Varianzanalyse von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 mit Vergleich der einzelnen Therapiegruppen. ns: nicht signifikant, p korr: korrigierter (angepasster) p-Wert

4.2.4 Therapieansprechen bei Patienten unter neoadjuvanter RCT

Bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium wurde eine neoadjuvante Radiochemotherapie durchgeführt, um das Tumolvolumen zu reduzieren und eine anschließende Tumorresektion zu ermöglichen. Vor Therapiebeginn wurden bildgebenden Verfahren, wie endoskopische Sonographie, Computertomographie und Kernspintomographie, zum klinischen Staging verwendet. Diese Ergebnisse wurden mit dem histopathologischen Befund des postoperativen Resektats

verglichen. Die Kontrolle der Therapieeffizienz erfolgte dabei anhand von Veränderungen des Tumorstadiums analog der gültigen UICC-Kriterien. Von den 13 präoperativ behandelten Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom

- hatten 4 Patienten eine Partielle Remission,
- wiesen 5 Patienten eine gleichbleibende Erkrankung auf und
- litten 4 Patienten an einer Progression ihres Tumors.

4.2.4.1 Wöchentliche Werte

Für die weitere Auswertung wurden die Patienten mit partieller Remission und diejenigen mit gleichbleibender Erkrankung zu der Gruppe ohne Progression zusammengefasst (N = 9). Patienten mit fortschreitender Tumorerkrankung wurden als Gruppe mit Progression bezeichnet (N = 4). In den Abbildungen 73 – 76 sind alle wöchentlichen Einzelwerte von Nukleosomen und der biologischen Marker CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 zwischen diesen beiden Gruppen verglichen. Helle Punkte entsprechen Patienten ohne Progression, dunkle Punkte solchen mit Progression. Dabei unterschieden sich die Freisetzungsmuster beider Gruppen sowohl bei Nukleosomen als auch den biologischen Markern. Bei neoadjuvant bestrahlten Patienten mit einem Progress ihrer Tumorerkrankung konnten höhere Einzelwerte und Mediane von Nukleosomen sowie der biologischen Marker im Serum nachgewiesen werden. Besonders ausgeprägt war dies bei den Konzentrationen von Nukleosomen und des carcinoembryonalen Antigens.

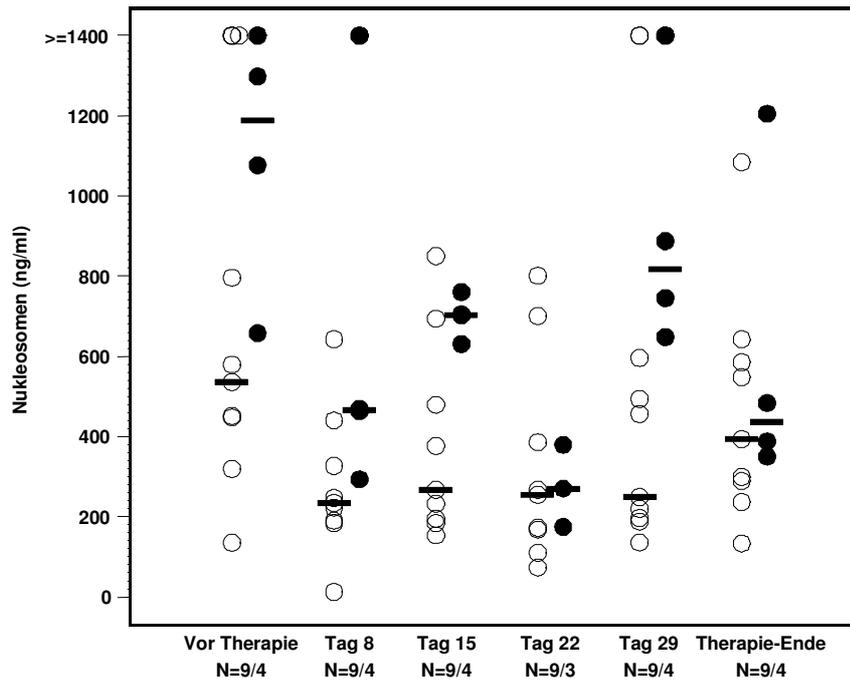


Abb. 73: Wöchentliche Nukleosomenwerte während neoadjuvanter Radiochemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

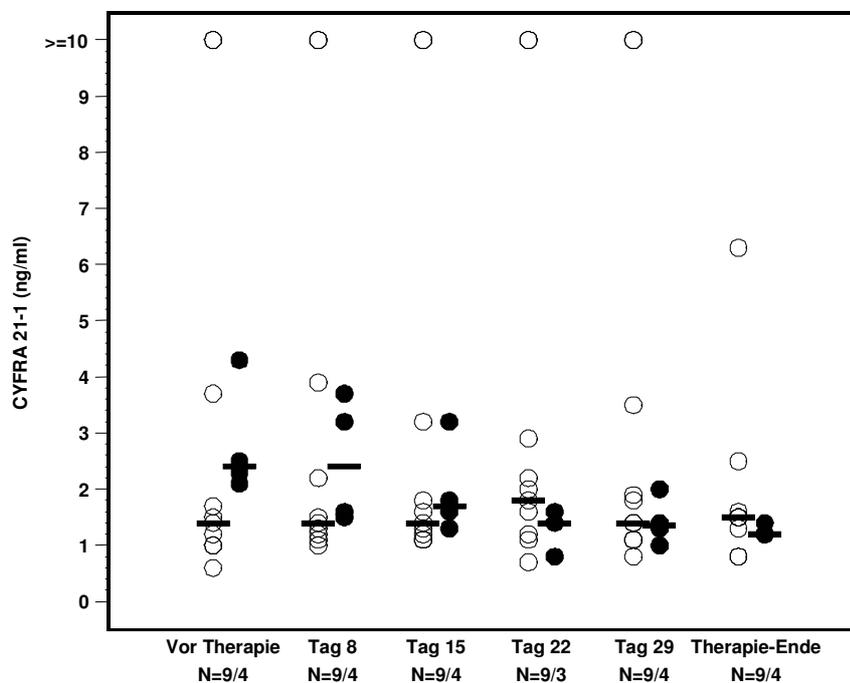


Abb. 74: Wöchentliche CYFRA 21-1-Werte während neoadjuvanter Radiochemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

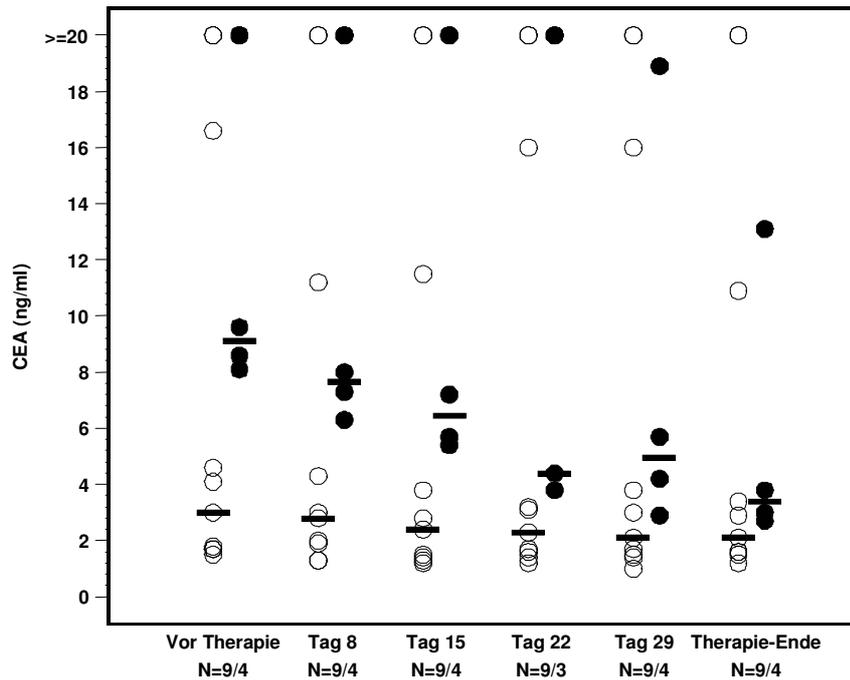


Abb. 75: Wöchentliche CEA-Werte während neoadjuvanter Radiochemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

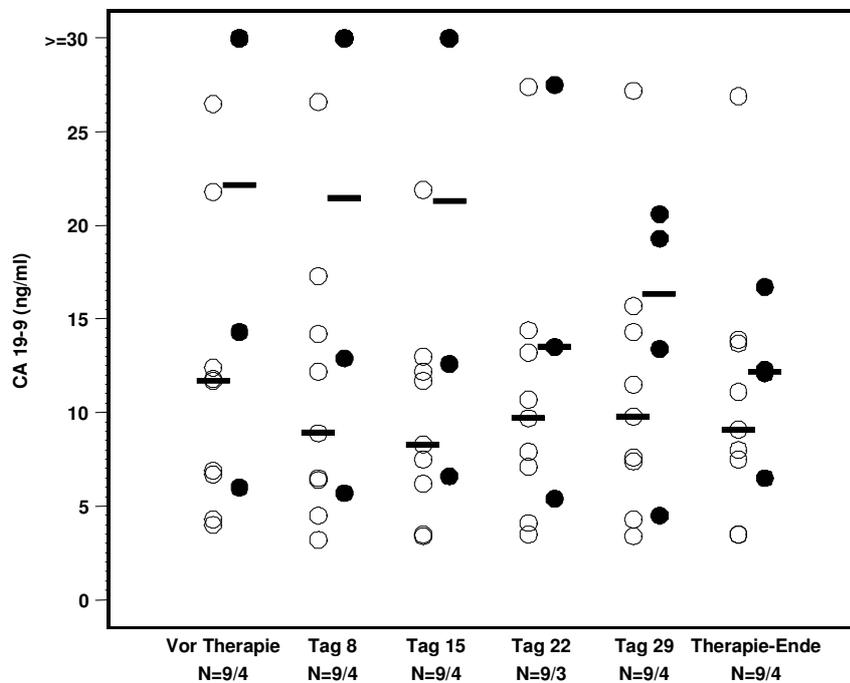


Abb. 76: Wöchentliche CA 19-9-Werte während neoadjuvanter Radiochemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung.

4.2.4.2 Werte während der ersten Woche

Analog zu den wöchentlichen Werten wurden alle Einzelwerte der ersten drei Behandlungstage sowie die Fläche unter der Kurve dieses Zeitraums (AUC 1-3) für Nucleosomen, CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 in den Graphiken 79 – 83 zusammengefasst. Beim Vergleich einzelner Nucleosomenwerte zwischen der Gruppe ohne Progression und derjenigen mit Progression fanden sich zwar unterschiedliche Wertlagen, allerdings war die Trennstärke für das Therapieansprechen mit $p = 0,052$ nur grenzwertig signifikant (s. Tab. 12). Betrachtet man allerdings die Fläche unter der Kurve (AUC), die alle Werte der ersten drei Tage integriert, so hatten Patienten mit Progression deutlich höhere Werte im Vergleich zu Patienten ohne Progression ($p = 0,028$; s. Abb. 77).

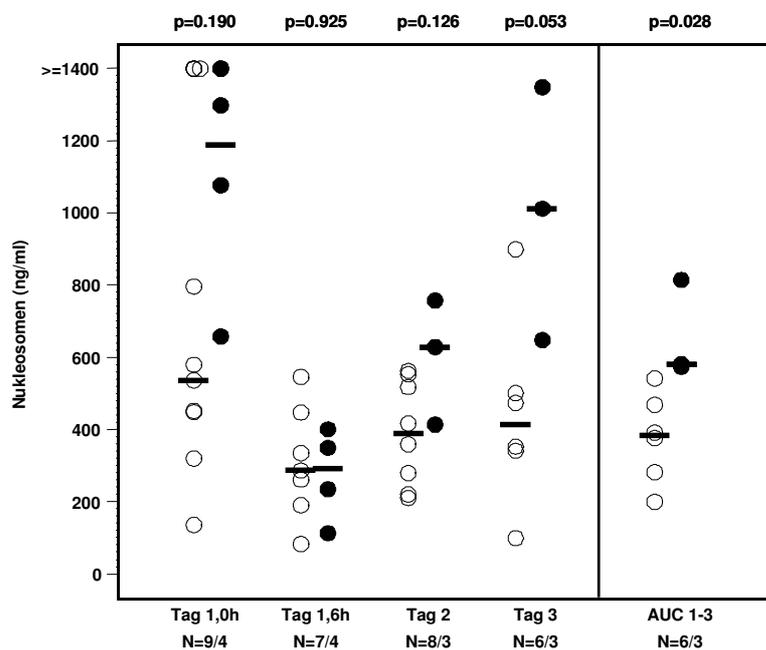


Abb. 77: Verteilung der Nucleosomenkonzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in neoadjuvant behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,028$ (Wilcoxon-Test).

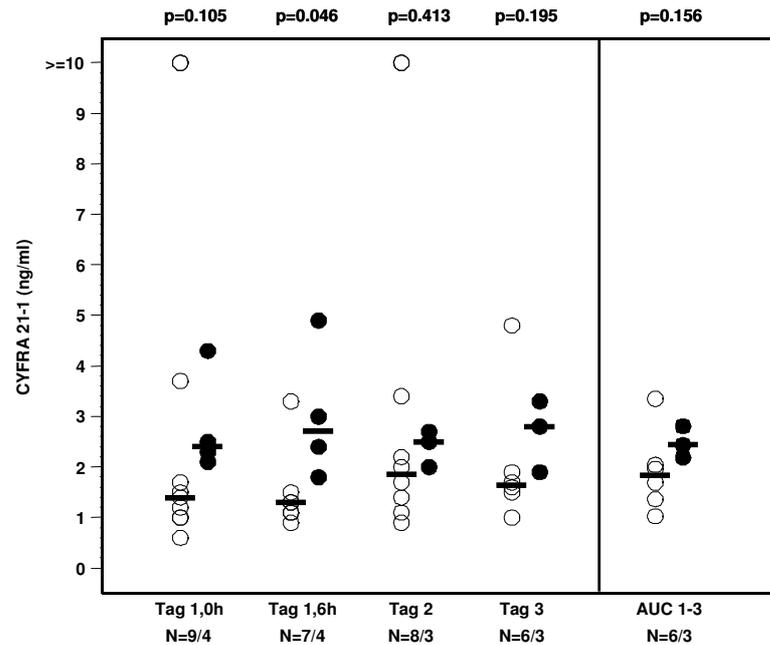


Abb. 78: Verteilung der CYFRA 21-1-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in neoadjuvant behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,156$ (Wilcoxon-Test).

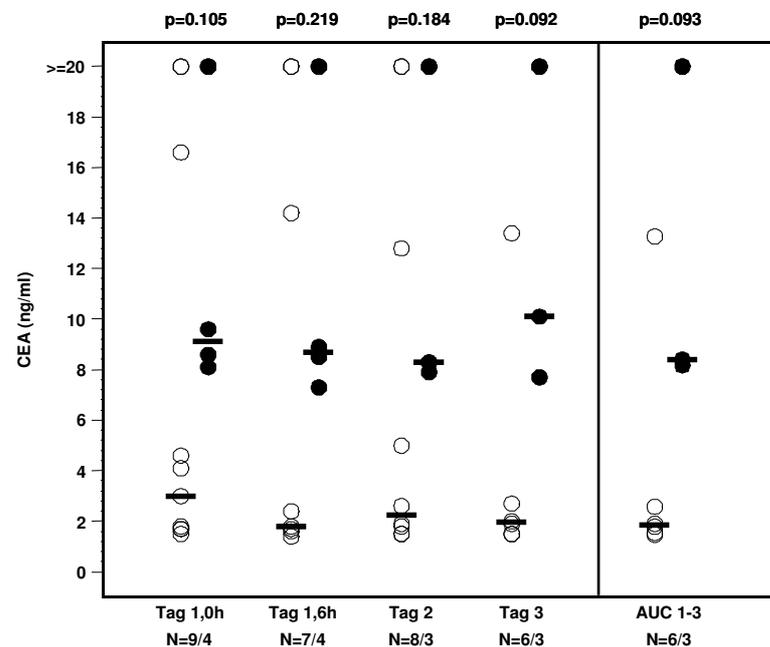


Abb. 79: Verteilung der CEA-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in neoadjuvant behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,093$ (Wilcoxon-Test).

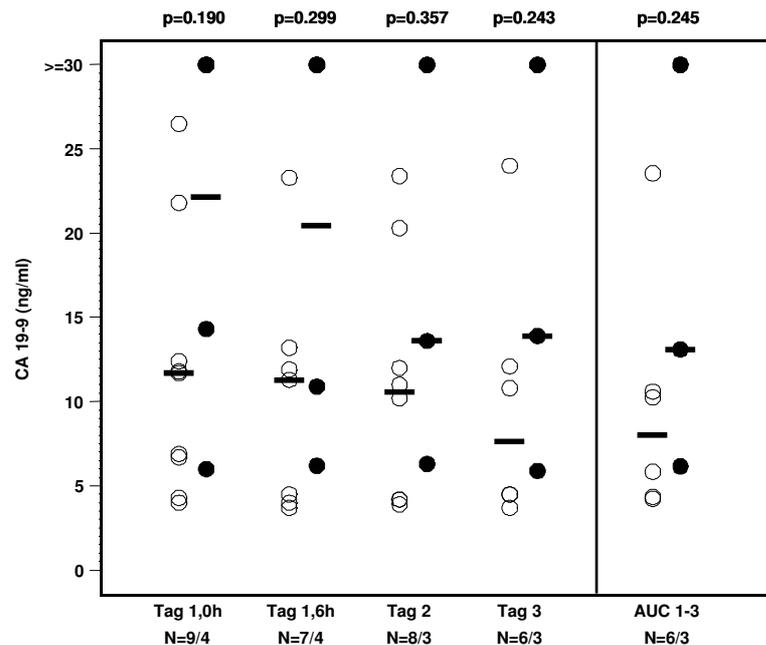


Abb. 80: Verteilung der CA 19-9-Konzentrationen während der ersten drei Behandlungstage in neoadjuvant behandelten Patienten ohne Progression (○) und mit Progression (●) der Grunderkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für die Fläche unter der Kurve (AUC) $p = 0,245$ (Wilcoxon-Test).

Bei den biologischen Markern CEA, CYFRA 21-1 und CA 19-9 fanden sich zwar unterschiedliche Wertlagen zwischen Patienten mit und ohne Progression der Grunderkrankung, allerdings ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen. Bezogen auf die Nukleosomen wiesen Patienten, die auf die Therapie ansprachen, niedrigere Werte auf als Patienten mit einer Progression der Erkrankung. Dies soll an zwei exemplarischen Verläufen von Nukleosomenkonzentrationen je eines Patienten mit und ohne Progression gezeigt werden (s. Abb. 81 und 82). Verdeutlicht wird dies an der schraffierten Fläche unter der Kurve, welche die area under the curve (AUC) der ersten drei Tage darstellt. So zeigt die Graphik 81 einen Patienten mit kleiner Fläche unter der Kurve (AUC 1-3) ohne Progression der Grunderkrankung. Im Gegensatz dazu erlitt der in Abbildung 82 dargestellte Patient mit großer AUC 1-3 einen frühen Progress seiner malignen Grunderkrankung. Alle nicht progredienten Patienten wiesen eine absolut kleinere AUC 1-3 auf als Patienten mit Progression ihres Malignoms (s. Abb. 77).

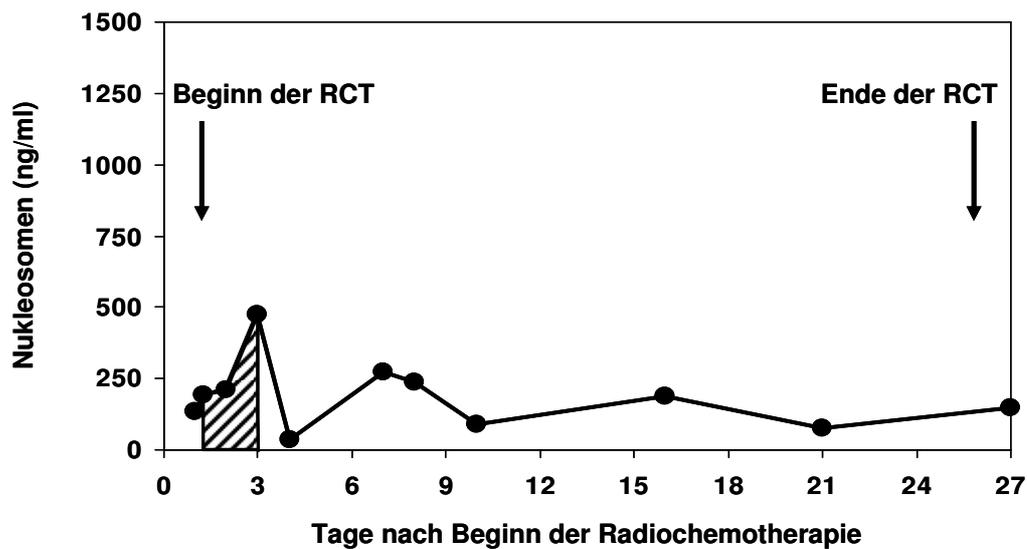


Abb. 81: Typischer Verlauf der Nucleosomenkonzentration im Serum eines Patienten mit Rektumkarzinom (T3, N0, M0, G2) während neoadjuvanter Radiochemotherapie ohne Progression der Erkrankung.

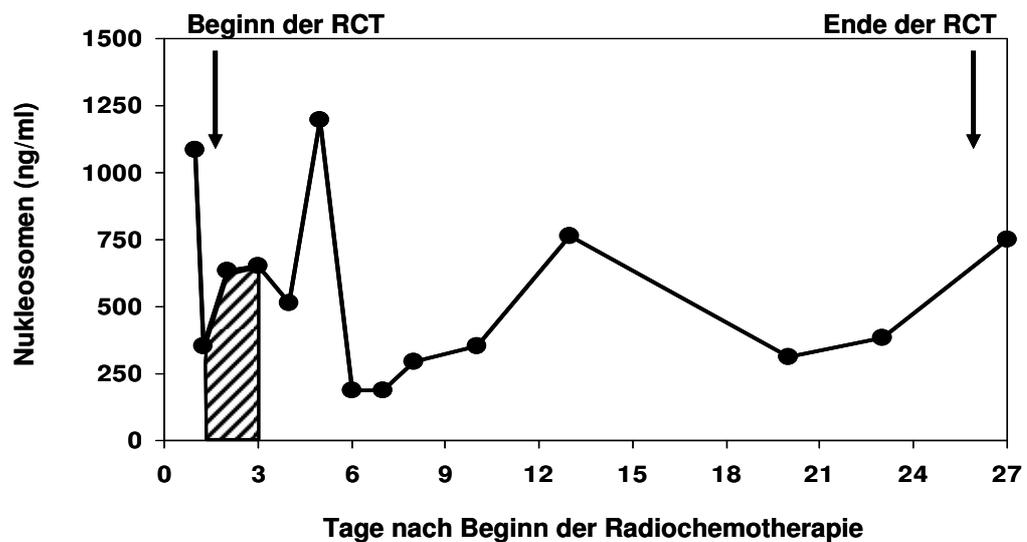


Abb. 82: Typischer Verlauf der Nucleosomenkonzentration im Serum eines Patienten mit Rektumkarzinom (T3, N1, M0, G3) während neoadjuvanter Radiochemotherapie mit Progression der Erkrankung.

Zusammenfassend stellt die Tabelle 12 alle Mediane von Nucleosomen sowie der die tumorassoziierten Antigene CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 während der ersten drei Behandlungstage dar. Die biologischen Marker konnten dabei nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen diskriminieren. In dieser Varianzanalyse wurde die

Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf den Effekt des Therapieansprechens, der Therapietage sowie den Effekt von Interaktionen berechnet.

	Nukleosomen		CEA		CYFRA 21-1		CA 19-9	
	Keine Prog	Prog	Keine Prog	Prog	Keine Prog	Prog	Keine Prog	Prog
Tag 1, 0h	537	1188	3.0	9.1	1.4	2.4	11.7	32.0
Tag 1, 6h	286	292	1.8	8.7	1.3	2.7	11.3	30.9
Tag 2	388	629	2.3	8.3	1.9	2.5	10.6	13.6
Tag 3	413	1012	2.0	10.1	1.7	2.8	7.7	13.9

Varianzanalyse: Keine Progression vs Progression

Effekt des Therapieansprechens	p=0.052	ns	ns	ns
Effekt der Therapietage	p=0.005	ns	ns	ns
Effekt von Interaktionen	ns	ns	ns	ns

Tab. 12: Mediane von Nukleosomen, CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 neoadjuvant behandelter Patienten mit Progression und ohne Progression der Erkrankung. Die Trennstärke zwischen beiden Gruppen bezogen auf das Therapieansprechen beträgt für einzelne Nukleosomenwerte $p = 0,052$, bezogen auf die Therapietage $p = 0,005$ (Varianzanalyse). ns = nicht signifikant

5 Diskussion

Zur onkologischen Therapie gehören neben Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie auch die Gabe von Hormonen und Antikörpern [Harris 2004]. In frühen Krankheitsstadien wird zunächst versucht, den Tumor vollständig zu reseziieren. Im Anschluß daran wird oft eine postoperative Chemo-, Radio- oder kombinierte Radiochemotherapie durchgeführt, um restliches Tumorgewebe zu eliminieren. Bei nicht mehr resektablen Tumoren versucht man mittels einer primären bzw. präoperativen Therapie das Malignom zu verkleinern und in ein operables Stadium zu bringen. Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium mit Rezidiv oder Metastasen erhalten oftmals besondere Rezidiv-Chemotherapien oder Antikörper.

Unter dem Begriff Radiotherapie wird die Applikation beschleunigter Teilchen und elektromagnetischer Wellen zusammengefasst. Zur Teilchenstrahlung gehören neben α - und β -Strahlung, also Heliumkernen und Elektronen, auch schnelle Protonen. Die γ -Strahlung wird zu der elektromagnetischen Strahlung gezählt. Neben wenigen Spezialindikationen wird meist harte γ -Strahlung perkutan appliziert. Eine Strahlentherapie kann je nach Größe des Bestrahlungsfeldes als lokale oder systemische Therapie appliziert werden.

Neben dem Tumorgewebe werden bei einer Strahlentherapie angrenzende Strukturen und Lymphknotenstationen mit einbezogen, um eventuell versprengte Tumorzellen zu eliminieren. Die Radiotherapie erfolgt dabei meist fraktioniert, das heißt, die Gesamtdosis wird über mehrere Wochen in kleinen Dosen appliziert. Die fraktionierte Bestrahlung schützt vor allem gesundes Gewebe, denn gesunde Zellen können DNA-Schäden im bestrahlungsfreien Intervall besser reparieren als maligne Zellen. Die DNA in Tumorzellen ist außerdem oft instabiler und kann daher effektiver geschädigt werden als DNA in gesunden Zellen [Schaer 2001, Hendry 2001]. Allerdings leiden auch stark proliferierende Gewebe wie hämatopoetische Zellen des Knochenmarks oder Spermatozoen des Hodens unter einer Radiatio. Können DNA-Schäden innerhalb der kurzen Zellzykluszeiten nicht rechtzeitig repariert werden, erliegen diese Zellen dem Zelltod und geben apoptotische Produkte, wie Mono- und Oligonukleosomen in die Blutlaufbahn ab [Kerr 1994, Mirkovic 1994, Hendry 1997, Hendry 2001, Mirzaie-Joniani 2002].

Viele Studien haben gezeigt, dass multimodale Therapiestrategien die Behandlungserfolge beim kolorektalen und Pankreaskarzinom deutlich erhöhen [Wilkowski 2000, Heinemann 2002 (A), Wilkowski 2004, Bosset 2005, Pfeiffer 2005, Wilkowski 2006, Heinemann 2006]. Radio- und Chemotherapien werden oft kombiniert, da sie Tumorzellen in unterschiedlichen Stadien angreifen. Die simultane Applikation beider Therapiemodalitäten ist aber auch stärker toxisch und führt häufiger zu unerwünschten Wirkungen. Daher werden prädiktive und prognostische Marker benötigt, die frühzeitig anzeigen, ob eine applizierte Therapie erfolgreich sein wird oder besser gewechselt werden sollte. Wie notwendig solche Marker sind, wird deutlich, wenn man den derzeitigen Stand einer Therapiebeurteilung betrachtet. Das Ansprechen der Therapie wird mit bildgebenden Verfahren und onkologischen Biomarkern kontrolliert. Allerdings vergehen meist viele Wochen bis Monate bis die Therapieeffizienz dadurch abgeschätzt werden kann. Zusätzlich werden durch die Behandlung benachbarte Gewebe mitgeschädigt und erschweren eine objektive Beurteilung der aktuellen Tumorgröße. Insbesondere gilt dies für Karzinome der Bauchspeicheldrüse. Zudem ist die bildgebende Diagnostik oft nicht standardisiert: sie ist stark abhängig von verschiedenen Techniken, variiert deutlich zwischen unterschiedlichen Begutachtern und deren Erfahrungsgrad. Daher wurden in dieser Arbeit die bildgebenden Befunde zusätzlich durch einen erfahrenen Radiologen beurteilt. Ein einfach durchzuführender, günstiger Labortest, der früher als die bildgebenden Verfahren und herkömmlichen biologischen Marker den Erfolg einer Radiochemotherapie anzeigen könnte, wäre höchst wünschenswert.

Wirkmechanismen von Radiotherapie und Chemotherapeutika

Interessanterweise profitieren einige Patienten in gleichen Tumorstadien gut von einer Radiochemotherapie, während andere kaum oder nicht auf die Therapie ansprechen. Verschiedenste Ursachen werden dafür verantwortlich gemacht, wovon einige im Folgenden erörtert sind. Zunächst soll aber kurz auf die allgemeinen Wirkmechanismen von Radiotherapie und Chemotherapeutika eingegangen werden.

Photonen, als γ -Strahlung appliziert, führen intrazellulär zu starken physikalischen und chemischen Veränderungen. Die Zusammensetzung des Ionenmilieus wechselt, der pH-Wert wird beeinflusst und Radikale oder reaktive Produkte entstehen.

Dadurch kommt es zum Umbau vieler Zellstrukturen und zum biologischen Zellschaden. Auf Ebene der DNA führt die Bestrahlung neben Einzelstrang- auch zu Doppelstrang-Brüchen [McMillan 2001]. Dabei scheint die Oxygenierung des Tumorgewebes eine entscheidende Rolle zu spielen für die Bildung von Radikalen und Wasserstoffperoxid. So reduziert Hypoxie die Strahlenwirkung auf die Hälfte bis ein Drittel und begünstigt das Überleben von Tumorzellen [Mirkovic 1994].

Eine hohe Strahlendosis verursacht irreparable DNA-Schäden und löst eine frühe, prämitotische Apoptose aus. Niedrige Dosen lädieren DNA in geringerem Maße und führen nicht zum akuten Zelltod [Verheij 2000, Shinomiya 2001]. Um die Schäden durch verschiedene Reparatursysteme zu beseitigen, kann der Zellzyklus in verschiedenen Phasen angehalten werden [Maity 1994, Sionov 1999, Shinomiya 2001]. Dies geschieht durch eine Hochregulation des p53-Proteins. Nach erfolgreicher Reparatur des DNA-Schadens geht die Zelle von der G1-Phase zur S-Phase über. Sind die Schäden allerdings schwerwiegend oder die Reparatursysteme insuffizient, wird die Zelle nach einer bestimmten Latenzzeit die verzögerte, postmitotische Apoptose einleiten [Verheij 2000, Shinomiya 2001]. Dabei werden apoptosefördernde Proteine wie Bax aktiviert, die Cytochrom C aus den Mitochondrien freisetzen. In der weiteren Folge werden verschiedene Effektorcaspasen aktiviert, welche zelluläre Strukturen geordnet zersetzen [Mirkovic 1994, Leist 1997, Sionov 1999, Szumiel 1998]. Anschließend werden apoptotische Substrate, darunter auch Mono- und Oligonukleosomen von Nachbarzellen und Gewebsmakrophagen phagozytiert und an den Blutkreislauf abgegeben. Mit steigender Apoptoserate gelangen vermehrt Nukleosomen in die Blutbahn. Zusätzlich kann γ -Strahlung den apoptotischen Zelltod auch direkt über die extrinsische Signalkaskade des CD95/Fas/Apo1-Systems einleiten [Sheard 1999, Mirzaie-Joniani 2002].

Chemotherapeutika induzieren ebenfalls den apoptotischen Zelltod. Es existieren zahlreiche Chemotherapeutika mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen. Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden mit Cisplatin, Gemcitabine und 5-Fluoruracil behandelt. Cisplatin und 5-Fluoruracil induzieren die Apoptose vor allem durch Aktivierung des CD95/Fas/Apo1-System und über Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien [Friesen 1999, Yim 2004]. Gemcitabine entwickelt seine Toxizität erst intrazellulär und hemmt die DNA-Synthese [Jiang 2000].

Um das unterschiedliche Therapieansprechen von Patienten in gleichen Tumorstadien besser erklären zu können, müssen Veränderungen auf zellulärer Ebene genauer betrachtet werden. Beim Pankreaskarzinom können Onkogene wie K-Ras mutiert, Tumorsuppressorgene wie TP53 und p16 verloren gegangen und die Expression verschiedener Proteine wie p53 und Bcl-2 dysreguliert sein [Islam 2001, Maitra 2003]. Diese Proteine regulieren Zellzyklus, Proliferation und Apoptose. Die relative Resistenz von Tumorzellen des Pankreas auf 5-Fluoruracil kann auf die Inaktivierung von p53 zurückgeführt werden. Eine Überexpression von Bcl-2 ist mit einer reduzierten Sensitivität auf Gemcitabine assoziiert [Giovannetti 2006 (B)].

Gemcitabine, ein Desoxycytidin-Analogon, wirkt in vielen Tumoren zytotoxisch, unter anderem dem Pankreaskarzinom [Li 2004]. Allerdings benötigt es spezielle Nucleosidtransporter, um in die Tumorzellen zu gelangen, wie human equilibrative nucleoside transporter oder human concentrative nucleoside transporter. Werden diese Transporter blockiert oder kaum exprimiert, ist die Wirksamkeit von Gemcitabine deutlich verringert und die Überlebenszeit solcher Patienten verkürzt [Mackey 1998, Garcia-Manteiga 2003, Spratlin 2004, Giovannetti 2006 (A)].

Die individuellen Unterschiede in der Therapie auf molekularer Ebene beginnt man erst seit wenigen Jahren zu verstehen. Dies ermöglicht zukünftig die Perspektive, molekulare Analysen eines Patienten vor jeder Chemo- und Radiochemotherapie durchzuführen und die Therapie auf diesem Wege zu optimieren. Umso wichtiger ist es daher in jedem individuellen Fall die Effektivität der Therapie zuverlässig und frühzeitig abschätzen zu können.

Wahl der Patientenkollektive

In dieser Arbeit wurden 32 Patienten mit Tumoren der Bauchspeicheldrüse und 25 Patienten mit Malignomen des Dickdarms in eine prospektive Studie eingeschlossen. Den Antrag zu dieser Studie hatte die Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilian-Universität München zuvor bewertet und genehmigt. Während der gesamten Behandlungsdauer wurden diese Patienten intensiv durch mich betreut, was zu einer ausgezeichneten Compliance fast aller Patienten führte.

Die Auswahl der Kollektive erfolgte dabei nach verschiedenen Kriterien. Pankreaskarzinome werden häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, weisen daher eine schlechte Prognose auf und sind besonders schwierig mittels bildgebender Verfahren zu beurteilen. Gerade Patienten mit dieser Diagnose würden von einer frühzeitigen Evaluation der Therapieeffizienz, mit der Möglichkeit eines Regimewechsels, profitieren. Patienten mit kolorektalen Karzinomen wurden aus mehreren Gründen in diese Studie integriert. Adjuvant behandelte Patienten, nach vollständiger Resektion des Tumors, wurden als Kontrollkollektiv verwendet. Dabei sollte kontrolliert werden, wieviele Nukleosomen aus benignem Gewebe *in vivo* während einer Radiochemotherapie freigesetzt werden. Bei Patienten, die eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhielten, wurde etwa sechs bis acht Wochen im Anschluss der Therapie eine Tumorresektion durchgeführt. Bei dieser Patientengruppe erschien uns das histopathologische Staging die genaueste Methode darzustellen, um das Ansprechen des Tumors auf die Therapie zu beurteilen. Patienten mit einem lokoregionalem Tumorrezidiv stellten die dritte Gruppe kolorektaler Patienten dar, mit der Frage nach höheren Nukleosomenkonzentrationen bei erneutem Auftreten eines Malignoms.

Alle Patienten dieser Studie erhielten eine simultane Radiochemotherapie. Sie wurden mit 15 Mega-Volt Photonen eines Linearbeschleunigers in isozentrischer Drei- oder Vierfeldertechnik bestrahlt. Diese Bestrahlungsart ist besonders gut steuerbar und dringt tief ins Gewebe ein.

Der Vorteil der in dieser Studie untersuchten Patientengruppen liegt in der großen Homogenität der Kollektive und ihrer Therapie.

Präanalytische Vorgehensweise während der prospektiven Studie

Besonderen Wert in dieser prospektiven Studie wurde, neben einer sorgfältigen Erhebung der klinischen Daten, auf ein akkurates präanalytisches Vorgehen gelegt. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen wurden so gewählt, dass sie im normalen klinischen Ablauf vorgenommen werden konnten. Nach Möglichkeit wurden sie mit anfallenden Routineabnahmen zusammengelegt.

Alle Serumproben wurden standardisiert weiterverarbeitet. Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da dies in vielen klinischen Studien als wenig relevant betrachtet wird, aber deutliche Auswirkungen auf die Messergebnisse haben kann. So wurden alle Blutproben eigenhändig abgenommen, binnen ein bis maximal zwei Stunden abzentrifugiert, stabilisiert und bis zum Einfrieren kühl gelagert. Auch die Messungen der Nukleosomenkonzentrationen im Serum erfolgten nach einem standardisierten Vorgehen. Dazu wurden jeweils alle tiefgerorenen Serumproben eines Patienten aufgetaut und innerhalb eines Testdurchlaufes analysiert. Durch diese Maßnahmen wurde der Einfluß präanalytischer und analytischer Störgrößen minimiert.

Mittels der gemessenen Nukleosomenkonzentrationen sollte geklärt werden, ob Nukleosomen nach einem typischen Muster freigesetzt werden und ob sich diese Freisetzungsmuster innerhalb der Therapiegruppen unterscheiden. Desweiteren wurde untersucht, ob die Therapieeffizienz bzw. das progressionsfreie Intervall frühzeitig beurteilbar ist.

Freisetzungsmuster von Nukleosomen während Radiochemotherapie

In Tumorgeweben lassen sich eine massive Zellproliferation und ein massiver Zelltod nachweisen. Dieser Zellumsatz, der die Freisetzung von apoptotischen Produkten mit einschließt, variiert zwischen verschiedenen Tumorarten und verschiedenen Individuen [Meyn 1993, Holdenrieder 2001 (C)]. Apoptose ist einer der Hauptmechanismen, der zum Untergang von Tumorzellen führt. Um eine Therapie zu monitoren, könnten sich daher Marker eignen, die das Ausmaß des Zelltods, z.B. Nukleosomen, reflektieren.

In einer *in vitro*-Studie untersuchten Holdenrieder et al. die Nukleosomenfreisetzung aus gesunden und malignen Lungenzelllinien, die mit verschiedenen Dosisraten bestrahlt wurden. Tumorzellen setzten nach mittleren Bestrahlungsdosen signifikant mehr Nukleosomen frei als normale Bronchialzellen [Holdenrieder 2004 (C)]. Allerdings können *in vivo* maligne Zellen nicht so exakt von benignen getrennt betrachtet werden. Im Bestrahlungsfeld befindet sich neben Tumorzellen auch gesundes Gewebe, welches aus verschiedenen Zelltypen mit

unterschiedlicher Radiosensitivität besteht. Daher ist es schwierig genau anzugeben, wieviele Nukleosomen aus gesunden und malignen Zellen stammen.

Initial wurden die wöchentlichen Werte der Nukleosomenkonzentrationen während einer Radiochemotherapie analysiert. Allerdings ließ sich hier kein eindeutiger Trend oder ein homogenes Freisetzungsmuster erkennen. Die Streubreite der Nukleosomenwerte fiel hoch aus und war aufgrund vielfältiger Einflüsse vor allem nach mehreren Wochen einer Radiochemotherapie nicht eindeutig beurteilbar. Dies galt sowohl für die wöchentlichen Nukleosomenwerte bei Patienten mit Pankreaskarzinom als auch für solche mit einem Malignom des Dickdarms. So konzentrierte sich die weitere Auswertung der Nukleosomenfreisetzung auf die ersten Tage einer Radiochemotherapie. Während der initialen Phase einer Behandlung sind die Nukleosomenwerte am besten vergleichbar. Dies hat verschiedene Gründe. Patienten begannen eine Radiochemotherapie an den Wochentagen Montag bis Donnerstag. Während der ersten drei Tage (48 Stunden) einer Radiochemotherapie erhielten also alle Patienten eine zweimalige Applikation der täglichen 1,8 Gy-Dosis. An den folgenden Tagen wurden einige Patienten weiterbestrahlt, während sich andere bereits im bestrahlungsfreien Wochenende befanden. Zusätzlich erschweren im weiteren Verlauf einer Radiochemotherapie aufgetretene Komplikationen wie etwa Infektionen oder Entzündungen den Vergleich einzelner Nukleosomenwerte. So verzögern Akute-Phase-Proteine die Elimination von Nukleosomen und können zu erhöhten Konzentrationen im Blut führen [Burlingame 1996, Du Clos 1996].

Im Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit Freisetzung und Kinetik der Nukleosomen beim Pankreaskarzinom während Radiochemotherapie genauer analysiert. Da Karzinome der Bauchspeicheldrüse oft in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, vermuteten wir hohe Nukleosomenwerte sowohl vor als auch während der Therapie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Nukleosomenkonzentration typischerweise auf einem hohen Level startet. Dies ist vermutlich auf den gesteigerten, spontanen Zellumsatz in diesen Tumoren zurückzuführen. Sechs Stunden nach der ersten Bestrahlung fällt die Konzentration teils deutlich ab und steigt bis zu einem Maximum an den folgenden Tagen an. Eine mögliche Erklärung liegt in der Beobachtung, dass schon die erste Bestrahlung

Zellen verändert und deren Zellzyklus arretiert [McMillan 2001]. Im Laufe der nächsten Stunden entscheidet sich, ob eine Zelle den DNA-Schaden reparieren kann. Ist eine Reparatur nicht möglich, setzt mit einer zeitlichen Verzögerung die Apoptose ein. Anschließend werden vielfältige Apoptoseprodukte in die Blutzirkulation freigesetzt. Auf diese Weise lassen sich der Abfall der Nukleosomenwerte sechs Stunden nach der ersten Bestrahlung und der steile Anstieg der folgenden Tage gut erklären. Diese Beobachtung wird zusätzlich durch *in vitro* Ergebnisse untermauert [Mirzaie-Joniani 2002]. *In vivo* wurden dazu erste Daten von Holdenrieder et al. an 16 Patienten mit unterschiedlichen Karzinomen während Radiotherapie beschrieben [Holdenrieder 2001 (C)]. Bei diesen deutlich grobmaschigeren Messungen konnte gezeigt werden, dass rasche Abfälle der Nukleosomenkonzentrationen auf niedrige Werte mit einem guten Ansprechen auf die Radiotherapie korrelierten. Ein späterer Abfall auf höhere Minimalwerte war dagegen mit einer schlechten Strahlenempfindlichkeit des Tumors assoziiert.

Vergleich der Nukleosomenkonzentrationen innerhalb der Therapiegruppen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die nachweisbaren Nukleosomen im Serum vorwiegend von benignen oder malignen Zellen freigesetzt werden. Bei R0-resezierten Patienten, die einer adjuvanten Radiochemotherapie unterzogen wurden, war das Tumorgewebe vollständig entfernt. Nukleosomen stammten in diesen Fällen überwiegend aus benignen Zellen. Bei Patienten mit manifester Tumormasse, z.B. vor neoadjuvanter Therapie oder bei Tumorreizidiv, waren die Nukleosomenkonzentrationen deutlich höher und man muss davon ausgehen, dass die messbaren Nukleosomen während Radiochemotherapie größtenteils aus malignen Zellen freigesetzt wurden. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Nukleosomenkonzentrationen dieser beiden Gruppen miteinander verglichen.

In der Gruppe der kolorektalen Karzinome lagen die Nukleosomenwerte der R0-resezierten Patienten signifikant niedriger als bei den Patienten mit vorhandener Tumormasse (neoadjuvante Tumormassentherapie und Patienten mit Tumorreizidiv). Allerdings ließ sich dieser Unterschied in Patienten mit Pankreaskarzinom nicht nachweisen.

Daraufhin wurden die histopathologischen Ergebnisse der operierten Patienten erneut analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle kolorektalen Patienten R0-reseziert waren und damit die Tumorlast vollständig entfernt worden war. Bei allen Patienten mit Pankreaskarzinom reichten die Tumorzellen dagegen bis an die Resektionsränder heran. Nach der Operation war bei diesen Patienten also restliches Tumorgewebe vorhanden. Somit waren alle Patienten R1-reseziert und nicht mit der Gruppe der R0-resezierten kolorektalen Karzinome zu vergleichen. Man kann daher annehmen, dass die erhöhten Nukleosomenkonzentrationen der Patienten mit operiertem Pankreaskarzinom auf verbleibende Tumorzellen zurückzuführen sind, welche unter der Radiochemotherapie den programmierten Zelltod erleiden und Nukleosomen freisetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nukleosomen global bestimmt, unabhängig ob sie aus benignen oder malignen Zellen stammten. Neben Nukleosomen, also DNA, die um Histone gewunden ist, untersuchten andere Forschungsgruppen auch freie DNA im Blut. In Einzelfällen ist es möglich, DNA zu bestimmen, die nur aus malignen Zellen freigesetzt wurde. Dies ist bei Virus-assoziierten Tumoren möglich. Tumorspezifische Virus-DNA-Bruchstücke können im Blut solcher Patienten mittels PCR nachgewiesen werden. Lo et al. untersuchte die Konzentration von EBV-DNA im Plasma von Patienten mit Nasopharynxkarzinom nach Tumorresektion und während Radiotherapie [Lo 1999, Lo 2000 (A), To 2003]. Nach einer Operation korrelierte ein Abfall der EBV-DNA unter die Nachweisgrenze mit einer vollständigen Entfernung des Tumors. Patienten mit weiterhin nachweisbaren Mengen an EBV-DNA erlitten rasch einen Progress des Tumors in Form eines Lokalrezidivs oder von Metastasen. Während Radiotherapie fielen die Konzentrationen an EBV-DNA bei den meisten Patienten ab. Konstant niedrige Werte waren mit einer Remission assoziiert, während erneute Anstiege eine Progression des Tumors vorhersagten [Lo 1999]. In den zahlreichen Untersuchungen von Lo et al. wurde lediglich in einer einzigen Studie täglich DNA bestimmt und dies auch nur an fünf Patienten. Wie auch in den eigenen hier vorliegenden Ergebnissen stiegen die DNA-Konzentrationen innerhalb der ersten Tage auf ein Maximum, bevor sie abfielen [Lo 2000 (A)].

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction; PCR) stellt bisher den Goldstandard bei der Bestimmung sowohl virus-spezifischer DNA als auch

normaler DNA dar. In Kooperation mit der Arbeitsgemeinschaft um Prof. Y. M. D. Lo verglichen wir unsere Daten mittels beider Methoden. Dabei korrelierten die Ergebnisse von real-time PCR und ELISA im Serum sowohl bei singulären Werten als auch insbesondere in den Longitudinal-Verläufen. Mehrere Kinetiken von Patienten mit Pankreaskarzinom während Radiochemotherapie sowie von Patienten nach Schlaganfall wurden analysiert [Holdenrieder 2005]. So kann man davon ausgehen, dass die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen mittels kostengünstigem, schnell durchführbarem ELISA gleichwertig zur teuren, aufwendigeren PCR sind. Damit könnten Nukleosomen einen sinnvollen und im Gegensatz zur Bildgebung standardisiert messbaren Marker darstellen, um die Effizienz einer Radiochemotherapie frühzeitig abzuschätzen.

Korrelation von Nukleosomenkonzentrationen mit bildgebenden Verfahren und klinischem Ansprechen

Betrachtet man den derzeitigen Stand einer Therapiebeurteilung, wird das Ansprechen einer Radiochemotherapie mit bildgebenden Verfahren und onkologischen Biomarkern kontrolliert. Allerdings vergehen meist viele Wochen und Monate bis die Therapieeffizienz abgeschätzt werden kann. Durch die Behandlung werden benachbarte Gewebe mitgeschädigt und erschweren eine objektive Beurteilung der aktuellen Tumorgröße. Dies gilt insbesondere für Karzinome der Bauchspeicheldrüse, in geringerem Mase aber auch für kolorektale Karzinome. Zudem ist die bildgebende Diagnostik oft nicht standardisiert, variiert zwischen verschiedenen Techniken und dem Erfahrungsgrad des Untersuchers. Ein einfach durchzuführender, günstiger Labortest, der früher als die bildgebenden Verfahren und herkömmlichen biologischen Marker den Erfolg einer Radiochemotherapie anzeigen könnte, wäre höchst wünschenswert.

Karzinome der Bauchspeicheldrüse sind bekanntlich aggressiv und haben eine limitierte Prognose. Ist ein nicht-metastasiertes Pankreaskarzinom nicht mehr operabel, wird häufig eine Radiochemotherapie durchgeführt, um das progressionsfreie Intervall zu verlängern [Wilkowski 2000, Wilkowski 2006]. Vor Beginn

einer solchen Radiochemotherapie wird das Ausmaß eines Malignoms durch bildgebende Verfahren wie Sonographie, Computertomographie und Kernspintomographie beurteilt. Zur Diagnosesicherung erfolgt eine meist computergesteuerte Probeentnahme aus der Raumforderung. Von allen in dieser Studie eingeschlossenen Patienten lag ein positives histologisches Ergebnis dieser Biopsien vor. Nach Abschluß einer Radiochemotherapie wird das Therapieansprechen erneut mittels bildgebender Verfahren kontrolliert. Die Computertomographie stellt dabei die Standardmethode aller bildgebenden Verfahren dar. Dennoch besitzt die Computertomographie bereits zur Diagnosestellung eines vermuteten Pankreastumors eine deutlich geringere Sensitivität im Vergleich zu Kernspintomographie und endoskopischer Sonographie [Mertz 2000]. Im Gegensatz zur prätherapeutischen Bildgebung ist die Aussagekraft aller Restaginguntersuchungen im Anschluß einer Radiochemotherapie durch postradiogene Veränderungen des Gewebes weiter reduziert. Wenige Studien vergleichen dabei die Ergebnisse bildgebender Verfahren mit den histopathologischen Analysen des Tumorsektats von Patienten, bei denen im Anschluss einer Radiochemotherapie eine Tumorsektion möglich war. Selbst die Ergebnisse des prätherapeutisch sehr sensitiven endoskopischen Ultraschalls korrelierten in posttherapeutischen Untersuchungen bei Bettini et al. nur noch in rund 40% mit dem histopathologischen Staging überein [Bettini 2005]. Dabei wurde das posttherapeutische Tumorstadium und der Lymphknotenbefall sowohl über- als auch unterschätzt. Lediglich in einer einzigen retrospektiven Arbeit wurden histopathologische Befunde mit den Ergebnissen der Computertomographie verglichen [White 2001]. Dabei gab White et al. einen akzeptablen positiven prädiktiven Wert von rund 75% für eine korrekte Vorhersage der CT an. Allerdings wies diese Studie zwei Schwachpunkte auf. Die Ergebnisse beschränkten sich auf intraoperative Beobachtungen und Beurteilungen der Resektionsränder ohne vollständige Angabe des TNM-Stadiums. Zusätzlich lag ein Selektionsbias des Patientenguts vor, da rund 20% aller Patienten infolge medizinischer Gründe ausgeschlossen wurden. Auch erscheint die Sensitivität der CT überschätzt, da lokale Veränderungen der Radiochemotherapie alle Bildgebungen gleichsam betreffen und die Aussagekraft der CT bereits vor Therapiebeginn niedriger ist als die der Magnetresonanztherapie

bzw. Sonographie [Mertz 2000, Yusoff 2003]. Zur Aussagekraft der Positronenemissionstomographie liegen kaum Daten vor. So konnte Bang et al. zwar eine sehr gute diagnostische Sensitivität der PET im Vergleich zur CT vor Therapie belegen (95% vs 77%), die für das Therapieansprechen nach Radiochemotherapie allerdings auf rund 33% sank [Bang 2006]. Für die hohe Rate an Fehlinterpretationen der T- und N-Kategorie nach stattgehabter Radiochemotherapie werden desmoplastische Veränderungen, fibrotische Umbauten sowie eine verstärkte Ödembildung im Tumorgebiet verantwortlich gemacht.

Aufgrund dieser Daten erschien uns die Bildgebung nicht ausreichend valide, um das Therapieansprechen zu beurteilen. So wurden die analysierten biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 auf Ihre Aussagekraft hin überprüft. Bereits mehrere Studien belegen, dass beim Pankreaskarzinom der Tumormarker CA 19-9 anzeigt, ob die Therapie anspricht [Micke 2003, Stemmler 2003, Boeck 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Pankreaskarzinom das Gesamtüberleben deutlich signifikanter mit Veränderungen von CA 19-9 korreliert als den Ergebnissen der bildgebenden Untersuchungen. So leben Patienten mit einem Tumormarkerrückgang bei gleichzeitiger Progression in der Bildgebung signifikant länger, als Patienten mit einem Progress von biologischem Marker und Bildgebung [Stemmler 2003]. Aufgrund der oben beschriebenen geringen Validität der bildgebenden Verfahren entschlossen wir uns ebenfalls das Cancer Antigen 19-9 zur Beurteilung der Therapieeffizienz heranzuziehen. Eine Progression der Erkrankung wurde dabei als Erhöhung von CA 19-9 um mehr als 100% definiert [Nishida 1999], wobei dieser Anstieg durch zwei Verlaufskontrollen bestätigt werden musste. Patienten ohne Progression der Grunderkrankung waren demnach solche mit einem Abfall von CA 19-9 oder eines Anstiegs dieses biologischen Markers um weniger als 100%. Um die Validität des CA 19-9-Verlaufs als Referenzkriterium für den Erfolg der Radiochemotherapie zu prüfen, wurde in diesem Patientenkollektiv die Entwicklung der CA 19-9-Werte mit der Überlebensdauer korreliert. Patienten, die biochemisch keine Progression (Abfall von CA 19-9 oder Anstieg von CA 19-9 \leq 100%) zeigten, überlebten signifikant länger als Patienten mit einer biochemischen Progression der Erkrankung (Anstieg von CA 19-9 $>$ 100%; $p = 0.025$). Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen Daten [Heinemann 1999, Stemmler

2003,Boeck 2006]. Damit konnte die Einteilung der Patienten bezogen auf die therapeutische Effizienz als sinnvoll erachtet werden.

Die Validität bildgebender Verfahren bei Malignomen der Bauchspeicheldrüse sind gering. Ähnliche Erkenntnisse existieren für Karziome des Dickdarms vor allem nach durchgeführter Radiochemotherapie. Beim Staging des unbehandelten Rektumkarzinoms weisen bildgebende Verfahren eine verlässliche Sensitivität auf. Dies ist allerdings beim Restaging nach neoadjuvanter Radiochemotherapie nicht mehr der Fall. Dies gilt sowohl für endoskopische Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie [Schroder 1997, Maor 2006, Kim 2007]. Die erzielte Vorhersagegenauigkeit für die posttherapeutische Tumorgröße und den Lymphknotenstatus lag lediglich bei rund 50%. Dabei wurde in etwa gleichem Ausmaß das T- und N-Stadium unter- und überschätzt [Schroder 1997]. Besonders der endoskopische Ultraschall wird von Maor et. al als nicht verlässlich bezeichnet, um die Therapieeffizienz nach Radiochemotherapie zu beurteilen. Für die hohe Rate an Fehlinterpretationen der T- und N-Kategorie nach stattgehabter Radiochemotherapie werden eine verstärkte Ödembildung, fibrotische Umbauten sowie desmoplastische und regressive Veränderungen im Tumorbereich verantwortlich gemacht. Diese Alterationen können durch die bildgebende Diagnostik nicht von der eigentlichen Tumordinfiltrationstiefe differenziert werden. Vielmehr können entzündliche Zellaggregate oder desmoplastische Veränderungen einen fortgeschrittenen Tumor vortäuschen, der histologisch nicht in diesem Ausmaß vorliegt. Noch schwieriger ist die Einschätzung der posttherapeutischen Tumurvitalität in einer residuellen Raumforderung. Inwieweit neue funktionelle Untersuchungsverfahren wie die Positronenemissionstomographie dieses Problem lösen können, bleibt aufgrund einer dünnen Datenlage abzuwarten [Kalff 2006].

Die Beurteilung des posttherapeutischen Stagings anhand bildgebender Verfahren erschien daher auch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom viel zu unsicher, um eine valide Therapieeffizienz abzuleiten. Daher wurde das Therapieansprechen lediglich bei neoadjuvant behandelten Patienten genauer untersucht. In diesem Kollektiv wurde das prätherapeutische Staging mittels bildgebender Verfahren mit dem histopathologischen Befund des postoperativen Resektats verglichen. Das

histopathologische Staging ist die exakteste Methode, um das posttherapeutische TNM-Stadium zu ermitteln. In dieser Studie wurde die Therapieeffizienz anhand von Veränderungen des Tumorstadiums analog der gültigen UICC-Kriterien bestimmt.

Bildgebende Verfahren sind im Anschluss an eine Radiochemotherapie nur bedingt valide. Daher wurde in dieser Arbeit die Therapieeffizienz beim Pankreaskarzinom mittels der Veränderungen des biologischen Markers CA 19-9 bestimmt. Bei neoadjuvant behandelten Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde das Therapieansprechen durch das histopathologische Staging des Resektats beurteilt.

Korrelation von biologischen Markern und Nukleosomen

Im Kollektiv der Pankreaskarzinome wurde zwischen postoperativ und primär behandelten Patienten unterschieden. Patienten, die eine postoperative Radiochemotherapie erhielten, wiesen dabei deutlich niedrigere Mediane und Einzelwerte für die biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 auf im Vergleich zu Patienten mit primärer Therapie. Signifikant unterschieden sich dabei beide Gruppen lediglich in der Freisetzung des Cancer Antigens 19-9. Dagegen fand sich ein ähnliches Freisetzungsmuster für Nukleosomen in beiden Therapiegruppen. Alle postoperativ bestrahlten Patienten wiesen restliches Tumorgewebe auf, da diese lediglich R1-reseziert waren.

Die Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden in die drei Therapiegruppen adjuvante, neoadjuvante und Rezidiv-Radiochemotherapie aufgeteilt. Signifikant unterschieden sich die Freisetzungsmuster der Nukleosomen als auch der biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 zwischen adjuvant bestrahlten Patienten und Patienten mit neoadjuvanter bzw. Rezidiv-Behandlung. Teilweise wiesen Patienten mit Tumorrezidiv noch höhere Werte auf als solche mit neoadjuvanter Behandlung, aber ohne Signifikanz zu erreichen. Diese Unterschiede galten sowohl für die wöchentlichen Werte als auch für die Messungen während der ersten Therapiewoche.

Die biologischen Marker CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 konnten weder bei

kolorektalen Karzinomen noch bei Malignomen des Pankreas frühzeitig eine Abschätzung der Therapieeffizienz vorhersagen. Für CEA und CA 19-9 mit langen Halbwertszeiten von 2 - 8 Tagen wurden keine schnellen Konzentrationsveränderungen innerhalb der ersten Tage einer Radiochemotherapie erwartet. CYFRA 21-1 gilt auch als apoptotischer Marker und besitzt eine kurze Halbwertszeit im Blut [Sheard 2002]. Dennoch konnte dieser Tumormarker die Effizienz der Therapie nicht abschätzen. Bei Karzinomen in der Lunge und im HNO-Bereich ist CYFRA 21-1 hingegen aussagekräftiger [Stieber 2001]. Bei den neoadjuvant therapierten, kolorektalen Karzinomen hatten Patienten mit Progression tendenziell leicht höhere Werte für CA 19-9 und CYFRA 21-1. Deutlicher fiel dieser Unterschied für CEA aus. Dennoch konnten diese biologischen Marker nicht zwischen der progressiven und nicht-progressiven Patientengruppe unterscheiden.

Aufgrund der langen Halbwertszeiten von CEA und CA 19-9 im Serum erlauben diese Marker keine kurzfristigen Aussagen zum Therapieansprechen. Eine Aussage ist erst nach mehreren Wochen am Ende einer Therapie möglich. Ein biochemischer Marker mit hoher Tumorspezifität und einer Kinetik im Serum, die den Therapieerfolg widerspiegelt, wäre daher sehr nützlich. So könnte die Effizienz einer Therapie frühzeitig abgeschätzt und eine Therapie moduliert werden. Dies würde für Patienten von hohem individuellem Nutzen sein, besonders bei den nebenswirkungsreichen Radiochemotherapien. Nukleosomen sind zwar nicht tumorspezifisch, sie haben aber eine kurze Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen [Atamaniuk 2004, Gauthier 1996] und zeigen charakteristische Verläufe während der ersten Woche einer Chemotherapie. Sie können das Ansprechen auf eine Chemotherapie beim Bronchialkarzinom [Holdenrieder 2001 (C), Holdenrieder 2004 (B)] und bei akuter lymphatischer Leukämie [Müller 2006] in der initialen Phase gut vorhersagen. Wir prüften deshalb die Hypothese, ob Nukleosomen eine frühzeitigere Beurteilung des Therapieansprechens auch in der initialen Phase einer Radiochemotherapie bei kolorektalem und Pankreaskarzinom darstellen.

Frühzeitige Abschätzung der Therapieeffizienz beim kolorektalen Karzinom bzw. des progressionsfreien Intervalls beim Pankreaskarzinom mittels Nukleosomenkonzentrationen

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass beim Pankreaskarzinom einzelne Nukleosomenwerte nicht zwischen Patienten mit oder ohne Progression unterscheiden können. Im Gegensatz zu einzelnen Nukleosomenwerten erlaubt die Fläche unter der Kurve der ersten drei Tage (area under the curve, AUC) eine bessere Aussage. Die AUC integriert alle Variablen der initialen Therapiephase. Sie zeigt jedoch nur eine grenzwertig signifikante Korrelation mit dem Therapieerfolg. Allerdings kann sie signifikant zwischen Patienten mit früher und später Progression unterscheiden. Dabei wiesen Patienten, die früh progredient wurden, eine höhere AUC auf. Eine signifikant niedrigere AUC hatten Patienten mit langem progressionsfreien Intervall.

Beim kolorektalen Karzinom wurden 13 Patienten mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie behandelt. Dabei wurde überprüft, ob mittels Nukleosomen frühzeitig das Therapieansprechen abgeschätzt werden kann. Diese Patientengruppe war von großem Interesse, da die Therapieeffizienz durch ein histopathologisches Staging am Operationsresektat genauestens überprüft werden konnte. Es zeigte sich, dass die Nukleosomenkonzentrationen bei Patienten ohne Progression niedriger waren als bei solchen mit Progression. Für einzelne Tage war dies allerdings nur grenzwertig signifikant ($p = 0,052$). Die Fläche unter der Kurve (AUC), welche die Werte der ersten drei Tage integriert, zeigte diesen Unterschied deutlicher ($p = 0,028$).

Diese Arbeit untersuchte den Zusammenhang zwischen Nukleosomenfreisetzung, Tumorwachstum und Therapieeffekt. Eine große AUC war mit einem schlechten Therapieergebnis assoziiert, während eine kleine AUC eine bessere Prognose anzeigte. Auf den ersten Blick würde man bei hohen Nukleosomenwerten auf eine hohe Zelltodrate mit gutem Therapieansprechen schließen. Die hier dargestellten Ergebnisse erscheinen daher kontrovers. Dennoch wurden diese Beobachtungen bei diversen Tumorentitäten in verschiedenen Studien wiederholt nachgewiesen [Kuroi

2001, Holdenrieder 2001 (C), Trejo-Becerril 2003, Holdenrieder 2004 (B), Trejo-Becerril 2005]. Hohe Konzentrationen an zirkulierenden Nukleosomen im Serum unter Radiochemotherapie könnten bei Patienten ohne Therapieansprechen beruhen auf:

- einem aggressiven Tumorwachstum und einer hohen Proliferationsrate vor und während einer Radiochemotherapie mit konsekutiv erhöhten Nukleosomenfreisetzungen
- neuen Subpopulationen von undifferenzierten und fragilen Tumorzellen, die während der Zeit zwischen den Bestrahlungsapplikationen anfluten [Thames 1996] und zu hohen Zelltodraten während der folgenden Bestrahlungen führen
- einer höheren Rate dysfunktionaler Zellen, die eher empfindlich auf eine zytotoxische Therapie reagieren
- einer besseren Blutversorgung des Tumorgewebes, die eine Freisetzung von Nukleosomen in die Zirkulation ermöglicht
- einem ineffektiven Abbau und einer insuffizienten Elimination zirkulierender Nukleosomen

Obwohl hohe Nukleosomenfreisetzungen ein initiales Ansprechen auf die Therapie andeuten, weisen sie ein hohes Risiko zu erneutem Wachstum und baldiger Progression auf. Auf diese Weise könnten höhere Nukleosomenkonzentrationen in der initialen Phase der Therapie mit hoher Tumoraggressivität und ineffektiver Therapie verbunden sein. Niedrigere Nukleosomenwerte unter Radiotherapie könnten auf weniger aggressive und langsamer wachsende Tumoren hinweisen. Solche Tumoren hätten niedrigere Zelltodraten und würden weniger Nukleosomen an die Zirkulation freisetzen. Außerdem wird davon ausgegangen, dass eine effektive Elimination der Nukleosomen vor und nach Freisetzung in die Zirkulation mit einem besser funktionierenden Immunsystem assoziiert ist. Dies könnte zu einem langsameren Fortschreiten des Tumors und einem besseren Therapieansprechen führen [Müller 2006]. Niedrige Nukleosomenkonzentrationen während der ersten Tage der Therapie könnten daher mit einem effektiven Therapieansprechen und längeren progressionsfreien Intervall assoziiert sein.

Das in dieser Arbeit verwendete Design und die gewählten Zeitpunkte zur Blutentnahme wurden aufgrund der Ergebnisse einer Pilotstudie herangezogen [Holdenrieder 2001 (C)]. Die Anzahl der hier untersuchten Patienten erscheint vielleicht gering. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass diese prospektiv durchgeführte Studie an einem genau definierten Patientengut durchgeführt wurde. Zahlreiche Blutentnahmen erfolgten in regelmäßigen Abständen, wobei klinisch wie präanalytisch mit äußerster Sorgfalt vorgegangen wurde. Aus diesen Proben wurden neben Nukleosomen weitere Parameter vollständig bestimmt. Die Validität der Nukleosomenmessungen wurde anhand von Pooldaten überprüft und deren Konzentrationen im Serum mit den etablierten biologischen Markern verglichen. Die statistische Aussagekraft mag aufgrund des explorativen Charakters begrenzt sein. Dennoch sind die gewonnenen Erkenntnisse sehr vielversprechend, die in zukünftigen prospektiven Studien zu validieren sind. Auf diesem Gebiet existieren international bisher keine vergleichbaren Untersuchungen. In größerem Ausmaß wurde lediglich beim Bronchialkarzinom die hohe Wertigkeit der Nukleosomen als frühzeitiger Prognoseindikator dargestellt [Holdenrieder 2006].

Nukleosomen könnten zukünftig einen einfach und günstig zu bestimmenden Laborparameter darstellen, der sich zum Therapiemonitoring während Radiochemotherapien eignet. Sequenzielle Nukleosomenmessungen könnten in onkologische Therapieprotokolle integriert werden und das therapeutische Vorgehen entscheidend beeinflussen. Dazu sollten die hier vorliegenden Ergebnisse in prospektiven, umfangreicheren, klinischen Studien validiert werden.

6 Zusammenfassung

Ein gesunder Organismus funktioniert nur, wenn seine Zellen in ausgewogenem Maße gebildet und abgebaut werden. Bei malignen Erkrankungen ist dieses Gleichgewicht gestört. Durch therapeutische Maßnahmen versucht man, die Zellhomöostase, das Gleichgewicht zwischen Neubildung und Abbau von Zellen, wieder herzustellen. So wird während einer Radiochemotherapie gezielt ein massiver Zelltod induziert. Solche Therapien wirken allerdings auch stark toxisch auf gesundes Gewebe und verursachen unerwünschte Wirkungen. Die Effizienz einer Radiochemotherapie wird nach heutigem Standard mittels bildgebenden Verfahren und biologischen Markern abgeschätzt. Beide Methoden ermöglichen jedoch oft erst spät eine Aussage über das Therapieansprechen. Zudem ist es oft schwierig die Bildgebung sicher zu beurteilen. Daher wäre ein Labortest, der frühzeitiger den Erfolg einer Radiochemotherapie anzeigen würde, höchst wünschenswert. So könnte man das therapeutische Konzept früher anpassen und Nebenwirkungen einer erfolglosen Therapie vermeiden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von Nukleosomen untersucht und ihre Aussagekraft als Parameter für den Zelltod unter Radiochemotherapie bewertet. Dazu wurden Serumproben im Verlauf der Therapie von 25 Patienten mit kolorektalem Karzinom und 32 Patienten mit einem Malignom des Pankreas gewonnen. Diese Ergebnisse der Nukleosomenuntersuchungen wurden mit den etablierten biologischen Markern CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1 sowie den Resultaten bildgebender Verfahren korreliert.

Patienten mit postoperativer Radiochemotherapie nach kompletter Resektion (R0-Resektion) eines kolorektalen Karzinoms wiesen niedrige Nukleosomenwerte mit geringer Schwankungsbreite auf. Signifikant höhere Konzentrationen der Nukleosomen wurden bei Patienten mit noch vorhandenen Tumormassen gemessen, die sich einer präoperativen oder Rezidiv-Radiochemotherapie unterzogen. Dieses Ergebnis korrelierte auch mit anderen biologischen Markern wie CEA, CA 19-9 und CYFRA 21-1.

Bei kolorektalen Malignomen konnte in der Gruppe der präoperativ behandelten

Patienten frühzeitig das Therapieansprechen vorhergesagt werden. Hier korrelierte eine kleine Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) mit fehlender Progression, eine hohe AUC mit Progression der Tumorerkrankung unter Therapie.

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom während Radiochemotherapie konnte anhand der Nukleosomenkonzentrationen im Serum frühzeitig das progressionsfreie Intervall abgeschätzt werden. Eine kleine Fläche unter der Kurve korrelierte dabei mit einem langen progressionsfreien Intervall. Dagegen erlitten Patienten mit einer großen AUC frühzeitig eine Progression.

Biologische Marker und bildgebende Verfahren ermöglichen oft erst nach Wochen bis Monaten die Beurteilung einer Therapie. Nukleosomen dagegen, insbesondere die AUC, ergeben frühzeitig wertvolle prognostische Hinweise für das Ansprechen von Pankreas- und kolorektalen Karzinomen auf eine Radiochemotherapie.

Nukleosomen stellen somit einen einfach und günstig zu bestimmenden Laborparameter dar, der sich zum Therapiemonitoring während Radiochemotherapien eignet. Um in der klinischen Routine einsetzbar zu sein, müßte der Nukleosomentest automatisiert werden. Werden dann die hier vorliegenden Daten in umfangreicheren, prospektiven, klinischen Studien bestätigt, könnten Nukleosomen als wertvolles laborchemisches Instrument dienen, um das therapeutische Vorgehen bei Patienten mit einer Tumorerkrankung individuell zu optimieren.

7 Literaturverzeichnis

- Adami 1991 Adami HO, McLaughlin J, Ekblom A, Berne C, Silverman D, Hacker D, Persson I: Cancer risk in patients with diabetes mellitus. *Cancer Causes Control*. 1991; 2, S.307-314.
- Amoura 1997 Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, Bach JF, Koutouzov S: Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation of serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum*. 1997; 40, S.2217-2225.
- Anker 2000 Anker P: Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 906, S.5-7.
- Aotake 1999 Aotake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa N: Changes of angiogenesis and tumor tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 1999; 5, S.135-142.
- Arends 1990 Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*. 1990; 136, S.593-608.
- ASCO TM 2006 Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; ASCO: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24, S.5313-5327.
- Ashkenazi 1998 Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281, S.1305-1308.
- Atamaniuk 2004 Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM: Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem*. 2004; 50, S.1668-1670.
- Bang 2006 Bang S, Chung HW, Park SW, Chung JB, Yun M, Lee JD, Song SY: The clinical usefulness of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the differential diagnosis, staging, and response evaluation after concurrent chemoradiotherapy for pancreatic cancer. *J Clin Gastroenterol*. 2006; 40, S.923-929.
- Barry 1993 Barry MA, Eastman A: Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. 1993; 300, S.440-450.
- Baylin 2006 Baylin SB, Ohm JE: Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6, S.107-116.
- Ben-Sasson 1995 Ben-Sasson SA, Sherman Y, Gavrieli Y: Identification of dying cells - in situ staining. *Methods Cell Biol*. 1995; 46, S.29-39.
- Bettini 2005 Bettini N, Moutardier V, Turrini O, Bories E, Monges G, Giovannini M, Delperio JR: Preoperative locoregional re-evaluation by endoscopic ultrasound in pancreatic ductal adenocarcinoma after neoadjuvant chemoradiation. *Gastroenterol Clin Biol*. 2005; 29, S.659-663.
- Blankenberg 2004 Blankenberg FG: Recent advances in the imaging of programmed cell death. *Curr Pharm Des*. 2004; 10, S.1457-1467.
- Boeck 2006 Boeck S, Stieber P, Holdenrieder S, Wilkowski R, Heinemann V: Prognostic and Therapeutic Significance of Carbohydrate Antigen 19-9 as Tumor Marker in Patients with Pancreatic Cancer. *Oncology*. 2006; 70, S.255-264.
- Boldin 1996 Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85, S.803-815.

- Bosset 2005 Bosset JF: Rectal cancer: preoperative chemoradiation, a new standard. *Cancer Radiother.* 2005; *9*, S.137-139.
- Burlingame 1996 Burlingame RW, Volzer MA, Harris J, Du Clos TW: The effect of acute phase proteins on clearance of chromatin from the circulation of normal mice. *J Immunol.* 1996; *156*, S.4783-4788.
- Calvo 1992 Calvo FA, Azinovic I, Zornoza G, Voltas J, Pardo F, Alvarez-Cienfuego J: Pancreatic Cancer. Hrsg.: Calvo FA: Intraoperative radiotherapy, clinical experiences and results. 1. Auflage Berlin, Springer-Verlag, 1992 S.57-64.
- Conradt 1998 Conradt B, Horvitz HR: The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell.* 1998; *93*, S.519-529.
- Coucke 1995 Coucke PA, Sartorelli B, Cuttat JF, Jeanneret W, Gillet M, Mirimanoff RO: The rationale to switch from postoperative hyperfractionated accelerated radiotherapy to preoperative hyperfractionated accelerated radiotherapy in rectal cancer. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 1995; *32*, S.181-188.
- Cruchten 2002 Van Cruchten S, Van Den Broeck W: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002; *31*, S.214-223.
- Cummings 1997 Cummings MC, Winterford CM, Walker NI: Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997; *21*, S.88-104.
- Darzynkiewicz 1997 Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997; *27*, S.1-20.
- Degterev 2005 Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Juan J: Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005; *1*,
- Desmouliere 1997 Desmouliere A; Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; *29*, S.19-30.
- Dirnagl 1999 Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; *22*, S.391-397.
- Du Clos 1996 Du Clos TW: The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol Biol Rep.* 1996; *23*, S.253-260.
- Duffy 2003 Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer.* 2003; *39*, S.718-727.
- Eble 1994 Eble MJ, Kallinowski F, Wannenmacher MF, Herfarth C: Intraoperative radiotherapy of locally advanced and recurrent rectal cancer. *Chirurg.* 1994; *65*, S.585-592.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer.* 2003; *39*, S.718-727.
- Ellis 1986 Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 1986; *44*, S.817-829.
- Enari 1998 Enari M, Sakahira H, Yokojama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998; *391*, S.43-50.
- Fadeel 2005 Fadeel B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005; *258*, S.479-517.

- Ferreira 2002 Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G: Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2002; 8, S.2024-2034.
- Fishbein 2004 Fishbein TM, Lui J, Wang L, Li Y, Boros P: Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant. *J Surg Res.* 2004; 119, S.51-55.
- Formigli 2000 Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000; 287, S.2017-9.
- Fournie 1995 Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, Lauque D, Carles P: Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett.* 1995; 91, S.221-227.
- Friesen 1999 Friesen C, Fulda S, Debatin KM: Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukaemia.* 1999; 13, S.1854-1858.
- Garcia-Manteiga 2003 Garcia-Manteiga J, Molina-Arcas M, Casado FJ, Mazo A, Pastor-Anglada M: Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2003; 9, S.5000-5008.
- Gastmann 2001 Gastmann BR: Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck.* 2001; 23, S.409-425.
- Gauthier 1996 Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M: Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol.* 1996; 156, S.1151-1156.
- Geiger 2006 Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Nagel D, Seidel D: Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc.* 2006; 21, S.32-37.
- Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Del Tacca M, Danesi R: Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5, S.1387-1395. (A)
- Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, Funel N, Nannizzi S, Ricci S, Orlandini C, Boggi U, Campani D, Del Chiaro M, Iannopolo M, Bevilacqua G, Mosca F, Danesi R: Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res.* 2006; 66, S.3928-3935. (B)
- GITSG 1986 Gastrointestinal Tumor Study Group: Phase II studies of drug combinations in advanced pancreatic carcinoma: fluorouracil plus doxorubicin plus mitomycin C and two regimes of streptozotocin plus mitomycin C plus fluorouracil. *J Clin Oncol.* 1986; 4, S.1794-1798.
- GITSG 1992 Gastrointestinal Tumor Study Group: Radiation therapy and fluorouracil with or without semustine for the treatment of patients with surgical adjuvant adenocarcinoma of the rectum. *J Clin Oncol.* 1992; 10, S.549-557.
- Gorczyca 1993 Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 1993; 53, S.1945-1951.
- Granville 1998 Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM: Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest.* 1998; 78, S.893-913.
- Green 1998 Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281, S.1309-1316.
- Grossmann 2002 Grossmann J: Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis - Anoikis". *Apoptosis.* 2002; 7, S.247-260.
- Grunstein 1997 Grunstein M: Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 1997; 389,

- Guillem 2000 Guillem JG, Puig-La-Calle J Jr, Akhurst T, Tickoo S, Ruo L, Minsky BD, Gollub MJ, Klimstra DS, Mazumdar M, Paty PB, Macapinlac H, Yeung H, Saltz L, Finn RD, Erdi Y, Humm J, Cohen AM, Larson S: Prospective assessment of primary rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy using 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Dis Colon Rectum*. 2000; 43,
- Hagmann 1999 Hagmann M: How chromatin changes its shape. *Science*. 1999; 285, S.1200-1202.
- Harris 2004 Harris M: Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol*. 2004; 5, S.292-302.
- Harrison 2005 *Harrisons Innere Medizin*. Hrsg.: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: 16. Auflage ABW Wissenschaftsverlag, McGraw-Hill, 2005
- Heinemann 1999 Heinemann V, Schermuly MM, Stieber P, Schulz L, Jungst D, Wilkowski R, Schalhorn A: CA 19-9: a predictor of response in pancreatic cancer treated with gemcitabine and cisplatin. *Anticancer Res*. 1999; 19, S.2433-2435.
- Heinemann 2001 Heinemann V, Allescher HD, Busch M, Heiss MM, Helmberger T, Krämling HJ, Lersch C, Roder JD, Schalhorn A, Schoenberg MH, Waldner H, Wiebecke B, Zimmermann F: Karzinome des exokrinen Pankreas. Hrsg.: Heiss MM: Manual Tumorzentrum München. Band Gastrointestinale Tumoren: 6. Auflage München, W. Zuckerschwerdt Verlag, 2001 S.181-196.
- Heinemann 2002 (A) Heinemann V: Present and future treatment of pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 2002; 29, S.23-31. (A)
- Heinemann 2002 (B) Heinemann V: Gemcitabine in the treatment of advanced pancreatic cancer: a comparative analysis of randomized trials. *Semin Oncol*. 2002; 29, S.9-16. (B)
- Heinemann 2006 Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schonekas H, Rost A, Neuhaus H, Haag C, Clemens M, Heinrich B, Vehling-Kaiser U, Fuchs M, Fleckenstein D, Gesierich W, Uthgenannt D, Einsele H, Holstege A, Hinke A, Schalhorn A, Wilkowski R: Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24, S.3946-3952.
- Hendry 1997 Hendry JH, West CM: Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol*. 1997; 71, S.709-719.
- Hendry 2001 Hendry JH: Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2001; 59, S.117-126.
- Hengartner 1992 Hengartner MO, Ellis RE, Hovitz HR: *Ceanorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*. 1992; 356, S.494-499.
- Hengartner 2000 Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407, S.770-776.
- Hewish 1973 Hewish DR, Burgoyne LA: Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Comm*. 1973; 52, S.504-510.
- Hofstra 2000 Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, Boersma HH, van Heerde WL, Doevendans PA, De Muinck E, Wellens HJ, Kemerink GJ, Reutelingsperger CP, Heidendal GA: Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet*. 2000; 356, S.209-212.
- Holdenrieder 1999 Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, Kuehl M, Schulz L, Busch M, Schalhorn A, Seidel D: Apoptosis in serum of patients with solid tumours. *Anticancer Res*. 1999; 19, S.2721-2724.
- Holdenrieder 2001 (A) Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, vPawel J, Schalhorn A, Nagel D, Seidel D: Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 945, S.93-102. (A)

- Holdenrieder 2001 (B) Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Fertig G, Fürst H, Schmeller N, Untch M, Seidel D: Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39, S.596-605. (B)
- Holdenrieder 2001 (C) Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmueller H, Busch M, Fertig G, Fuerst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D: Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer.* 2001; 95, S.114-120. (C)
- Holdenrieder 2004 (A) Holdenrieder S, Stieber P: Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem.* 2004; 37, S.605-17. (A)
- Holdenrieder 2004 (B) Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D: Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10, S.5981-5987. (B)
- Holdenrieder 2004 (C) Holdenrieder S, Stief J, Bergner A, Gamarra F, Mitlewski A, Nagel D, Huber RM, Stieber P: Nucleosomes indicate the in vitro radiosensitivity of irradiated bronchoepithelial and lung cancer cells. *Tumour Biol.* 2004; 25: 321-236. (C)
- Holdenrieder 2005 Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YM: Cell free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem.* 2005; 51, S.1544-1546.
- Holdenrieder 2006 Holdenrieder S, Stieber P, Von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D: Early and specific prediction of the therapeutic efficacy in non-small cell lung cancer patients by nucleosomal DNA and cytokeratin-19 fragments. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075, S.244-257.
- Horvitz 1982 Horvitz HR, Ellis HM, Sternberg PW: Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment.* 1982; 1, S.56-65.
- Ishii H, Okada S, Sato T, Wakasugi H, Saisho H, Furuse J, Ishikawa O, Matsuno S, Yokoyama S: CA 19-9 in evaluating the response to chemotherapy in advanced pancreatic cancer. *Hepatology.* 1997; 44, S.279-283.
- Islam 2001 Islam HK, Fujioka Y, Tomidokoro T, Sugiura H, Takahashi T, Kondo S, Katoh H: Immunohistochemical study of genetic alterations in intraductal and invasive ductal tumors of the pancreas. *Hepatology.* 2001; 48, S.879-883.
- Jahr 2001 Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R: DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001; 61, S.1659-1665.
- Jemal 2006 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56, S.106-130.
- Jiang 2000 Jiang HY, Hickey RJ, Abdel-Aziz W, Malkas LH: Effects of gemcitabine and araC on in vitro DNA synthesis mediated by the human breast cell DNA synthesome. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 45, S.320-328.
- Kalff 2006 Kalff V, Duong C, Drummond EG, Matthews JP, Hicks RJ: Findings on 18F-FDG PET scans after neoadjuvant chemoradiation provides prognostic stratification in patients with locally advanced rectal carcinoma subsequently treated by radical surgery. *J Nucl Med.* 2006; 47, S.14-22.
- Kanduc 2002 Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigalia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Faber E: Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol.* 2002; 21, S.165-170.
- Kelekar 2006 Kelekar A: Autophagy. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1066, S.259-271.
- Kerr 1971 Kerr JF: Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol.* 1971; 105, S.13-20.

- Kerr 1972 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26, S.239-257.
- Kerr 1994 Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73, S.2013-2026.
- Kerr 1995 Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV: Anatomical methods of cell death. *Methods Cell Biol*. 1995; 46, S.1-27.
- Khorasanizadeh 2004 Khorasanizadeh S: The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 2004; 116, S.259-272.
- Kim 2007 Kim NK, Baik SH, Min BS, Pyo HR, Choi YJ, Kim H, Seong J, Keum KC, Rha SY, Chung HC: A comparative study of volumetric analysis, histopathologic downstaging, and tumor regression grade in evaluating tumor response in locally advanced rectal cancer following preoperative chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007; 67, S.204-210.
- Kornberg 1974 Kornberg R: Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974; 184, S.868-871.
- Kornberg 1999 Kornberg RD, Lorch Y: Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999; 98, S.285-294.
- Krammer 2000 Krammer PH: Apoptose. *Dt Ärztebl*. 2000; 97, S.1752-59.
- Kroemer 2005 Kroemer G, Jäättelä M: Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5, S.886-897.
- Kuroi 1999 Kuroi K, Tanaka C, Toi M: Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients. *Breast Cancer*. 1999; 6, S.361-364.
- Kuroi 2001 Kuroi K, Tanaka C, Toi M: Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients. *Int J Oncol*. 2001; 19, S.2721-2724.
- Lamerz 2004 Lamerz R, Stieber P: Tumour markers. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004; 129, S.2722-2730.
- Leist 1997 Leist M, Nicotera P: The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 236, S.1-9.
- Leist 2001 Leist M, Jäättelä M: Four death and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2, S.1-10.
- Li 2004 Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL: Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004; 363, S.1049-1057.
- Lichtenstein 2001 Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR: Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 945, S.239-249.
- Lo 1998 Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM: Presence of dolor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet*. 1998; 351, S.1329-1330.
- Lo 1999 Lo YM, Chan LY, Chan AT, Leung SF, Lo KW, Zhang J, Lee JC, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP: Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999; 59, S.5452-5455.
- Lo 2000 (A) Lo YM, Leung SF, Chan LY, Chan AT, Lo KW, Johnson PJ, Huang DP: Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 2000; 60, S.2351-2355. (A)
- Lo 2000 (B) Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA: Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. 2000; 46, S.319-323. (B)

- Lockshin 1964 Lockshin RA, Williams CM: Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol.* 1964; *10*, S.643-649.
- Lockshin 1969 Lockshin RA: Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *J Insect Physiol.* 1969; *15*, S.1505-1516.
- Lowenfels 1993 Lowenfels AB, Maissonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med.* 1993; *328*, S.1433-1437.
- Lowenfels 2006 Lowenfels AB, Maissonneuve P: Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006; *20*, S.197-209.
- Lowin 1995 Lowin B, Peitsch MC, Tschopp J: Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. Hrsg.: Griffiths GM, Tschopp J: Pathways for cytolysis. Springer-Verlag, 1995 S.1-24.
- Luger 2003 Luger K: Structure and dynamic behaviour of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; *13*, S.127-135.
- Luger 2006 Luger K: Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* 2006; *14*, S.5-16.
- Mackey 1998 Mackey JR, Mani RS, Selner M, Mowles D, Young JD, Belt JA, Crawford CR, Cass CE: Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998; *58*, S.4349-57.
- Maebo 1990 Maebo A: Plasma DNA levels as a tumor marker in primary lung cancer. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1990; *28*, S.1085-1091.
- Maitra 2003 Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH: Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol.* 2003; *16*, S.902-912.
- Maity 1994 Maity A, McKenna G, Muschel RJ: The molecular basis of cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiotherap Oncol.* 1994; *31*, S.1-13.
- Majno 1995 Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; *146*, S.3-15.
- Maor 2006 Maor Y, Nadler M, Barshack I, Zmora O, Koller M, Kundel Y, Fidler H, Bar-Meir S, Avidan B: Endoscopic ultrasound staging of rectal cancer: diagnostic value before and following chemoradiation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; *21*, S.454-458.
- McMillan 2001 McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C: The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; *49*, S.373-377.
- Meade 1995 Meade PG, Blatchford GJ, Thorson AG, Christensen MA, Ternent CA: Preoperative chemoradiation downstages locally advanced ultrasound-staged rectal cancer. *Am J Surg.* 1995; *170*, S.609-613.
- Mertz 2000 Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD: EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc.* 2000; *52*, S.367-371.
- Mesner 1997 Mesner PW, Kaufmann SH: Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol.* 1997; *41*, S.57-87.
- Meyn 1993 Meyn RE, Stephens LC, Ang KK, Hunter NR, Brock WA, Milas L, Peters LJ: Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int J Radiat Biol.* 1993; *64*, S.583-591.

- Micke 2003 Micke O, Bruns F, Kurowski R, Horst E, deVries AF, Hausler JW, Willich N, Schaefer U: Predictive value of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer treated with radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 57, S.90-97.
- Mirkovic 1994 Mirkovic N, Meyn RE, Hunter NR, Milas L: Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo. *Radiother Oncol.* 1994; 33, S.11-16.
- Mirzaie-Joniani 2002 Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Sheikholvaezin A, Johansson A, Löfroth PO, Johansson L, Stigbrand T: Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer.* 2002; 94, S.1210-1214.
- Müller 2006 Müller S, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Bräss J, Nagel D, Seidel D: Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukaemia by nucleosomal DNA fragments. *BMC Cancer.* 2006; 6, S.143-150.
- Muzio 1996 Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo1-) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996; 85, S.817-827.
- Myerson 1995 Myerson RJ, Michalski JM, King ML, Birnbaum E, Fleshman J, Fry R, Kodner I, Lacey D, Lockett MA: Adjuvant radiation therapy for rectal carcinoma: predictors of outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 32, S.41-50.
- Narula 2001 Narula J, Acio ER, Narula N, Samuels LE, Fyte B, Wood D, Fitzpatrick JM, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Kelly C, Steinmetz N, Green A, Tait JF, Leppo J, Blankenberg FG, Jain D, Strauss HW : Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med.* 2001; 7, S.1347-1452.
- NCCN Colon Cancer 2005 Engstrom PF, Benson AB 3rd, Chen YJ, Choti MA, Dilawari RA, Enke CA, Fakhri MG, Fuchs C, Kiel K, Knol JA, Leong LA, Ludwig KA, Martin EW Jr, Rao S, Saif MW, Saltz L, Skibber JM, Venook AP, Yeatman TJ; National Comprehensive Cancer Network: Colon cancer clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Network.* 2005; 3, S.468-491. (A)
- NCCN Rectal Cancer 2005 Engstrom PF, Benson AB 3rd, Chen YJ, Choti MA, Dilawari RA, Enke CA, Fakhri MG, Fuchs C, Kiel K, Knol JA, Leong LA, Ludwig KA, Martin EW Jr, Rao S, Saif MW, Saltz L, Skibber JM, Venook AP, Yeatman TJ; National Comprehensive Cancer Network: Rectal cancer clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Network.* 2005; 3, S.492-508. (B)
- Ng 2002 Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC: Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002; 48, S.1212-1217.
- Nicholson 2000 Nicholson DW: From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature.* 2000; 407, S.810-816.
- NIH 1990 NIH Consensus Conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectum cancer. *JAMA.* 1990; 264, S.1444-1450.
- Nishida 1999 Nishida K, Kaneko T, Yoneda M, Nakagawa S, Ishikawa T, Yamane E, Nishioka B, Miyamoto Y, Takano H, Yoshikawa T, Kondo M: Doubling time of serum CA 19-9 in the clinical course of patients with pancreatic cancer and its significant association with prognosis. *J Surg Oncol.* 1999; 71, S.140-146.
- Okada 1999 Okada C, Mizuochi T: Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. *J Immunol.* 1999; 163, S.5346-5352.
- Okada 2004 Okada H, Mak TW: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4, S.592-603.

- Pandolfi 2001 Pandolfi PP: Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001; 48, S.17-19.
- Pegios 2002 Pegios W, Hunerbein M, Schroder R, Wust P, Schlag P, Felix R, Vogl TJ: Comparison between endorectal MRI (EMRTI) and endorectal sonography (ES) after surgery or therapy for rectal tumors to exclude recurrent or residual tumor . *Rofo.* 2002; 174, S.731-737.
- Pfeiffer 2005 Pfeiffer P, Jenson BV: Drug therapy of patients with metastatic colorectal cancer. *Ugeskr Laeger.* 2005; 167, S.4261-4265.
- Plattner 1997 Plattner, H. & Hentschel J.: Taschenlehrbuch Zellbiologie. 1. Auflage Stuttgart, Thieme-Verlag, 1997
- Raff 1992 Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 1992; 356, S.397-399.
- Rainer 2003 Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, Lo YM: Prognostic uses of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem.* 2003; 49, S.562-569.
- Reed 1999 Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17, S.2941-2953.
- Reiter 2000 Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Lamerz R: Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20, S.5195-5198.
- Richards 2006 Richards DA, Boehm KA, Waterhouse DM, Wagener DJ, Krishnamurthi SS, Rosemurgy A, Grove W, Macdonald K, Gulyas S, Clark M, Dasse KD: Gemcitabine plus CI-994 offers no advantage over gemcitabine alone in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Ann Oncol.* 2006; 17, S.1096-1102.
- Roder 1992 Roder JD, Siewert JR: Analysis of prognosis-associated factors in pancreatic head and peri-ampullary cancer. *Chirurg.* 1992; 63, S.410-415.
- Roder 1996 Roder JD, Stein HJ, Siewert JR: Carcinoma of the periampullary region: who benefits from portal vein resection?. *Am J Surg.* 1996; 171, S.170-174.
- Rumore 1990 Rumore PM, Steinman CR: Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus: occurrence as multimeric complexes bound to histones. *J Clin Invest.* 1990; 86, S.471-477.
- Rumore 1992 Rumore P, Muralidhar B, Lin M, Lai C, Steinmann CR: Hemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance. *Clin Exp Immunol.* 1992; 90, S.56-62.
- Savitz 1998 Savitz SI, Rosenbaum DM: Apoptosis in neurological disease. *Neurosurg.* 1998; 42, S.555-574.
- Schaer 2001 Schaer P: Spontaneous, DNA damage, genome instability, and cancer - when DNA replication escapes control. *Cell.* 2001; 104, S.329-332.
- Schalhorn 2001 Schalhorn A, Siebeck M, Bumm R, Gross M, Günther B, Heiss MM, Huber FT, Lamerz R, Lau-Werner U, Lersch C, Roder JD, Sackmann M, Sander R, Stieber P, Waldner H, Weber B, Wiebcke B, Zoller WG: Rektumkarzinome. Hrsg.: Heiss MM: Manual Tumorzentrum München. Band Gastrointestinale Tumoren: 6. Auflage München, W. Zuckerschwerdt Verlag, 2001 S.244-265.
- Schroder 1997 Schroder RJ, Pegios W, Hunerbein M, Vogl TJ, Hidajat N, Gellermann J, Wust P, Rau B, Schlag P, Felix R: Magnetic resonance tomography and endosonography in the preoperative staging of advanced rectal carcinomas after hyperthermoradiochemotherapy. *Rofo.* 1997; 166, S.199-205.

- Sheard 1999 Sheard MA, Krammer PH, Zaloudik J: Fractionated gamma-irradiation renders tumour cells more responsive to apoptotic signals through CD95. *Br J Cancer*. 1999; *80*, S.1689-1696.
- Sheard 2002 Sheard MA, Vojtesek B, Simickova M, Valik D: Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis. *J Cell Biochem*. 2002; *85*, S.670-677.
- Shiio 2003 Shiio Y, Eisenman RN: Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; *100*, S.13225-13230.
- Shinomiya 2001 Shinomiya N: New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med*. 2001; *5*, S.240-253.
- Shintani 2004 Shintani T, Klionsky DJ: Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004; *306*,
- Sionov 1999 Sionov RV, Haupt Y: The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999; *18*, S.6145-6157.
- Skalka 1976 Skalka M, Matyasova J, Cejkova M: DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett*. 1976; *72*, S.271-274.
- Sorenson 1994 Sorenson GD, Pribish DM, Valone PH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994; *1*, S.67-71.
- Spratlin 2004 Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R, Mackey JR: The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; *10*, S.6956-6961.
- Stemmler 2003 Stemmler J, Stieber P, Szymala AM, Schalhorn A, Schermuly MM, Wilkowski R, Helmberger T, Lamerz R, Stoffregen C, Niebler K, Garbrecht M, Heinemann V: Are serial CA 19-9 kinetics helpful predicting survival in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer treated with gemcitabine and cisplatin. *Onkologie*. 2003; *26*, S.462-467.
- Stieber 1993 Stieber P, Bodenmuller H, Banauch D, Hasholzner U, Dessauer A, Ofenloch-Hahnle B, Jaworek D, Fateh-Moghadam A: Cytokeratin 19 fragments: a new marker for non-small-cell lung cancer. *Cancer*. 1993; *72*, S.707-713.
- Stieber 2001 Stieber P: Sensible use of tumor markers. *J Lab Med*. 2001; *25*,
- Strahl 2000 Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000; *403*, S.41-45.
- Sturgeon 2002 Sturgeon C: Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem*. 2002; *48*, S.1151-1159.
- Szumiel 1998 Szumiel I: Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res*. 1998; *150*, S.92-101.
- Tanner 2004 Tanner JE: Nucleosomes activate NF-kappaB in endothelial cells for induction of the proangiogenic cytokine IL-8. *Int J Cancer*. 2004; *112*, S.155-60.
- Tanuma 1994 Tanuma S, Shiokawa D: Multiple forms of nuclear deoxyribonuclease in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; *203*, S.789-797.
- Tata 1966 Tata JR: Requirement of RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol*. 1966; *13*, S.77-94.

- Thames 1996 Thames HD, Ruifrok AC, Milas L, Hunter N, Mason KA, Terry NH, White RA: Accelerated repopulation during fractionated irradiation of a murine ovarian carcinoma: downregulation of apoptosis as a possible mechanism. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 35, S.951-962.
- Thornberry 1992 Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJ, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Paylha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yanin TT, Lee TD, Shively JE, MecCross JE, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992; 356, S.768-774.
- Thornberry 1999 Thornberry NA: Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 1999; 6, S.1023-1027.
- To 2003 To EW, Chan KC, Leung SF, Chan LY, To KF, Chan AT, Johnson PJ, Lo YM: Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9, S.3254-3259.
- Trauth 1989 Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989; 245, S.301-304.
- Trejo-Becerril 2003 Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Trevino-Cuevas H, Taja-Chayeb L, Garcia-Lopez P, Segura-Pacheco B, Chavez-Blanco A, Lizano-Soberon M, Gonzalez-Fierro A, Mariscal I, Wegman-Ostrosky T, Duenas-Gonzalez A: Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: an in vitro, in vivo and clinical study on cervical cancer patients. *Int J Cancer.* 2003; 104, S.663-668.
- Trejo-Becerril 2005 Trejo-Becerril C, Onate-Ocana LF, Taja-Chayeb L, Vanoye-Carlo A, Cetina L, Duenas-Gonzalez A: Serum nucleosomes during neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer patients. Predictive and prognostic significance. *BMC Cancer.* 2005; 5, S.65.
- Ucker 1997 Ucker DS: Death and dying in the immune system. *Adv Pharmacol.* 1997; 41, S.179-218.
- van Cutsem 2005 (A) van Cutsem EJ, Oliveira J, Kataja VV; ESMO Guidelines Task Force: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of advanced colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2005; 16 *Suppl*, S.18-19. (A)
- van Cutsem 2005 (B) van Cutsem EJ, Kataja VV; ESMO Guidelines Task Force: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up of colon cancer. *Ann Oncol.* 2005; 16 *Suppl*, S.16-17. (B)
- van Loo 2001 Van Loo G, Schotte P, van Gorp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenaabeele P: Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.* 2001; 8, S.1136-1142.
- van Nieuwenhuijze 2003 van Nieuwenhuijze AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA: Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62, S.10-14.
- Vaux 1988 Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335, S.440-442.
- Verhagen 2000 Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL: Identifikation of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000; 102, S.43-53.
- Verheij 2000 Verheij M, Bartelink H: Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301, S.133-142.

- Vogt 1842 Vogt C: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Solothurn. 1842;
- Wagener 1999 Hrsg.: Wagener C: Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2. Auflage Stuttgart, Thieme-Verlag, 1999
- Wang 2003 Wang CW, Klionsky DJ: The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med.* 2003; 9, S.65-76.
- Wente 2005 Wente MN, Eibl G, Reber HA, Friess H, Buchler MW, Hines OJ: The proteasome inhibitor MG132 induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 2005; 14, S.1635-1638.
- White 2001 White RR, Paulson EK, Freed KS, Keogan MT, Hurwitz HI, Lee C, Morse MA, Gottfried MR, Baillie J, Branch MS, Jowell PS, McGrath KM, Clary BM, Pappas TN, Tyler DS: Staging of pancreatic cancer before and after neoadjuvant chemoradiation. *J Gastrointest Surg.* 2001; 5, S.626-633.
- Whittington 1991 Whittington R, Bryer MP, Haller DG, Solin KJ, Rosato EF: Adjuvant therapy of resected adenocarcinoma of the pancreas. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 1991; 21, S.1137-1143.
- Wilkowski 2000 Wilkowski R, Heinemann V, Rau H: Locally advanced pancreatic carcinoma. Radiochemotherapy prolongs survival. *MMW Fortschr Med.* 2000; 142, S.31-32.
- Wilkowski 2004 Wilkowski R, Thoma M, Duhmke E, Rau HG, Heinemann V: Concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine and cisplatin after incomplete (R1) resection of locally advanced pancreatic carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58, S.768-772.
- Wilkowski 2006 Wilkowski R, Thoma M, Bruns C, Wagner A, Heinemann V: Chemoradiotherapy with gemcitabine and continuous 5-FU in patients with primary inoperable pancreatic cancer. *JOP.* 2006; 7, S.349-360.
- Wolmark 2000 Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB, Gordon PH, Petrelli NJ, Deutsch M, Mamounas E, Wickerham DL, Fisher ER, Rockette H, Fisher B: Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92, S.388-396.
- Wyllie 1992 Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G: The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol.* 1992; 4, S.389-397.
- Wyllie 1999 Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, Harrison DJ, Hooper ML, Toft N, Webb S, Bird CC: Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1999; 80, S.34-37.
- Yamada 1981 Yamada T, Ohyama H, Kinjo Y, Watanabe M: Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated in vitro. *Radiat Res.* 1981; 85, S.544-553.
- Yim 2004 Yim EK, Lee KH, Bae JS, Namkoong SE, Um SJ, Park JS: Proteomic analysis of antiproliferative effects by treatment of 5-fluorouracil in cervical cancer cells. *DNA Cell Biol.* 2004; 23, S.769-776.
- Yonehara 1989 Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989; 169, S.1747-1756.
- Yonish 1991 Yonish RE, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wildtype p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 1991; 353, S.345-347.
- Yusoff 2003 Yusoff IF, Mendelson RM, Edmunds SE, Ramsay D, Cullingford GL, Fletcher DR, Zimmerman AM: Preoperative assessment of pancreatic malignancy using endoscopic ultrasound. *Abdom Imaging.* 2003; 28, S.556-562.

- Zerbi 1994 Zerbi A, Fossati V, Parolini D, Carlucci M, Balzano G, Bordogna G, Staudacher C, DiVarol V: Intraoperative radiation therapy adjuvant to resection in the treatment of pancreatic cancer. *Cancer*. 1994; 73, S.2930-2935.
- Zhang 2003 Zhang Y: Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev*. 2003; 17, S.2733-2740.
- Zhao 2001 Zhao M, Beaugard DA, Loizou L, Davletov B, Brindle KM: Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nat Med*. 2001; 7, S.1241-1244.
- Ziegler 2002 Ziegler A, Zangenmeister-Wittke U, Stahel RA: Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?. *Cancer Treat Rev*. 2002; 28, S.255-271.
- Zörnig 2001 Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G: Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta*. 2001; 1551, S.F1-F37.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruracil
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)
ADP	Adenosindiphosphat
APC	adenomatöse Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Units
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Bax	proapoptotisches Mitglied der Bcl-Familie
Bcl	B-cell lymphoma gen
bp	Basenpaare
BRCA	breast cancer related antigen
C	Celsius
CA	Cancer, Karzinom
CA 19-9	Cancer Antigen 19-9
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CAD	Caspasen-abhängige DNase
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
CD	cluster of differentiation
CDDE	Cell Death Detection ELISA
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CYFRA 21-1	Cytokeratin 19-Fragment
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

DNase	Desoxyriboneklease
DUKES	Klassifikation für kolorektale Karzinome
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assey
ERCP	endoskopisch-retrograde Cholangiopankreatikographie
et al	und andere
FAP	familiäre adnomatöse Polyposis
Fas	Name eines Todesrezeptoren
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie
g	Gramm
Gy	Gray [Bestrahlungseinheit]
h	Stunden
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch-Syndrom)
HWZ	Halbwertszeit
ICRU	International Commission of Radiation Units and Measurements
IORT	intraoperative Radiotherapie
J	Jahre
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KOF	Körperoberfläche
KP	Keine Progression
KRK	Kolorektales Karzinom
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
µl	Mikroliter
m	männlich
mg	Milligramm
min	Minuten

NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	Anzahl
ng	Nanogramm
ns	nicht signifikant
OP	Operation
P	Progression
p53	Name eines Tumorsuppressorgens
Pat	Patient
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PET	Positronenemissionstomographie
pH	pondus hydrogenii
post-op	postoperativ
POD	Peroxidase
prä-op	präoperativ
PD	progressive disease
Prog	Progression
PR	partial remission
ras	Name eines Onkogens
RCT	Radiochemotherapie

Rem	Remission
Rez	Rezidiv
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Radiotherapie
SD	stable disease
sig	signifikant
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	terminal deoxyribonucleotid transferase mediated dUTP nick end labeling
U	Units
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (Klassifikation verschiedener Karzinome)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
w	weiblich

8.2 Ethikantrag

An die
Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Antrag auf die Prüfung durch die oben genannte Ethik-Kommission für folgende Studie:

Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum

Studienleitung

Dr. med. Petra Stieber

Institut für Klinische Chemie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel

Dr. med. Ralf Wilkowski

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Direktor: Prof. Dr. med. E. Dühmke

Prof. Dr. med. Andreas Schalhorn
PD Dr. med. Volker Heinemann

Medizinische Klinik III
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Klinikum der Universität München -Großhadern-
Marchioninstr. 15, D-81377 München

1 Formalia

1.1 Antragsteller:

Frau Dr. med. Petra Stieber
Institut für Klinische Chemie
Klinikum der Universität München -Großhadern-
Marchioninstr. 15
81377 München
Tel.: 089/ 7095-3115
Fax: 089/ 7095-6298

1.2 Titel des Forschungsvorhabens:

Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum

1.3 Ausbildungsdaten und Prüferfahrung:

Erfahrung in der Durchführung prospektiver, multizentrischer Studien zur Erhebung der klinischen Relevanz von labordiagnostischen Parametern insbesondere in der Onkologie.

1.4 Multizenterstudien:

entfällt

1.5 Schriftliche Zustimmungen

im Anhang

1.6 Finanzierung

Die für die Untersuchungen anfallenden Materialien und Reagenzien werden vom Institut für Klinische Chemie gestellt.

1.7 Versicherungsschutz

entfällt

1.8 Erklärung zur Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki

Die Antragstellerin (Dr. med. Petra Stieber) und die anderen Studienleiter (Dr. med. Ralf Wilkowski, Prof. Dr. med. Andreas Schalhorn, PD Dr. med. Volker Heinemann) werden die Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki aus dem Jahre 1964 und deren Novellierungen von Tokio 1975, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 und Edinburgh 2000 durchführen.

2 Spezielle Angaben zum Forschungsvorhaben

2.1 Fragestellung

2.1.1 Hypothese, Ziel, Bedeutung

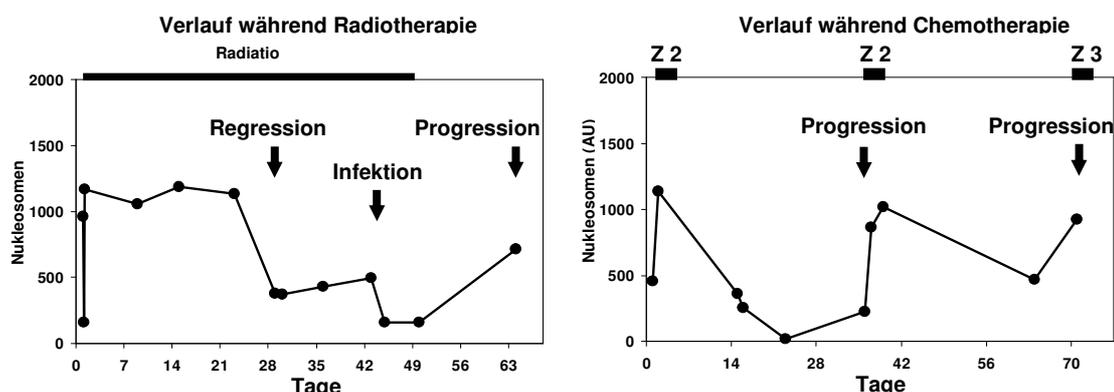
Apoptose-Produkte, wie z.B. Nukleosomen, werden bei verschiedenen Erkrankungen spontan und im Rahmen von therapeutischen Interventionen freigesetzt. Bei Patienten mit Tumorerkrankungen wurden während Chemo- und Radiotherapie bereits charakteristische Muster der Freisetzung von Nukleosomen beobachtet.

In der beantragten Studie soll untersucht werden, inwiefern der individuelle Therapieverlauf mit bestimmten Mustern korreliert und ob sich davon frühzeitig prädiktive Aussagen über das Ansprechen einer Therapie ableiten lassen.

2.1.2 Grundlagen, bisherige Erfahrungen, Gefährlichkeit

Nukleosomen sind grundlegende Struktur- und Funktionselemente des Chromatins. Sie bestehen aus einer zentralen Protein- und einer peripheren DNA-Komponente. Bei physiologischem wie auch therapie-induziertem Zelltod, insbesondere bei Apoptose, wird das Chromatin durch Nukleasen und Proteasen in diese basalen mono- und oligonukleosomalen Elemente gespalten. Im Laufe des Zelltodprozesses gelangen diese Bruchstücke in den extrazellulären Raum und können – v.a. bei unphysiologisch gesteigertem Zelltodvorkommen – auch in der Blutbahn nachgewiesen werden. Dort können sie als Korrelat der stattgefundenen Zellestörung herangezogen werden. Für die Bestimmung der Nukleosomen wurde im Institut für Klinische Chemie ein Test entwickelt, mit dem bereits eine methodische und klinische Evaluierung vorgenommen wurde.

Sowohl bei Patienten während Radiotherapie wie auch während Chemotherapie liegen erste Ergebnisse vor, die eine frühzeitige Reaktion der Nukleosomenkonzentration im Blut nach antitumoröser Therapie anzeigen, deren Ausprägung im Zusammenhang steht mit dem Ansprechen der Therapie. Von besonderer Bedeutung scheint der Anstieg der Nukleosomenmenge direkt nach Therapiebeginn und die Abfallsgeschwindigkeit bzw. die Verzögerung des Rückgangs während der ersten Therapiewoche zu sein. Ferner enthielt der weitere Verlauf während Radiotherapie oder die Werte jeweils vor den folgenden Zyklen der Chemotherapie zusätzliche Informationen für das therapeutische Ansprechen und das eventuelle Auftreten von stärkeren Nebenwirkungen.



Nun soll bei einer größeren Gruppe von Patienten mit definierten malignen Erkrankungen und definierten Therapiemodalitäten untersucht werden, ob sich durch die laborchemische Bestimmung von Zelltodparametern wie Nukleosomen im Verlauf von Radio- und Chemotherapie der klinische Therapieverlauf kontrolliert und frühzeitig die Therapieeffizienz beurteilt werden kann. Dafür sind mehreren Blutabnahmen erforderlich, die lediglich mit den minimalen Gefahren einer gering-invasiven Untersuchung behaftet sind.

2.2 Kurzbeschreibung der Studie

Es handelt sich bei der beantragten Studie um eine wissenschaftliche Studie mit rein diagnostischen Untersuchungen ohne eine direkte therapeutische Relevanz für die Patienten.

Es werden zu bestimmten Zeitpunkten während der Therapie Blutentnahmen bei den Patienten vorgenommen, wobei diese nach Möglichkeit mit Routineabnahmen kombiniert werden, um die Belastungen für die Patienten möglichst gering zu halten.

Zusätzliche Blutabnahmen werden nur in der jeweils ersten Therapiewoche und maximal einmal täglich durchgeführt, um eine engmaschige Bestimmung der Kinetik der Parameter in diesem engen Zeitfenster zu gewährleisten. Danach werden die Blutabnahmen wöchentlich (Radiotherapie) oder mehrwöchentlich vor den folgenden Zyklen (Chemotherapie) vorgenommen.

Als Vergleichsmethoden zur Beurteilung des therapeutischen Ansprechens werden die in der klinischen Routine durchgeführten klinischen, laborchemischen und bildgebenden Verfahren herangezogen. Die Veränderungen der Tumorgröße (UICC Kriterien) werden als Kriterium des Therapieerfolgs verwendet. Als Korrelat des biochemischen Ansprechens dienen bereits etablierte klinisch-chemische Parameter, u.a. Tumor assoziierte Antigene. Zusätzlich werden klinische Nebenwirkungen dokumentiert.

2.3 Design der Studie (mit 2.4)

2.3.1 Patienten

In die Studie sollen während strahlentherapeutischer Behandlung Patientengruppen mit folgenden Erkrankungen aufgenommen werden:

- Pankreas- / Galle- / Gallengangs-Karzinom
- Kolorektales Karzinom
- Bronchial-Karzinom
- Mamma-Karzinom
- HNO-Karzinom
- Lymphom
- Sarkom
- Karzinome des ZNS

Als Therapiemodalitäten kommen Radio- und kombinierte Radiochemotherapie in Betracht.

Während chemotherapeutischer Behandlung sollen Patientengruppen mit folgenden Erkrankungen untersucht werden:

- Pankreas- / Galle- / Gallengangs-Karzinom
- Kolorektales Karzinom

- Bronchial-Karzinom
- Mamma-Karzinom
- Lymphom
- Karzinome des ZNS

Dabei erhalten die Patienten die im Klinikum Großhadern routinemäßig verwendeten Therapieschemata.

Die jeweiligen Patientengruppen mit definierten Erkrankungen und Therapiemodalitäten sollen zwischen 30 und 50 Patienten enthalten, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Dabei werden keine Selektionskriterien angewendet. Innerhalb der Patientengruppen wird eine entsprechende Unterteilung nach Stadien, nach Krankheitsstatus und Therapiemodus vorgenommen.

Die Studie soll im Mai 2002 beginnen und ist auf eine Dauer von 2 Jahren angelegt. In halbjährlichen Abständen werden jeweils Zwischenauswertungen durchgeführt.

2.3.2 Blutentnahme-Zeitpunkte

Die Blutabnahmezeitpunkte werden so festgelegt, daß sie im normalen klinischen Ablauf der jeweiligen Therapie vorgenommen werden können. Nach Möglichkeit werden sie mit ohnehin anfallenden Routineabnahmen zusammengelegt.

Während Radiotherapie ist folgendes Entnahmeschema vorgesehen:

1. vor Beginn der Radiotherapie (prätherapeutischer Wert)	1
2. engmaschig (1x täglich) während der ersten Woche (6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d nach Beginn der Therapie)	8
3. weitmaschiger (1x wöchentlich) während der weiteren Therapie (2w, 3w, 4w, 5w nach Beginn der Therapie)	4
4. nach Beendigung der Radiotherapie (posttherapeutischer Wert)	1
	—
insgesamt	14

Während Chemotherapie ist folgendes Entnahmeschema vorgesehen:

1. vor Beginn der Chemotherapie (prätherapeutischer Wert)	1
2. engmaschig (1x täglich) während der ersten Woche (1d, 2d, 3d, 4d, 7d nach Beginn der Therapie)	5
3. weitmaschiger (vor jedem neuen Therapiezyklus) während der weiteren Therapie (z2, z3, z4, z5, z6)	5
4. nach Beendigung der Chemotherapie (posttherapeutischer Wert)	1
	—
insgesamt	12

2.3.3 Ethisch-relevante Probleme der Studie

Als ethisch-relevante Probleme sind die während der ersten Therapiewoche, zusätzlich zu den Routineblutabnahmen vorzunehmenden Blutabnahmen zu nennen. Da die Patienten durch die daraus folgenden Untersuchungen keinen unmittelbaren Nutzen ziehen können, ist eine gezielte und umfassende Aufklärung der Patienten vor der Aufnahme in die Studie vorgesehen und die informierte Zustimmung erforderlich.

Andererseits sind die durch Blutentnahmen entstehenden Risiken gering. Auch ist das zu entnehmende Volumen von ca. 10 ml Vollblut sehr begrenzt.

Die Ergebnisse der erhobenen Untersuchungen haben keine direkte therapeutische Relevanz für die Patienten. Somit werden an den ursprünglich geplanten therapeutischen Entscheidungen keine Änderungen vorgenommen weder im Sinne des Zusätzlichen noch des Vorenthaltenen.

Die Einteilung nach Studienarmen erfolgt erst bei der statistischen Auswertung, so dass keine Randomisierung notwendig ist.

Die Ergebnisse werden nur für die statistische Auswertung verwendet. Personendaten werden dafür verschlüsselt und nicht an Dritte weitergegeben. Sie unterliegen den datenschutzrechtlichen Regelungen.

2.5 Zustimmungsfähigkeit

Es werden ausschließlich erwachsene Personen mit vollständiger Aufklärungs- und Zustimmungsfähigkeit in die Studie aufgenommen. Von diesen wird eine schriftliche Erklärung der informierten Zustimmung eingeholt.

2.6 Honorierung von Probanden oder Patienten

Eine Honorierung von Probanden oder Patienten ist nicht vorgesehen.

2.7 Versicherung

entfällt

2.8 Datenschutz

Der Schutz der persönlichen Daten der Teilnehmer wird in der heute juristisch geforderten Form gewährleistet: Diese beinhalten die vertrauliche Behandlung der Daten, die ausschließlich anonyme Verwendung der Daten zu statistischen Auswertungen und wissenschaftlichen Publikationen, sowie die Nicht-Weitergabe der Daten an Dritte. Die Teilnehmer werden über die datenschutzrechtlichen Regelungen aufgeklärt (siehe 2.9)

2.9 Patienteninformation und Einverständniserklärung

im Anhang

Anlage 1: Schriftliche Zustimmungen

Klinikum Großhadern

LMU
Ludwig
Maximilians
Universität
München

81377 München
Marchioninstr. 15
Durchwahl: (089) 7095-1

Hiermit erkläre ich meine Zustimmung zu dem beigefügten Ethikantrag und dem Studienprotokoll zu folgender Studie

Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum

die unter der Studienleitung von Frau Dr. med. P. Stieber, Institut für Klinische Chemie, Herrn Dr. med. R. Wilkowski, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Herrn Prof. Dr. med. A. Schalhorn und Herrn PD Dr. med. V. Heinemann, Medizinische Klinik III durchgeführt werden soll.

.....
Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel
Direktor des Instituts für Klinische Chemie
Klinikum Großhadern

.....
Prof. Dr. med. E. Dühmke
Direktor der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Klinikum Großhadern

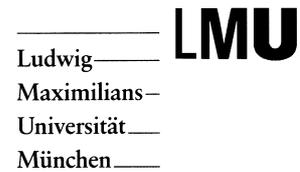
.....
Prof. Dr. med. W. Hiddemann
Direktor der Medizinischen Klinik III
Klinikum Großhadern

Anlage 2: Patienteninformation Radiotherapie

Klinikum der Universität München

Institut für Klinische Chemie – Großhadern
 Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
 Direktor: Prof. Dr. med. E. Dühmke



Klinikum der Universität München – Großhadern
 Marchioninistraße 15 • D-81377 München

Betreuer der Studie:

Institut für Klinische Chemie :

Frau Dr. Petra Stieber, Herr Andreas Kremer, Herr Stefan Holdenrieder (Tel: 3115 oder 6115)

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie:

Herr Dr. Ralf Wilkowski (Tel 3729)

Informationsblatt für Patienten

zur Studie

**„Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum
 bei Patienten mit malignen Tumoren während Strahlentherapie“**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

in den letzten Jahren hat es in der Medizin – besonders in der Onkologie (Wissenschaft, die sich mit der Entstehung und Behandlung von Tumoren befaßt) – viele neue Errungenschaften und Fortschritte gegeben. Bei der Überwachung der Strahlentherapie werden heute zum Beispiel verbesserte bildgebende Verfahren wie Computer- und Magnetresonanztomographie eingesetzt. Außerdem zeigen neue, vielversprechende Ansätze, daß durch spezielle Blutuntersuchungen möglicherweise bereits zu einem früheren Zeitpunkt das Ansprechen von Tumorzellen auf die Therapie festgestellt werden kann.

Im Institut für Klinische Chemie wurde ein Test entwickelt, der die Menge von sogenannten „Nukleosomen“ im Blut bestimmen kann. Nukleosomen sind Bestandteile des Zellkerns, die natürlicherweise freigesetzt werden, wenn Zellen (durch sogenannte „Apoptose“) abgebaut und durch neue ersetzt werden. Durch die Strahlentherapie sollen Tumorzellen gezielt geschädigt und beseitigt werden. Dabei gelangen große Mengen an Nukleosomen in die Blutbahn.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, daß die Freisetzung während der ersten Behandlungswoche möglicherweise von besonderer Bedeutung für das Ansprechen der Therapie ist. Nun wollen wir untersuchen, ob durch die Nukleosomenfreisetzung während der Therapie deren Wirksamkeit schon frühzeitig abgeschätzt werden kann. Wenn dies zutrifft, könnte durch einfache Blutuntersuchungen eine verbesserte Überwachung der Therapie erfolgen.



Für dieses Anliegen bitten wir Sie um Ihre freundliche Unterstützung.

Wie Sie wissen, werden während der Zeit Ihrer Behandlung mehrmals Blutproben routinemäßig entnommen, um eventuelle Nebenwirkungen der Therapie rasch zu erfassen. Im Rahmen dieser Studie würden bei diesen Abnahmen zusätzlich wenige Milliliter Blut entnommen, so daß dadurch keine zusätzliche Belastung für Sie entsteht. Lediglich in der ersten Woche der Strahlentherapie, die für diese Untersuchungen von besonderer Wichtigkeit ist, würden wir täglich eine Blutprobe benötigen – falls nicht ohnehin routinemäßig eine Abnahme erfolgt.

Natürlich erhalten Sie alle standardisierten Verfahren zur Therapieüberwachung. Die Therapie selbst wird durch die Ergebnisse der Nukleosomenuntersuchungen nicht beeinflußt. Auch wenn Sie selbst durch die Teilnahme an der Studie keinen direkten Vorteil genießen werden, helfen Sie bei der Entwicklung von neuen Methoden aktiv mit, die möglicherweise in den kommenden Jahren die Therapieüberwachung verbessern können.

Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt werden, haben nur die an der Studie beteiligten Personen. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Weitergabe der Untersuchungsergebnisse erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken, und Sie werden darin, wie auch in eventuellen wissenschaftlichen Veröffentlichungen, nicht namentlich genannt.

Wir machen Sie darauf aufmerksam, daß die Teilnahme an dieser Studie selbstverständlich freiwillig ist. Sie haben die Möglichkeit, jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere Behandlung aus der Studie auszutreten.

Für weitere Fragen und Gespräche, auch zu einem späteren Zeitpunkt, stehen Ihnen die an der Studie beteiligten Personen – insbesondere Herr Kremer – gerne zur Verfügung.

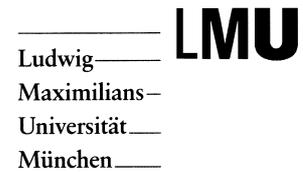
Anlage 4: Einverständniserklärung Radiotherapie

Klinikum der Universität München

┌ Institut für Klinische Chemie – Großhadern ┐
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Direktor: Prof. Dr. med. E. Dühmke

Klinikum der Universität München – Großhadern
Marchioninistraße 15 • D-81377 München



Patientenetikett

Betreuer der Studie:
Institut für Klinische Chemie :
Frau Dr. Petra Stieber (Tel: 3115)
Herr Andreas Kremer (Tel: 6115)
Herr Stefan Holdenrieder (Tel: 6115)
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie:
Herr Dr. med. Ralf Wilkowski (Tel 3729)

Einverständniserklärung

Ich habe das Informationsblatt für Patienten zur Studie „Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum bei Patienten mit malignen Tumoren während Strahlentherapie“ gelesen und verstanden. Im Moment habe ich keine weiteren Fragen, kann mich aber jederzeit bei Fragen an die die Studie betreuenden Personen wenden.

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten / der Patientin

Unterschrift des Studienbetreuers



9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum München – Großhadern – der Ludwig-Maximilians-Universität (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel) durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Überlassung des Themas und die Gewährleistung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Klinische Chemie.
- Frau Dr. med. Petra Stieber für die intensive Unterstützung während der Doktorarbeit, die zahl- und lehrreichen Diskussionen, sowie ihre fachliche Förderung und Betreuung.
- Frau Dr. rer. nat. Dorothea Nagel für ihre kenntnisreiche Betreuung bei der statistischen Auswertung und die Diskussionen der Ergebnisse.
- Herrn Dr. med. Stefan Holdenrieder für seine tatkräftigen Einsätze und sehr hilfreichen Unterstützungen als Betreuer.
- Frau Karin Hoffmann und Frau Gabi Hansmann für ihre Hilfestellungen bei EDV-Problemen, der Einführung am Elecsys und der Erstellung von Postern und Vorträgen.
- Herrn PD. Dr. med. Ralf Wilkowski, ehemaliger leitender Oberarzt der Strahlentherapie des Klinikums Großhaderns, für die konstruktive Zusammenarbeit, die Überlassung der Patientenseren und die Diskussion der Ergebnisse.
- allen Mitarbeitern des Bereichs Protein- und Immunchemie und in der Annahme, für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung beim Erlernen von Bestimmungsmethoden.
- allen Mitdoktoranden für den guten Zusammenhalt und die oftmals intensiven Hilfeleistungen, sowie die abwechslungsreiche Zeit in der Tumormarker-Gruppe.

- Meiner Familie, Herrn Prof. Dr. Martin Schreiber und Herrn Dr. Wolfgang Dobrinski für ihre Geduld und Unterstützung bei der Entstehung dieser Doktorarbeit.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: **Andreas Emanuel Kremer**
 Geburtsdatum: 03. März 1978
 Geburtsort: München
 Eltern: Prof. Dr. Heinrich und Dr. Gundula Kremer
 Geschwister: Fabian Kremer (27), Hotelgewerbe

SCHULAUSSBILDUNG (1984 – 1997)

07/1997 Abitur, Leistungskurs Chemie und Französisch

ZIVILDIENTST

1997 – 1998 Zivildienst bei der Sozialstation Füssen

HOCHSCHULSTUDIUM

1998 – 2006 Ludwig-Maximilian-Universität (LMU), München
 9. Juni 2006 Approbation

FAMULATUREN

Innere Medizin Kreisklinikum Ostallgäu, Füssen, Prof. H. Kremer
 Innere/Pädiatrie Gemeinschaftspraxis Dr. A. Kircher, Gersfeld
 Klinische Chemie Klinikum Großhadern, Prof. D. Seidel
 Augenheilkunde Rotkreuzkrankenhaus/ALZ, Prof. T. Neuhann

PRAKTISCHES JAHR (02/2005 – 01/2006)

Chirurgie King Edward VIII Hospital, Durban, South Africa
 Royal North Shore Hospital, Sydney, Australia
 Innere Klinikum Großhadern, Med. Klinik II und III
 Augenheilkunde Augenklinik der Universität München

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

11/06 – 03/07 Assistenzarzt in der Med. Klinik II, Klinikum Großhadern
 Seit 04/07 Post Doc am Dep of Experimental Hepatology, Amsterdam

Amsterdam, den 24. November 2007