

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

**Expression von EGF-Rezeptoren und seinen Downstream-Effektoren K-ras und
PTEN im kolorektalen Karzinom: Korrelation mit klinisch-pathologischen
Daten und der Prognose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Marie Christin Luczak

2010

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. S.E. Baldus

Koreferent: PD Dr. med. N. Stoecklein

Für meine liebe Oma

Gerda Skubala

1 Einleitung

1.1. Epidemiologie kolorektaler Karzinome	1
1.2. Ätiologie kolorektaler Karzinome	1
1.2.1 Ernährung und Lebensstil	1
1.2.2. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	4
1.2.3. Iatrogene Faktoren	4
1.2.4. Genetische Faktoren	5
1.2.4.1. Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	5
1.2.4.2. Hereditäres Nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom	6
1.3. Histologie und Morphologie	6
1.4 Staging und Grading	7
1.5. Molekulare Karzinogenese	9
1.6. Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR)	12
1.7. Der EGFR in der Therapie des kolorektalen Karzinoms	16
1.8. PTEN	18
1.9. K-ras	20
1.10. Fragestellung	23

2 Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv	24
2.2. Gewebemikroarrays	24
2.2.1. Herstellung der Gewebemikroarrays	24
2.3. Immunhistochemie	23
2.3.1. Verwendete Antikörper	23
2.3.2. Immunhistochemische Methode	25
2.3.3. Färbeprotokolle	26
2.3.3.1. EGFR-Färbeprotokoll	26
2.3.3.2. EnVision™+HRP Färbeprotokoll für PTEN und Ras	27
2.4. Mikroskopische Auswertung	29
2.5. Statistische Analyse	29

3 Ergebnisse

3.1. Beispiele immunhistochemischer Expressionsmuster	30
3.2. Beschreibung des Patientenkollektivs	32
3.2.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter	32
3.2.2. Korrelation der klinisch-pathologischen des Gesamtkollektivs und der 5-Jahres-Überlebensrate	33

3.3. Statistische Analyse der EGFR Immunhistochemie	36
3.3.1. Häufigkeitsverteilung der EGFR-Expression an Invasionsfront und im Tumorzentrum	36
3.3.2. Beziehung zwischen der EGFR-Expression und klinisch- pathologischen Parametern	37
3.3.3. Überlebensanalyse	39
3.4. Statistische Analyse der PTEN Immunhistochemie	41
3.3.1. Häufigkeitsverteilung der PTEN-Expression an Invasionsfront und im Tumorzentrum	41
3.3.2. Beziehung zwischen der PTEN-Expression und klinisch-pathologischen Parametern	42
3.3.3. Überlebensanalyse	45
3.5. Statistische Analyse der K-ras Immunhistochemie	47
3.3.1. Häufigkeitsverteilung der K-ras-Expression an Invasionsfront und im Tumorzentrum	47
3.3.2. Beziehung zwischen der K-ras-Expression und klinisch-pathologischen Parametern	48
3.3.3. Überlebensanalyse	50

4 Diskussion

4.1. Analyse der klinisch-pathologischen Daten	52
4.2. Analyse der immunhistochemischen Expressionsmuster	53
4.2.1. EGFR – Qualitative und quantitative Expression Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und Überlebenszeit	53
4.2.2. PTEN – Qualitative und quantitative Expression Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und Überlebenszeit	56
4.2.3. K-ras – Qualitative und quantitative Expression Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und Überlebenszeit	58

5 Zusammenfassung	62
--------------------------	----

6 Literaturverzeichnis	63
-------------------------------	----

Lebenslauf

Danksagung

1 Einleitung

1.1. Epidemiologie kolorektaler Karzinome

Das kolorektale Karzinom gehört mit ca. einer Million Neuerkrankungen weltweit zu den häufigsten Krebsarten. Es tritt besonders häufig in den Industrienationen auf, die höchsten Inzidenzraten findet man in Nordamerika, Australien/Neuseeland und in Westeuropa. Selten kommt das kolorektale Karzinom im Großraum Asien oder Afrika vor (Parkin et al. 2002).

In Deutschland zählt das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Krebsarten. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen tritt es derzeit an zweithäufigster Stelle nach dem Mamma- bzw. dem Lungenkarzinom auf. Außerdem ist es bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2008).

Im europäischen Vergleich zeigt Deutschland die höchsten Neuerkrankungsraten. Die niedrigsten Inzidenzraten in der Europäischen Union findet man in Griechenland und Finnland (Robert-Koch Institut, 2004).

Im Jahre 2002 schätzte das Robert-Koch Institut die Anzahl der Neuerkrankungen auf 35.599 bei Männern (72,9 pro 100.000 Einwohner) und 35.816 bei Frauen (50,1 pro 100.000 Einwohner).

Interessanterweise registrierte das statistische Bundesamt im Verlauf der Jahre von 1998 bis 2006 einen Rückgang der durch bösartige Neubildungen des Dickdarms verursachten Todesfälle.

Es zeigte sich, dass das kolorektale Karzinom bevorzugt im fortgeschrittenen Alter auftritt. Männer erkranken durchschnittlich mit 69 Jahren, Frauen mit 75 Jahren.

Bei Kindern findet man das kolorektale Karzinom extrem selten.

Die Inzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahr stark an.

43% aller Männer sind bei Diagnosestellung 70 Jahre und älter, Frauen in 58% der Fälle. Die Mortalitätsrate verdoppelt sich ab dem 50. Lebensjahr sprunghaft (von 17,54 auf 38,41 Allgemeine Sterblichkeitsrate). Aus diesem Grunde ist die Früherkennung ab diesem Alter besonders effektiv.

1.2. Ätiologie kolorektaler Karzinome

1.2.1. Ernährung und Lebensstil

Aktuell sind einige unterschiedliche Faktoren beschrieben, die die kolorektale Karzinogenese beeinflussen.

Vor allem die mit der Nahrung eingenommenen Substanzen können direkt auf die Mukosa des Darmes reagieren. Sie werden außerdem durch die intestinale Flora metabolisiert und führen so zu pH-Veränderungen, ebenso wie zu einer Reihe von Abbauprodukten wie kurzkettigen Fettsäuren oder sekundären Gallensäuren, die kanzerogen wirken.

Fett, Fleisch und Alkohol stehen im Verdacht, den Anteil an freien Radikalen zu erhöhen, besonders den der reaktiven Sauerstoff-Radikalen. Diese wirken zusammen mit Fettabbauprodukten (4-Hydroxyalkenen) genotoxisch. Sie oxidieren Basen an der DNA und führen zu Veränderungen am Genom. Außerdem können sie die Bildung anderer toxischer Metaboliten und reaktiver Abbauprodukte von Fettsäuren verstärken.

Auch die indirekte Schädigung des Kolonepithels über die Gallenabsonderungen spielt eine Rolle. Stoffe, die bereits im Dünndarm und Magen absorbiert wurden, werden über den enterohepatischen Kreislauf verstoffwechselt und dem Kolon als reaktive Metabolite erneut zugeführt. Die intestinale Epithelzelle wird zwar durch eine Schleimhautschicht geschützt, die die reaktiven Substanzen teilweise inaktivieren kann, doch sind die Zellen relativ anfällig für Toxine. Im Vergleich zur Leber besitzen sie wenige Phase-II-Enzyme, die die genotoxischen Karzinogene inaktivieren können. Physische Aktivität sorgt für eine mechanische Stimulation, dies wiederum führt zu häufigeren Stühlen und somit zu einem kürzeren Kontakt des Darmepithels mit toxischen Metaboliten (Berlau et al. 2003). So ist es nicht verwunderlich, dass physisch inaktive Menschen ein erhöhtes Darmkrebsrisiko aufweisen.

Dass die Ernährung einen Einfluss auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms haben könnte, zeigte schon Whittemore, der in einer Langzeitstudie nach Nordamerika migrierte Chinesen beobachtete und dabei feststellte, dass sie, verglichen mit der allgemeinen Bevölkerung in der Volksrepublik China, ein 4-7-fach erhöhtes Risiko hatten, an Darmkrebs zu erkranken. Er stellte die These auf, dass die Menge an gesättigten Fettsäuren von mehr als 10 g/Tag vor allem in Kombination mit einer geringen körperlichen Aktivität für mehr als 60% der kolorektalen Karzinome

chinesisch-amerikanischer Männer verantwortlich sei. Auch Pischon et al. bestätigten den positiven Zusammenhang zwischen erhöhten Körpergewicht/Body-Mass-Index und dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken, allerdings vor allem bei Männern in den europäischen Staaten.

Ein allgemein erhöhter Fleischkonsum wird von vielen Autoren für das erhöhte Risiko verantwortlich gemacht, hierbei gilt vor allem rotes Fleisch als bedenklich, nicht jedoch weißes Fleisch oder Fisch (Cross et al., 2007, Kuhnle et al. 2007). Verantwortlich dafür werden die N-Nitrosamin-Verbindungen gemacht, deren Entstehung durch den Häm-Anteil im Hämoglobin begünstigt werden (Kuhnle et al., 2007).

Dass vor allem rotes Fleisch das kolorektale Karzinom begünstigt, belegen auch Giovannucci et al. 1994 in ihrer Studie.

Häufiger Konsum von Früchten, Gemüse und fettreduzierten Lebensmitteln senken dagegen das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken. Den stärksten protektiven Effekt haben nach Studien vor allem Ballaststoffe aus Gemüse (Flood et al. 2008, Ghadirian et al. 2008).

Ballaststoffe führen zur schnelleren Passagezeit des Stuhls, binden Toxine und regen den anaeroben Abbau an. Dieser Prozess reduziert die Kontaktzeit zwischen den toxischen Substanzen und der Mukosa, senkt den pH-Wert und die Umwandlung von Gallensäuren (Bingham et al. 2003).

Alkohol ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Er wirkt direkt toxisch über sein Abbauprodukt Azetaldehyd. In Kombination mit Folsäure- und Methioninmangel führt erhöhter Alkoholkonsum zu einer gestörten DNS-Methylierung. Dies kann zu einer Hemmung der Transkription von Tumorsuppressorgenen bewirken, als auch eine Förderung der Expression von Protoonkogenen (Berlau et al. 2003).

Nicht nur dem Alkoholkonsum, sondern auch dem Zigarettenkonsum misst man eine karzinogene Wirkung bei. Nikotinabusus in jungen Jahren als auch über einen langen Zeitraum seien besonders kritisch (Giovannucci et al. 2002, Adetunji et al. 2008). So erhöhte sich das Risiko an Darmkrebs zu erkranken bei Frauen, die 30 Jahre lang rauchten um 25%. Das Erkrankungsrisiko senkte sich erst wieder nach 20 Jahre Nikotin-Abstinenz (Verla-Tebit et al. 2006).

Dass die Ernährung einen wesentlichen Beitrag zur Ätiologie des kolorektalen Karzinoms leistet, zeigen die oben aufgeführten Daten. Allerdings ist die Studienlage uneindeutig, darum können keine verbindlichen Aussagen gemacht werden.

1.2.2. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehören die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn. Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronische Entzündung der Dickdarmschleimhaut, die charakteristischerweise im Rektum beginnt und sich kontinuierlich nach oral ausbreitet (Herold 2007). Eaden et al. zeigten ein kumulatives Risiko von 2%, 8% und 18% nach 10, 20 und 30 Jahren, an Darmkrebs zu erkranken. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist das Risiko 19fach erhöht. Risikofaktoren sind junges Alter bei Diagnosestellung, weitflächiger Darmbefall und lange Krankheitsdauer, koexistierende sklerosierende Cholangitis und eine positive Familienanamnese.

Neuere Studien weisen daraufhin, dass die modernen Therapiemaßnahmen und die chirurgischen Techniken die Möglichkeit der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms senken (Zisman et al 2008).

Der Morbus Crohn zeichnet sich durch eine transmurale Entzündung des Darms aus, die meist im terminalen Ileum beginnt und sich diskontinuierlich im Dün- und Dickdarm ausbreitet. Gillen et al. stellten 1994 in ihrer Studie für Morbus Crohn Patienten ein 18fach erhöhtes Risiko fest, an Darmkrebs zu erkranken.

Obwohl CED-assoziierte kolorektale Karzinome nur 1-2% von allen kolorektalen Karzinomen ausmachen, sind sie eine häufige Todesursache bei Patienten mit CED.

1.2.3. Iatrogene Faktoren

Bei Patienten mit Ureterosigmoidostomien wurde ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms gefunden (Huang et al. 2000).

Das Vorkommen eines CRC bei diesen Patienten ist 100-550 fach größer als das der Normalbevölkerung. Grund dafür ist der direkte Kontakt von Urin mit dem Kolonepithel, besonders im Bereich der Anastomose. Obwohl diese Langzeitkomplikation schon lange bekannt ist, ist man sich über die möglichen Ursachen nicht sicher. Vermutlich generiert die intestinale Flora die Produktion von karzinogenen Nitrosaminen (Cohen et al. 1987). Stark erhöhte Elektrolytkonzentrationen im Darm sowie eine chronische Irritation der Darmschleimhaut als auch das mechanische Trauma können weitere Gründe darstellen (Chan et al. 2008).

Cholezystektomien werden nur mit einem geringen Risiko für Neoplasien im Kolon assoziiert, nicht jedoch mit Neoplasien im Rektum (Shao 2005).

Dies lässt sich durch den konstanten Fluss der Galle erklären, eine gesteuerte Gallensekretion während der Mahlzeiten kann nun nicht mehr stattfinden. Es kommt zu einer erhöhten Dehydroxylierung und Dehydrogenisierung von primären Gallensäuren zu sekundären Gallensäuren. Es konnte gezeigt werden, dass sekundäre Gallensäuren im Kolon eine krebserzeugende Wirkung haben (Sanchez-Pernaute 2007, Kunrong et al. 2005).

Ein weiterer Risikofaktor für das kolorektale Karzinom ist eine Radiatio des Beckens (Tsunoda et al. 1997).

1.2.4. Genetische Faktoren

1.2.4.1. Familiäre adenomatöse Polyposis

Vererbte, prädisponierende Erkrankungen bedingen nur einen kleinen Teil (weniger als 5%) der kolorektalen Karzinome.

Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) macht ungefähr 1% aller kolorektalen Karzinome aus (Gatalica et al. 2008).

Sie wird autosomal-dominant vererbt und tritt vor allem in der ersten und zweiten Lebensdekade auf. Charakterisiert ist dieses Syndrom durch multiple kolorektale Adenome im Darm (> 100, in voll ausgeprägten Fällen mehrere Hunderte).

Diese Adenome entwickeln sich bis zum 40.-50. Lebensjahr unweigerlich zu einem kolorektalen Karzinom, wenn die Erkrankung nicht frühzeitig erkannt und chirurgisch interveniert wird (Esplen et al. 2008).

Die FAP wird durch eine Keimbahnmutation des APC-Gens verursacht, das auf Chromosom 5q21 liegt. In bis zu 46 % der Fälle entsteht diese Mutation spontan, ohne dass ein klinischer oder genetischer Nachweis bei den Eltern gelingt. Die Penetranz liegt bei fast 100% (Cruz-Correa et al. 2003).

Das APC-Gen ist ein klassisches Tumorsuppressor-Gen, das eine Gatekeeper-Funktion für die Adenom-Karzinom-Sequenz hat (s.u.).

Das APC-Gen wird für die Karzinomentstehung in vielen Geweben verantwortlich gemacht. Bei FAP-Patienten konnte ein erhöhtes Risiko für weitere Neoplasien beobachtet werden, besonders im Gehirn, der Schilddrüse und Leber (Vasen et al. 2008).

1.2.4.2. Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC)

Dieses Syndrom wird autosomal-dominant vererbt und für ca. 1-3% der kolorektalen Karzinome verantwortlich gemacht (Chung et al. 2003).

Patienten mit HNPCC erkranken meist in jungem Alter an Darmkrebs, der vor allem rechtsseitig auftritt. Im Gegensatz zur FAP entwickeln HNPCC-Patienten eine begrenzte Anzahl von Adenomen, von denen die meisten als flache Läsionen auffallen. Diese Adenome können innerhalb kurzer Zeit maligne entarten, deshalb sind endoskopische Kontrollen regelmäßig zu empfehlen.

Die genaue Häufigkeit von HNPCC variiert stark, da dieses Syndrom klinisch schwer von sporadischen kolorektalen Karzinomen zu unterscheiden ist (Samowitz et al. 2001).

HNPCC wird mit einer Mutation der DNA-Mismatch-Repair-Gene assoziiert (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2 und hMSH6). Personen mit dieser Mutation haben ein geschätztes Lebenszeitrisiko von 70-74% ein kolorektales Karzinom zu entwickeln.

Auch andere Krebsarten (z.B. Endometrium-, oder Magenkrebs) kommen häufiger vor (Esplen et al. 2007).

1.3. Histologie und Morphologie

Etwa 60% der kolorektalen Karzinome finden sich im Rektum, 20-25% im Colon sigmoideum (Böcker et al. 1994). Allerdings ist die Zahl der weiter proximal liegenden Karzinome in den letzten Jahren angestiegen

Man unterscheidet makroskopisch schüsselförmig ulzerierende, polypoide und diffus-infiltrierende Wachstumsformen.

Nach der WHO Klassifikation von 2000 werden histologisch folgende Karzinomtypen unterschieden:

- Adenokarzinome (Drüsenepithel mit tubulärer und/oder villöser Struktur)
- muzinöse Adenokarzinome (>50% extrazelluläre Verschleimung)
- Siegelringzellkarzinome (Epithelzellen mit >50% intrazytoplasmatischem Muzin)
- Adenosquamöse Karzinome (Platten- als auch Drüsenepithelneoplasie)
- Plattenepithelkarzinome
- Kleinzellige Karzinome
- Undifferenzierte Karzinome

Am häufigsten tritt das Adenokarzinom (85-90%) und das muzinöse Adenokarzinom (8-13%) auf. Die anderen fünf Typen sind selten und machen insgesamt nur einen Anteil von 1% aus (Jass et Sobin, 1989).

1.4. Staging und Grading

Das Tumorstadium (Staging) wird durch die TNM-Klassifikation und das daraus abgeleitete UICC-Stadium einheitlich für alle Kolon- und Rektumkarzinome festgelegt.

TNM ist eine Abkürzung für:

T= Tumor: Ausdehnung des Primärtumors

N= Nodus: Fehlen bzw. Vorhandensein regionale Lymphknotenmetastasen

M= Metastasen: Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM Stadien

T Primärtumor

Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Infiltration der Tela submucosa

T2 Infiltration der Tunica muscularis propria

T3 Infiltration der Subserosa oder in nicht-peritonealisiertes umgebendes Gewebe

T4 Infiltration von Nachbarorganen und/oder des Peritoneum viscerale

N regionäre Lymphknoten

Nx Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar

N0 Keine regionären Lymphknoten befallen

N1 Metastasen in 1-3 perikolischen (perirektalen) Lymphknoten

N2 Metastasen in >3 perikolischen (perirektalen) Lymphknoten

M Fernmetastasen

Mx Fernmetastasen nicht beurteilbar

M0 Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen

Aus diesen Angaben kann eine Stadieneinteilung (UICC-Stadien) vorgenommen werden. Sie erlaubt Prognoseaussagen und Therapieoptionen.

UICC	T	N	M	Dukes
0	Tis	N0	M0	
Ia	T1	N0	M0	A
Ib	T2	N0	M0	A
II	T3-4	N0	M0	B
III	T1-4	N1-2	M0	C
IV	T1-4	N0-2	M1	D

Tabelle 2: UICC-Stadien, nach Sobin und Wittekind, 2002

Das Staging der kolorektalen Karzinome wird durch die Bestimmung des zytologischen bzw. histologischen Differenzierungsgrades (Grading) ergänzt. Es beinhaltet Kernatypien, Mitosen, morphologische Strukturen und Differenzierungsgrad, d.h. Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe.

Die Primärtumoren werden im histologischen Grading in ausschließlich drüsig differenzierte (Grad 1), überwiegend drüsig (Grad 2) und kribriforme bis solide differenzierte (Grad 3) eingeteilt (WHO, 2006).

Die Klassifikation für Rektumkarzinome, die C. Dukes 1926 veröffentlichte und die im Laufe der Zeit modifiziert und auf kolorektale Karzinome erweitert wurde, sollte im täglichen Gebrauch nicht mehr verwendet werden. Sie spielt im angloamerikanischen Raum und in wissenschaftlicher Literatur noch immer eine Rolle, weshalb sie an dieser Stelle mit aufgeführt wird.

Dukes A	Tumorwachstum auf die Mukosa beschränkt, Infiltration maximal bis in Muscularis propria, kein Lymphknotenbefall
Dukes B1	Tumorwachstum über die Muscularis propria hinaus, keine Lymphknoten befallen
Dukes B2	Invasion der Serosa oder des perikolischen Fettgewebes, keine Lymphknoten befallen
Dukes C1	Befall der regionären Lymphknoten
Dukes C2	Befall auch der höher gelegenen Lymphknoten entlang von Gefäßen
Dukes D	Fernmetastasen

Tabelle 3: Die Dukes Klassifikation

1.5. Molekulare Karzinogenese

Die Entstehung eines invasiven kolorektalen Karzinoms über die Entwicklung adenomatöser, dysplastischer Zwischenstadien wurde 1975 von Morson et al. als Adenom-Karzinom Sequenz erklärt.)

Für die Theorie der Adenom-Karzinom Sequenz spricht die Beobachtung von Adenomen und Karzinomen im gleichen Darmabschnitt. Auch fand man Reste benigner Adenome in Karzinomen. (Eide 1983, Bat 1986). In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass kolorektale Karzinome bei polypektomierten Patienten seltener vorkamen als bei der Normalbevölkerung (Winawer 1993). Diese Hypothese ist sowohl für sporadisch als auch für hereditär auftretende kolorektale Karzinome gültig (Morson, 1979).

Die Adenom-Karzinom-Sequenz verläuft über Jahre und sammelt auf den unterschiedlichen Entwicklungsstadien molekulargenetische Veränderungen an, die das Wachstumsverhalten und die Differenzierung der Zelle beeinflussen.

Nach ausführlichen Untersuchungen von FAP-Patienten, beschrieben Fearon und Vogelstein 1990, dass sich diese molekulargenetischen Veränderungen in mehreren Schritten parallel zum klinischen Fortschreiten des Adenoms zum Karzinom entwickelten.

Laut diesem Tumorprogressionsmodell kommt es über Mutationen zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

Mutierte Onkogene verursachen eine stark gesteigerte Zellproliferation und ein autonomes Wachstum der Zellen. Diese Mutationen können in Form von Punktmutationen, Amplifikationen oder Translokationen des Proto-Onkogens auftreten. Ausreichend für die Aktivierung eines Onkogens ist die Mutation auf einem der beiden Allele.

Aufgabe der Tumorsuppressoren ist es, negativ regulierend auf die Zellproliferation einzuwirken, indem die Apoptose genetisch veränderter Zellen eingeleitet wird.

Das Modell von Fearon und Vogelstein entspricht dem so genannten Tumorsuppressor-Signalweg, der für die Entstehung von ca. 85% aller sporadischen Karzinome verantwortlich ist.

Hiernach kommt es bereits in einem frühen Entwicklungsstadium der Adenome zu einer Allelmutation/-deletion des APC (adenomatosis-polyposis-coli)-Genlocus auf dem langen Arm des fünften Chromosoms (5q), sowie zu DNA-Hypomethylierungen.

Bei Adenomen, die größer als 1 cm sind und bei etwa der Hälfte aller kolorektalen Karzinome findet sich zusätzlich eine K-ras-Mutation (Fearon et Vogelstein 1990). Kleinere Adenome tragen diese Mutation nur in 10% der Fälle (Schmiegel, 1991).

Im weiteren Verlauf (Adenome >2 cm) und bei 70% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom war außerdem der Verlust des DCC-Allels ("deleted in colorectal cancer", 18q21.3) zu beobachten.

Das DCC-Gen ist ein Tumorsuppressorgen und greift durch Einwirkung auf die Zell-Zell-Kontakte in die Wachstumskontrolle ein.

Im letzten Schritt des Modells zeigte sich das Tumorsuppressorgen p53 auf dem Chromosomenarm 17p in 75% der Karzinome ebenfalls verändert. In Adenomen wurde dies zwar seltener beobachtet (25%) als in den Karzinomen, die Mutation war jedoch umso häufiger zu finden, je größer das Adenom war und je mehr villöse Anteile es hatte (Schmiegel, 1991).

Wichtig zu verstehen ist hierbei, dass nicht die Reihenfolge, sondern die Ansammlung der unterschiedlichen Genmutationen für die Karzinomentstehung wesentlich ist (Fearon, Vogelstein 1990).

Da das Fearon-Vogelstein Modell durch Allelverluste auf den Chromosomen 5, 7 und 18 gekennzeichnet ist, wird es auch „chromosomal instability pathway“ (CIN) genannt (Takayama 2006). Tumorzellen, die eine genetische Instabilität aufweisen, verändern die Anzahl ihrer Chromosomen im Vergleich zu normalen Zellen 10 – 100 mal häufiger (Teijpar, Van Cutsem 2002).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Mutationen, die von gesunder kolorektaler Mukosa über hyperproliferatives Epithel und drei Adenomvarianten zum invasiven Karzinom führen.

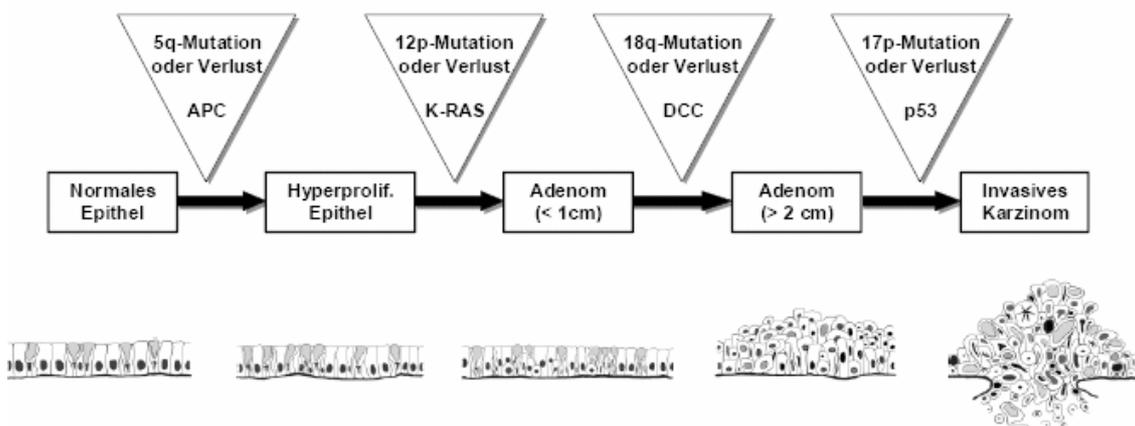


Abbildung 1: **Adenom-Karzinomsequenz** nach Fearon und Vogelstein, 1990

Im Verlauf weiterer Studien konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC im ersten Schritt der molekularen Karzinogenese eine bedeutendere Rolle hat als angenommen. APC wird als „gatekeeper“ bezeichnet, der normalerweise für die Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl in wachsenden Zellpopulationen verantwortlich ist. Eine Mutation des „gatekeepers“ führt zu einem ständigen Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod (Kinzler, Vogelstein 1996). Die Hauptfunktion des APC liegt in der Regulation des Proto-Onkogens beta-Catenin. Weitere Funktionen des APC sind die Zelladhäsion und Migration, die Zellzyklus- und Apoptoseregulation ebenso wie die Spindelformation und Chromosomensegregation im Rahmen der Zellteilung.

Ein Verlust beider Allele des APC durch Heterozygotieverlust (LOH), Punktmutationen oder Deletionen führt über den Wnt/Beta-Catenin-Signalweg zur Transkription multipler Onkogene, wie z.B. c-Myc und Cyclin D1 (Takayama et al. 2006, Kullmann 2003, Worthley et al. 2007).

Weitere Signalwege, die für die Progression kolorektaler Karzinome eine Rolle spielen sind der K-ras-Pathway, der TGF- β -Pathway und der p53-Pathway (Tejpar et Van Cutsem 2002).

Das Tumorprogressionsmodell wurde im Laufe der Jahre überarbeitet. Aktuell geht man von der so genannten „Multipathway carcinogenesis“-Theorie aus (Tejpar et Van Cutsem, 2002). Darin werden zwei eigenständige Wege in der Tumorgenese beschrieben. Zum einen, den der Chromosomeninstabilität (siehe oben) und den der Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Für das Modell der Mikrosatelliteninstabilität (auch Mutator-Typ) der Karzinogenese, steht modellhaft das Krankheitsbild der HNPCC-Tumoren.

Hierbei entstehen zahlreiche Punktmutationen in den Mismatch-Reparatur-Genen (Takayama et al. 2006). Die Mismatch-Reparaturenzyme sind verantwortlich für die Korrektur einfacher repetitiver Sequenzen im Genom, die häufig spontan durch Replikationsfehler entstanden sind.

Mittlerweile sind neun humane Mismatchreparaturgene beschrieben: hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2, hMSH5, hMSH3, hMSH4, hMLH3 (Kullmann, 2003). Während den HNPCC-Tumoren eine angeborene Mutation eines DNA-Reparaturgens zu Grunde liegt, findet sich in sporadischen mikrosatelliteninstabilen Tumoren meist

eine spontane Hypermethylierung des Promoters des hMLH1 (Chung 2000). Die Hypermethylierung der DNA führt dazu, dass Transkriptionsfaktoren keinen Zugang mehr zum Promoter bekommen und so die Transkription des betroffenen Gens unterbunden wird. Im Falle von hMLH1 führt dies zu einem fehlerhaften Mismatch-Reparatursystem. Dies hat eine Akkumulation von DNA-Fehlern im gesamten Genom zur Folge, die wiederum Ablesefehler durch vorzeitigen Strangabbruch und Frameshifts verursachen (Ilyas et al. 1998, Chung 2000).

Mikrosatelliten-instabile Tumore sind mit nur 10–20% aller sporadischen kolorektalen Karzinome wesentlich seltener als Chromosomen-instabile Tumore (Takayana et al. 2006).

Neben der chromosomalen Instabilität und der Mikrosatelliteninstabilität besteht noch ein weiterer Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese. Durch DNA-Methylierung kommt es über Hypermethylierung von Promotoren zur Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene (Worthley et al. 2007, Chung 2000).

Genauere Mechanismen über die Regulation der Methyltransferasen, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sind nicht abschließend geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ein mutierter K-ras Signalweg die DNA-Methyltransferase aktiviert (Guan 1999).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Hypermethylierung von DNA in so genannten aberranten Kryptenfoki der erste Schritt in der Genese des kolorektalen Karzinoms noch vor dem Auftreten von Mutationen und Mikrosatelliteninstabilität darstellen könnte (Chan et al. 2002).

1.6. Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, ErbB-1, HER1) ist in einer Vielzahl menschlicher Tumoren überexprimiert oder mutiert, neben dem kolorektalen Karzinom vor allem auch in Mamma- und Lungenkarzinomen (Salomon et al. 1994).

Der EGFR ist einer von vier transmembranösen Wachstumsfaktor-Rezeptorproteinen, die sich hinsichtlich ihrer Funktion und Struktur sehr ähneln (HER 2, HER 3, HER 4). Sie gehören in die Gruppe der erbB-Tyrosinkinasen.

Es handelt sich bei dem EGFR um ein 170-kDa Glykoprotein, bestehend aus einer cysteinreichen, extrazellulären Rezeptor-Domäne, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Funktion.

Aktiviert wird der Rezeptor durch zahlreiche mögliche Liganden, wobei man dem epidermal growth factor (EGF) und dem transforming growth factor (TGF) derzeit die wichtigste Ligandenfunktion zuweist. Sobald der Ligand an den extrazellulären Rezeptorteil gebunden ist, dimerisiert der EGFR entweder mit einem weiteren EGFR-Monomer oder mit einem anderen Mitglied der erbB-Familie.

Der Dimerisierung folgt eine Autophosphorylierung von fünf spezifischen Tyrosinresten am C-terminalen Ende der intrazellulären Domäne.

Verbleibende phosphorylierte Tyrosinkinase-Reste dienen als Bindestellen für die Initiierung von Signalüberträgern und Aktivatoren von intrazellulären Substraten wie z.B. Ras. Dies stimuliert weitere intrazelluläre Signalkaskaden (Voldborg et al. 1997). Das resultierende Signal hängt davon ab, welcher Ligand an den Rezeptor bindet und welcher zweite Rezeptor zur Dimerisierung zur Verfügung steht. Je nach der Identität des Dimers entscheidet sich, welche zytoplasmatischen Signalmoleküle sich anlagern können und welcher weitere Signalweg in Gang gesetzt wird (Yarden et al. 2001). Zu den wichtigsten Signalkaskaden gehören die Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase (MAPK) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase P (PKB)/ Akt-Kaskaden (siehe Abbildung). Diese Signalwege regulieren verschiedene biologische Prozesse wie z.B. weitere Genexpression, Zellproliferation, Angiogenese und Apoptosehemmung (Herbst et al. 2004).

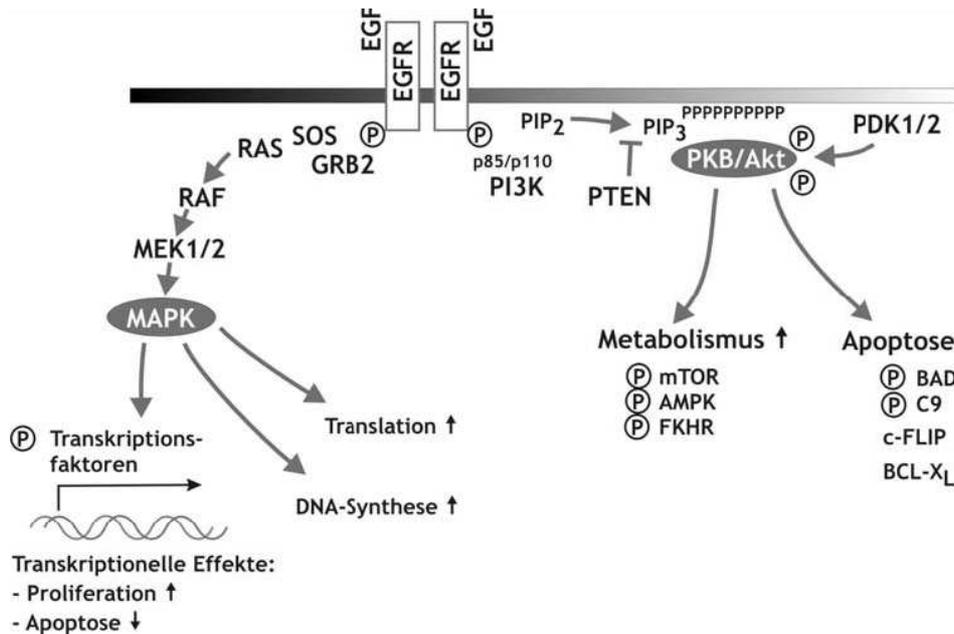


Abbildung 2: **Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion** nach Schlessinger et al. 2004: Liganden-induzierte Dimerisierung führt über Autophosphorylierung zur Aktivierung des EGFR. Über GRB2 und SOS und das GTP-bindende Protein RAS wird die MAPK-Kaskade aktiviert. Ebenfalls wird die PI3K-PKB/Akt-Kaskade aktiviert, die durch PTEN inaktiviert werden kann.

Um den EGFR zu inaktivieren, wird der aktivierte Rezeptor internalisiert und anschließend in Lysosomen hydrolysiert. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste an der intrazellulären Domäne, die den Rezeptor inaktivieren.

Der EGFR-pathway ist in vielen neoplastischen Zellen durch unterschiedliche Mechanismen verändert worden. Genamplifikationen oder Mutationen verursachen z.B. eine Überproduktion von Liganden oder Rezeptoren oder eine direkte Daueraktivierung (Yarden et al. 2001)

Mutationen der EGFR-mRNA wurden sowohl auf dem Abschnitt für die extrazellulären als auch für die intrazellulären Regionen gefunden, nicht jedoch in der Region für die Transmembranregion. Es gibt drei Deletionen auf den drei entsprechenden Abschnitten der Extrazellulär-Domänen (EGFRv I, II und III), wobei eine Deletion auf EGFRvIII am häufigsten zu finden ist. Durch die Deletion kommt es zu einer Überexpression des EGFRvIII, der keine Liganden binden kann, aber unabhängig davon die Zellproliferation stimuliert. Außerdem kann EGFRvIII nicht internalisiert werden, so dass auf der Zelloberfläche eine Überzahl aktiver Rezeptoren zu finden ist. EGFRvIII konnte in normalen Geweben nicht nachgewiesen werden und wird ausschließlich von Tumorzellen exprimiert. Dies ist der Grund für die Annahme, dass

tumorspezifische Antikörper gegen EGFRvIII den Anti-EGFR-Antikörpern in der Tumortherapie überlegen seien könnten

Bisher gibt es keine Informationen über Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne. Es wird angenommen, dass auch hier ein Mangel an regulierenden und inhibierenden Domänen zu ständig aktiven Rezeptoren führt (Voldborg et al. 1997).

Es wird angenommen, dass veränderte EGFR-mRNA eine wichtige Rolle in der Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms spielt, zumindest konnte dies in vitro in Kulturen von humanen kolorektalen Karzinomzellen nachgewiesen werden (Tong et al. 1998). Dass die Expression von EGFR in kolorektalen Adenokarzinomen erhöht ist, zeigen mehrere Studien (McKay et al. 2002, Goldstein et al. 2001, Radinsky et al. 1995). Allerdings variiert die Expressionsrate zwischen 25 und 77%. Diese unterschiedlichen Daten sind am ehesten auf unterschiedliche Erfassungstechniken zurückzuführen. Eine Studie zeigte eine höhere EGFR-Expression in Karzinomen des distalen Kolons verglichen mit Karzinomen im Rektum (Koretz et al. 1990).

Hinsichtlich der Prognose ist die Datenlage widersprüchlich. So bestreiten McKay et al. den Zusammenhang von EGFR-Expression und Überlebensrate. Dies konnte in weiteren Studien bestätigt werden (Saeki 1995, Yasui 1988).

Kluftinger et al. hingegen konnten einen direkten Zusammenhang nachweisen. Vor allem Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium 4 zeigten nach Goldstein et al. 2001 eine deutlich schlechtere Prognose. Mayer et al. zeigten, dass Patienten, deren Tumorzellen zu mehr als 50% EGFR ausbildeten, eine signifikant schlechtere Prognose haben.

Eine ebenfalls schlechtere Prognose konnte bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom unter Strahlentherapie und vorliegender EGFR-Überexpression nachgewiesen werden (Giralt et al. 2002).

Die EGFR-Expression wurde in Verbindung mit aggressiverem Wachstumsverhalten gebracht (Prewett et al. 2001). Es konnte ein erhöhtes Risiko für die Bildung von Leber-Metastasen und einem erhöhtem Tumorstadium (Radinsky et al. 1995) gefunden werden. Karameris et al. erkannten 1993 einen Zusammenhang zwischen erhöhter EGFR-Expression und erhöhten Raten von mesenterialem Lymphknotenbefall.

In einer Meta-Studie von 2001 beschreiben Nicholson et al. die EGFR-Expression als insgesamt eher bescheidenen Prognoseindikator.

Ebenso wird ein Zusammenhang zwischen dem histologischen Typ und der EGFR-Expression widersprüchlich diskutiert. So fanden Koretz et al. 1990 weder eine Korrelation zwischen der Ausprägung der EGFR-Expression und den Tumortypen, noch dem Tumorstadium oder der Dukes Klassifikation.

Nach Spano et al. 2005 gibt es wiederum einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher EGFR-Produktion und TNM-Stadium. So war der Prozentsatz an Patienten mit erhöhten EGF-Rezeptoren bei Patienten mit T3 deutlich höher als bei Patienten mit T4. Ein Zusammenhang zwischen histologischer Ausprägung und EGFR-Expression konnte von Spano et al. 2005 allerdings nicht nachgewiesen werden, durch Studien von McKay 2002, Steele 1990 allerdings schon.

1.7. EGFR in der Therapie des kolorektalen Karzinoms

Da der EGFR eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms spielt, liegt der Gedanke nahe, den unkontrolliert aktiven Wachstumsrezeptor durch monoklonale Antikörper zu hemmen. Dies konnte in Form von aktuell zwei Typen unterschiedlicher EGFR-Antagonisten klinisch umgesetzt werden.

Mechanismen sind entweder die Blockade der extrazellulären EGFR-Domäne oder die Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität (Normanno et al., 2003; Ciardiello et al., 2001; Grünwald et al., 2003; Mendesohn et al.; 2003).

In Deutschland sind derzeit zwei Antikörper zugelassen, die gegen die extrazelluläre EGFR-Domäne gerichtet sind (Cetuximab seit 2004, Panitumumab seit 2007). Cetuximab (ErbixTM) ist ein chimärer, monoklonaler Maus-Mensch-IgG2-Antikörper.

Panitumumab ist ein rein humaner IgG2-Antikörper gegen EGFR und ist ebenso wie Cetuximab für die Behandlung therapierefraktärer kolorektaler Karzinome zugelassen.

Im Rahmen der BOND-Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass es bei Patienten mit zytostatisch vorbehandelten metastasierten kolorektalen Karzinomen durch Cetuximab in Kombination mit Irinotecan zu einer signifikanten Steigerung von Ansprechrate und progressionsfreiem Überleben kam (Cunningham et al., 2004).

Um die Rolle der EGFR-Antagonisten in der Therapie des metastasierten, kolorektalen Karzinoms weiter zu untersuchen, wurden zwei große multinationale kontrollierte Studien angelegt (CRYSTAL und OPUS, Van Cutsem, Bokemeyer et al. 2008). Hier wurde ebenfalls eine klassische Chemotherapie (FOLFIRI- bzw. FOLFOX-Regime) mit und ohne Cetuximab als First-Line-Therapie verglichen. Es konnte

eindeutig belegt werden, dass auch bei nicht vorbehandelten Karzinomen eine Therapie mit Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie eine signifikant erhöhte Ansprechrate zeigte. Darum wird Cetuximab seit 2008 in Kombination mit entsprechender Chemotherapie als First-Line-Therapie des metastasierten, EGFR-exprimierenden, kolorektalen Karzinoms empfohlen.

Um die Therapie zu optimieren, wurden verschiedene prädiktive Faktoren untersucht. Cunningham et al. 2004 ebenso wie Saltz et al. 2004 belegten in ihren Studien, dass von der Ausprägung der immunhistochemisch nachgewiesenen EGFR-Expression nicht auf die Effektivität der Anti-EGFR-Therapie geschlossen werden darf.

Ein sehr wichtiges Kriterium in der EGFR-Therapie dagegen stellt die K-ras-Mutation dar. Die prädiktive Aussagekraft des K-ras-Status wurde ebenfalls in der oben erwähnten CRYSTAL- und OPUS-Studie untersucht. Die aktuell auf der ASCO-Jahrestagung vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass Cetuximab bei Patienten ohne eine K-ras-Mutation deutlich effektiver wirkte, als bei Patienten mit einer K-ras-Mutation. Besteht eine K-ras-Mutation, ist die Behandlung mit EGFR-Antagonisten wie Cetuximab und Panitumumab ineffektiv (Amado et al., 2008; Karapetis et al., 2008; Lievre et al., 2008; De Roock et al., 2008; Cappuzzo et al., 2008).

Grund dafür liefert die unten dargestellte Signalkaskade; K-ras wird als Onkogen u.a. durch den EGF-Rezeptor aktiviert. Ist das K-ras-Onkogen mutiert, also permanent aktiv, entzieht es sich der Kontrolle des EGFR und damit auch der Blockade durch einen EGFR-Antagonisten.

Eine neue retrospektive Studie von di Nicolantonio et al. 2008 weist darauf hin, dass auch eine B-RAF-Mutation zu einer Einschränkung der EGFR-gerichteten Antikörpertherapie führen kann. Bei B-RAF handelt es sich um ein dem K-ras nachgeschaltetes Protein (siehe Abbildung 3). Die klinische Bedeutung dieser Studie ist allerdings noch nicht absehbar.

Wie oben bereits erwähnt, gibt es neben der Blockade der extrazellulären Domäne des EGFR noch die Option, die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR zu hemmen. Die ist z.B. durch Inhibitoren wie Erlotinib möglich.

Derzeit ist die klinische Relevanz von Erlotinib in der Behandlung metastasierter kolorektaler Karzinome noch nicht vollkommen geklärt und bedarf weiterer Studien. Zugelassen ist Erlotinib aktuell nur für das metastasierte Pankreaskarzinom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Stintzing et al., 2009).

1.8. PTEN

Durch den EGF-Rezeptor werden zahlreiche Signaltransduktionswege downstream aktiviert, unter anderem der PI3K/PTEN/AKT-Pathway:

Eine Stimulation des EGFR durch Wachstumsfaktoren aktiviert Kinasen wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Diese katalysiert die Phosphorylierung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Dabei entsteht der second messenger Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welcher von der Proteinkinase B (PKB)/Akt Kinasefamilie und PDK1 (phosphoinositide-dependent-kinase-1) als Anker genutzt wird. Über diesen Anker kann die Serin/Threoninkinase Akt an die Membran binden, es kommt zu einer Konformationsänderung, so dass nun eine Aktivierung von Akt durch PDK1 möglich wird. Sobald Akt aktiviert wurde, können weitere Downstream-Faktoren durch Phosphorylierung in einen aktiven Zustand versetzt werden. Sämtliche Akt Substrate tragen wichtige Funktionen in Zellprozessen wie der Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Zellgröße (siehe Abbildung 2).

Ein Enzym, das der Akt-Kaskade entgegenwirkt, ist die Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted form chromosome 10). Sie inaktiviert den second messenger PIP₃, indem die D3 Phosphatgruppe zu PIP₂ abgespalten wird. Dies führt zu einem G1-Arrest und wirkt den Protoonkogenen PI3K und Akt entgegen. PTEN (auch MMAC1, TEP1) agiert somit als Tumorsuppressor und ist bei Funktionsausfall mitverantwortlich für unkontrolliertes Zellwachstum durch ständige Überaktivität des PI3K-Signalweges.

Das PTEN-Gen liegt auf Chromosom 10q23 (Simpson 2001) und codiert ein 403 Aminosäuren-Protein aus der Familie der Protein-Thyrosin-Phosphatasen. Das Protein besteht hauptsächlich aus einer N-terminalen Phosphatasen-Domäne und einer C-terminalen C2-Domäne. Beide ergänzen sich zu einer minimalen katalytischen Einheit (Leslie et Downes 2004).

PTEN kommt ubiquitär in menschlichen Geweben vor, in Epithelzellen findet man die Phosphatase vor allem im Zytoplasma. Allerdings konnte PTEN auch im Nucleus nachgewiesen werden, so dass man einen zusätzlichen, vom Zellkern ausgehenden Regulationsmechanismus des PI3K Signalwegs annimmt (Sulis et Parsons 2003).

Keimbahnmutationen des PTEN-Gens wurden bisher hauptsächlich in autosomal vererbaren Krankheiten gefunden, z.B. Cowden-Disease, Bannayan-Zonana Syndrom (Marsh 1997, Nelen 1997).

Somatische Mutationen des PTEN-Gens konnten in unterschiedlichen Karzinomarten nachgewiesen werden, besonders häufig in Glioblastomen und Endometriumkarzinomen (Sansal/Sellers, 2004). Zu 70% sind diese Mutationen Nonsense- oder Frameshift Mutationen, die in einem Abbruch der Proteinsynthese resultieren. Sehr häufig konnten biallelische Inaktivierungen von PTEN nachgewiesen werden, d.h. eine Punktmutation des einen Allels ist kombiniert mit einer Deletion auf dem zweiten Chromosom. Dies führt zu einem Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) (Bonneau et al. 2007).

Folge dieser Mutationen ist eine komplette Inaktivierung der Phosphatase, entweder durch einen totalen oder partialen Verlust der mRNA und/oder des gesamten Proteins (Sulis et Parsons 2003).

PTEN-Mutationen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese der kolorektalen Karzinogenese. In gesunder Darmschleimhaut kann sowohl das PTEN-Gen, als auch das entsprechende Protein nachgewiesen werden (Guanti et al. 2000). Ein Verlust von PTEN konnte in Adenomen und Karzinomen beobachtet werden.

Colagoglu und Zhou kamen bezüglich des PTEN Verlustes in kolorektalen Karzinomen zu ähnlich hohen Häufigkeiten (zwischen 72,4% und 79%).

Colagoglu et al. zeigten 2008 einen höheren PTEN Verlust in Adenomen als in Karzinomen. Dies lässt vermuten, dass eine gestörte PTEN-Funktion bereits in der frühen Phase der Adenom-Karzinom-Sequenz eine Rolle spielt.

Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen PTEN Verlust, Grading und Staging gefunden werden. Ebenso wenig wie zwischen Tumordurchmesser, Lymphinvasion, Lebermetastasen und Überlebenszeit. Ein Lokalrezidiv bei niedriger PTEN Expression scheint jedoch deutlich wahrscheinlicher zu sein (Colagoglu et al. 2008).

Interessanterweise zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Mikrosatelliten-instabilen Tumoren und der PTEN-Expression (Guanti et al. 2000). 17% dieser Mikrosatelliten-instabilen CRC zeigten eine erniedrigte PTEN-Expression, ein kompletter PTEN-Verlust konnte jedoch nicht festgestellt werden (Zhou et al. 2002).

Weitere Studien werden nötig sein, um einen umfassenderes Verständnis bezüglich der Rolle von PTEN in der Karzinogenese des CRC zu gewinnen.

1.9. K-ras

Die Ras-Genprodukte produzieren eine kleine Familie sehr ähnlicher Proteine, K-ras, H-ras und N-ras. Diese Ras-Proteine werden als GTPasen bezeichnet, die in einem GDP-gebundenen (inaktiven) oder GTP-gebundenen (aktiven) Status an der Plasmamembran lokalisiert sind. Die Aktivierung von Ras wird von zahlreichen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) reguliert, die eine Konformationsänderung des Proteins und eine Dissoziation von GDP bewirken. Die Inaktivierung von Ras wird durch sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) vermittelt, die eine Hydrolyse von GDP induzieren.

Diese Regulatoren werden durch eine Vielzahl von Zelloberflächenrezeptoren beeinflusst, z.B. durch den EGFR (Castagnola et Giaretti, 2005). So kommt es im Rahmen des Ras/MAPK-Signalweg nach einer Aktivierung z.B. des EGFR zur Aktivierung des Adapterproteins GRB2. Dieses bildet einen Komplex mit dem GEF SOS (Son of Sevenless). Der Komplex katalysiert den Austausch von GDP zu GTP am Ras-Protein (Schlessinger 2000). Sobald das GTP an Ras gebunden ist, kommt es zu einer Konformationsänderung des Ras-Proteins, so dass sämtliche Effektorproteine downstream (wie z.B. Raf-Kinasen und Phosphatidyl-3-Kinasen) gebunden und aktiviert werden können. Eine Aktivierung von Raf durch das aktivierte Ras führt z.B. zu einer Phosphorylierung weiterer Downstream-Faktoren, die Zellwachstum, Proliferation und Apoptose veranlassen, inklusive der MAPKK (mitogen activated protein kinase kinase). MAPKK aktiviert im weiteren Verlauf ERK1 und ERK2, durch die im Nukleus die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren initiiert wird (Cohen et al. 2005).

Über den Ras/Raf-Signalweg kommt es je nach Zelltyp durch Induktion von Zyklinen oder Expression der Zellzyklus-Regulatoren (p21, p27, p16) zur Initiierung von Differenzierungspausen der Zelle (Ellis et al. 2000).

Einleitung

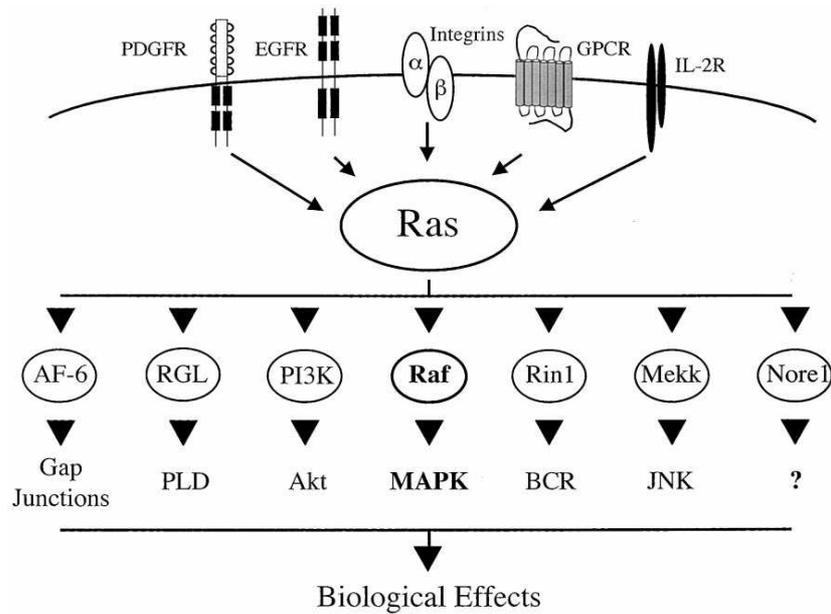


Abbildung 3: Zelloberflächenrezeptoren wie EGFR aktivieren Ras, wodurch zahlreiche Effektormoleküle aktiviert werden, die u.a. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose der Zelle beeinflussen (nach Ellis et Clark, 2000)

Ras-Mutationen werden sehr häufig in menschlichen Karzinomen vorgefunden. Vor allem Punktmutationen im Kodon 12, 13 oder 61 kodieren ein Ras-Protein mit veränderter Aminosäurestruktur, das sich resistent gegen die inaktivierenden GAPs zeigt und dadurch in einem ständig aktiven Zustand verbleibt. Dies hat eine exzessive und permanent aktive Signaltransduktion zur Folge.

Erstaunlicherweise findet man in epithelialen Neoplasien besonders häufig Mutationen des K-ras Gens. Genmutationen von H- und N-Ras werden nur selten beobachtet.

Der K-ras Genlocus hat zwei Spleissvarianten (K-Ras4B und 4A), so dass es im Falle einer Mutation zu zwei mutierten Proteinen kommt, die im Verdacht stehen, sich gegenseitig zu verstärken (Ellis et Clark, 2000).

K-ras Mutationen sind in bis zu 50% aller kolorektaler Karzinome gefunden worden. Sie konnten bereits in frühen Stadien der Karzinomentstehung nachgewiesen werden (siehe Adenom-Karzinom-Sequenz). Man geht davon aus, dass die Ras-Mutation bereits früh oder sogar initial in der Tumorgenese auftritt (Bos et al).

Die Häufigkeit von K-ras Mutationen in Adenomen hängen von der Größe der Läsion ab, nur 10% der Adenome unter 1cm Durchmesser zeigen K-ras Mutationen, während sie in Adenomen größer als 1cm zu 50% auftreten (Vogelstein et al. 1988). Außerdem konnten K-ras Mutationen nicht nur in Adenomen nachgewiesen werden, sondern auch in der Mukosa, die den malignen Prozess umgibt (Burmer et al. 1989).

Bezüglich des Zusammenhangs der K-ras Mutation und der Überlebensrate bei Patienten mit CRC war die Datenlage lange Zeit nicht eindeutig. Es gibt eine Reihe von Studien, die belegen, dass K-ras ein Indikator für eine schlechtere Prognose ist (Conlin et al. 2005, Geido et al. 2002, Cerottini 1998). Andere Studien hingegen widerlegen eine Korrelation von K-ras Mutationen und der Überlebensrate (Morrin et al. 1994, Markowitz et al. 1995.)

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen K-ras-Mutationen und dem Rezidivrisiko bzw. anschließender Todesfolge konnte allerdings in der groß angelegten Metastudie „RASCAL“ von Jervoise und Andreyev bewiesen werden.

Nicht nur der Nachweis von K-ras-Mutationen in Tumoren konnte mit einer schlechteren Überlebensrate in Verbindung gebracht werden, sondern auch der Nachweis einer K-ras-Mutation in histologisch negativen Lymphknoten (Belly et al. 2001).

1.10. Fragestellung

Die EGFR-vermittelte Signaltransduktion stellt beim kolorektalen Karzinom einen wichtigen tumorbiologischen Mechanismus und ein Therapietarget dar. Nach der Rezeptoraktivierung können verschiedene Downstream-Signalkaskaden aktiviert werden, die zu unterschiedlichen Effekten in der Tumorzelle führen können. Die Rolle der Expression von EGFR, K-ras und PTEN bezüglich Progression und Prognose des kolorektalen Karzinoms wurde in zahlreichen Studien untersucht. Allerdings waren bislang mögliche Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront nicht berücksichtigt worden. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher Tissue-Microarrays von 201 kolorektalen Adenokarzinomen hergestellt, in denen sowohl das Tumorzentrum als auch die Invasionsfront repräsentativ erfasst wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie viele der untersuchten Gewebeproben zeigen eine Expression von EGFR, seinen Downstreamfaktoren PTEN und K-ras im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR, K-ras und PTEN im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront und klinisch-pathologischen Parametern wie z.B. Grading und Staging (TNM-Klassifikation)?
3. Beeinflusst die Expression von EGFR, K-ras und PTEN im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront die Prognose der Patienten?

2 Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 201 Patienten mit potentiell kurativer Resektion eines kolorektalen Adenokarzinoms. Die Tumorexzision fand in den Jahren 1990 bis 1995 statt. Die Proben wurden im Zentrum für Pathologie der Uniklinik Düsseldorf routinemäßig formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Karzinome wurden nach den Vorgaben der UICC klassifiziert.

Aus den Paraffinblöcken wurden Tissue-Microarrays hergestellt, wobei jeweils zwei Proben aus dem Tumorzentrum und der Invasionsfront sowie eine Probe aus der nicht-neoplastischen kolorektalen Mukosa gewonnen wurden.

2.2. Gewebemikroarrays

Das Prinzip des Mikroarrays besteht darin, eine Vielzahl von Proben verschiedener Gewebe auf einen Objektträger zu bringen. Dazu werden aus in Paraffin eingebetteten Geweben (Spenderblöcke) Zylinder ausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) eingesetzt.

Von dem Empfängerblock werden Schnitte angefertigt. Diese wurden in der vorliegenden Studie immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

In einem Array kann eine Vielzahl unterschiedlicher Präparate organisiert werden. Alle Proben sind auf einem Objektträger angeordnet, wodurch ein identischer Färbe- und Auswertungsprozess ablaufen kann.

Die Herstellung, Färbung und Auswertung eines Mikroarrays stellt deshalb eine kosten- und zeitsparende Screeningmethode dar.

2.2.1. Herstellung der Mikroarrays

Auf Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten der Spenderblöcke werden geeignete Regionen für die Gewebsstanzen markiert. Es werden jeweils zwei Bereiche in der Invasionsfront des Tumors als auch im Tumorzentrum gekennzeichnet.

Diese Bezirke sollten eine für den Tumor typische Histologie zeigen und möglichst wenige Nekrosen, Bindegewebe oder Gefäßabschnitte enthalten.

Die markierten Bereiche der HE-Schnitte werden im nächsten Schritt den entsprechenden Bereichen der Spenderblöcke zugeordnet, um mit möglichst großer Sicherheit einen idealen Gewebsabschnitt zu entnehmen.

Die geplanten Regionen auf dem Spenderblock werden nun mit einer 1mm breiten Stanze ausgestochen und in ein gleich großes Loch auf dem Empfängerblock überführt. Dies geschieht mit Hilfe eines speziellen Gerätes (Tissuearrayer, Beecher Instruments, San Prairie, USA).

Sowohl die Proben der Invasionsfront als auch die der Tumorzentren werden in doppelter Version in den Array eingebettet. Zusätzlich zu den vier Proben wird an fünfter Stelle als interne Kontrolle tumorfreies Normalgewebe hinzugefügt.

Zwischen den fünf Proben wird ein Abstand von 0,5 Millimetern gelassen, so dass insgesamt auf einem Array Proben von 20 Patienten angeordnet werden können.

Abschließend folgt die Einbettung zweier Proben aus Plazenta- bzw. Schilddrüsengewebe als externe Kontrollen.

Ist der Array vollständig gefüllt, wird er für 5 min bei 60°C erwärmt und die Oberfläche mit einem Objektträger geglättet

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Verwendete Antikörper

Die Darstellung von EGFR erfolgte mit Hilfe des EGFR pharmDX™ Kit (DakoCytomation, Hamburg). Darüber hinaus wurden der polyklonale Antikörper Ras AB-1 (LabVison, Fremont, CA, USA) und der monoklonale Antikörper 28H6 gegen PTEN (Biozol, Eching) verwendet. Als Sekundärantikörper dienten EnVision™ + System-HRP, Rabbit, bzw. Mouse der Firma Dakocytomation, die in Tris-HCL-Puffer gelöste, mit Peroxidase markierte Polymerkonjugate darstellen. Als Substratlösung fand für EGFR Diaminobenzidin (DAB), für die übrigen Antikörper 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Verwendung.

2.3.2. Immunhistochemische Methode

Die hier verwendete Polymerkonjugat Methode beruht auf dem Einsatz eines sowohl enzym- als auch antikörpermarkierten Polymerkonjugates, das von einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid) getragen wird. Neben den durchschnittlich 70 Enzymmolekülen können daran 10 Antikörpermoleküle gebunden werden.

Beim so genannten EnVision™-System ist der Sekundärantikörper an das Dextran-Trägermolekül gebunden. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird in einem zweiten Schritt das EnVision™ Polymer gebunden.

Das EnVision™-Färbesystem ist für seine hohe Sensitivität und die geringere Neigung zu unspezifischen Hintergrundfärbungen bekannt.

2.3.3. Färbeprotokolle

2.3.3.1. EGFR- Färbeprotokoll

1. Entparaffinierung

Vor der Färbung müssen die Gewebeschnitte entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Überreste des Paraffins können eine unspezifische Färbung zur Folge haben.

Zuerst lässt man die 2- 4 µm dicken Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C trocknen. Anschließend werden sie 15 Minuten lang in Xylol getaucht. Um das Paraffin auszuschwemmen, wird der Objektträger jeweils eine Minute lang in eine absteigende Alkoholreihe mit 2x100%, 2x95%, 1x70% getaucht und danach mit Leitungswasser gespült.

2. Färbung

Im nächsten Schritt wird die Gewebeprobe mithilfe von Proteinkinase K proteolytisch angedaut. Dazu gibt man ausreichend Proteinase-K-Lösung auf das Gewebe, so dass die Proben ausreichend bedeckt sind (mindestens 3 Tropfen (100 µL)). Nun werden sie 5 (±0,5) Minuten inkubiert. Danach wird der Objektträger mit Wasser gespült und 5 (±1) Minuten in ein frisches Wasserbad von Reagenzqualität gestellt.

Um eine Zerstörung der Zellmembran durch proteolytische Andauung zu verhindern, dürfen die genauen Zeitangaben nicht überschritten werden.

Im zweiten Schritt werden die Proben mit einem Peroxidase-Block (3%) bedeckt und 5 (±1) Minuten inkubiert. Auch danach wird mit Wasser gespült und die Probe in ein Bad aus 0,03% Triton aqua dest. gestellt.

Im dritten Schritt wird die Gewebeprobe mit dem primären Antikörper und einer negativen Kontrollreagenz 30 Minuten in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Auch nach diesem Schritt wird gespült.

Nun wird das markierte Polymer für 30 Minuten dazugegeben. Nach erneuter Spülung wird auf den Objektträger DAB+ Substrat-Chromogenlösung gegeben und 10 Minuten inkubiert. Danach werden die Proben 2–5 Minuten in ein frisches Wasserbad von Reagenzqualität gestellt.

3. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Die Objektträger werden für 6 Minuten in Meyer's Hämatoxylin gestellt und danach mit Leitungswasser gespült. Dabei müssen alle Hämatoxylinreste vollständig entfernt werden. Nach einem Wasserbad für 2-5 Minuten werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol behandelt.

Die gefärbten Gewebsschnitte werden mit angewärmter Glycingelatine benetzt und blasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt.

4. Negativkontrolle

Bei jedem Färbedurchlauf wird eine negative Kontrollgewebeprobe angefertigt, um Färbeartefakte durch unspezifisches Binden der Antikörper auszuschließen. Die Negativkontrolle wird wie die ursprünglichen Gewebeproben gefärbt, allerdings verzichtet man auf die Applikation des Primärantikörpers. Um die Spezifität der Färbung zu bestätigen, muss die Negativkontrolle signallos sein.

2.3.3.2 EnVision™+ HRP (DAKO) Färbeprotokoll für PTEN und Ras

1. Entparaffinierung

Die Gewebsschnitte werden zur vollständigen Entfernung des Paraffins für 2 x 5 Minuten in Xylol gestellt, danach 2 x 5 Minuten in 100% Aceton. Anschließend werden die Präparate 2 x 5 Minuten mit Leitungswasser gespült.

2. Vorbehandlung des Antikörpers

Die Gewebeproben werden in einen Citratpuffer gestellt (pH 6) und 3 x 5 Minuten in einer handelsüblichen Mikrowelle erhitzt. Verkochter Citratpuffer wird durch frischen Puffer ergänzt. Nach der Mikrowellenbehandlung müssen die Objektträger 10 Minuten abkühlen. Danach werden sie mit Leitungswasser abgespült und weitere 5 Minuten darin stehen gelassen.

3. Peroxidaseblock

Die Gewebeschnitte werden für 20 Minuten in 0,3%igem H₂O₂-Methanol-Bad inkubiert (1ml H₂O₂ in 100ml Methanol). Nach Ablauf der Zeit werden die Schnitte mit Leitungswasser gespült und anschließend 2 x 5 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4) belassen.

4. Inkubation mit dem Primärantikörper

Der Antikörper wurde mit einem Antikörperverdünnungspuffer (Zymed, San Francisco, USA) verdünnt. Die Verdünnung betrug für PTEN 1:50, für Ras 1:200. Diese Verdünnung wurde auf die Gewebeprobe aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

5. Inkubation mit der EnVision™-Polymerlösung

Anfangs werden die Gewebeschnitte 2 x 5 Minuten in einen TBS Puffer (pH 7,4) gestellt. Im nächsten Schritt werden sie 30 Minuten bei Raumtemperatur mit der EnVision™+HRP-Polymerlösung inkubiert (goat anti-mouse bei monoklonalem AK, goat anti-rabbit bei polyklonalem AK). Anschließend werden die Gewebeproben erneut 2 x 5 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4) gestellt.

6. Inkubation mit der Substratlösung

Die Gewebsschnitte werden bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit AEC-Substratlösung inkubiert. Bei AEC kann die Inkubation bis zu 30 min verlängert werden. Danach wird mit Leitungswasser gespült.

7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Die Objektträger werden für 5 Minuten in Meyer's Hämatoxylin gestellt und danach mit Leitungswasser gespült. Danach bläuen sie 5 Minuten in warmem Leitungswasser. Abschließend werden sie 15 Minuten in Aqua bidest. gestellt und zuletzt mit Glycerin-Gelatine blasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt.

2.4. Mikroskopische Auswertung

Die Präparate wurden bei 400-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch gemustert und ausgewertet. Die Karzinome wurden zunächst entsprechend des geschätzten Prozentranges der immunreaktiven Tumorfläche nach folgendem Score-System eingeteilt.

Score 1: < 10%

Score 2: ≥ 10 – 49%

Score 3: ≥ 50 % - 89%

Score 4: ≥ 90%

2.5. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden cut-offs (>50% bzw. > 90%) gewählt.

Es wurde das Programm SPSS Version 12.0 für Windows (The Apache Software Foundation). Das statistische Signifikanzniveau betrug unabhängig von den angewandten Tests 5%. Zur Beschreibung des Patientengutes, der Tumorstadien und der histomorphologischen Subgruppen wurden deskriptive Verfahren angewandt. Es wurden absolute und relative Häufigkeiten, sowie für Merkmale (z.B. das Alter des Patientenkollektives) Lageparameter wie Median, arithmetisches Mittel und die Standardabweichung errechnet. Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte nach der nicht-parametrischen Produkt-Limit Methode von Kaplan-Meier. Das Kaplan-Meier Modell basiert auf der Schätzung bedingter Wahrscheinlichkeiten zu jedem Zeitpunkt eines auftretenden Ereignisses und auf der Bildung des Produktgrenzwertes dieser Wahrscheinlichkeiten zur Schätzung der Überlebensrate zu jedem Zeitpunkt. Überlebende Patienten wurden für mindestens fünf Jahre postoperativ beobachtet. Zusätzlich wurde eine Multivarianzanalyse nach dem Co-proportional-Hazard-Modell durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1. Beispiele immunohistochemischer Expressionsmuster

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die Expressionsmuster von EGFR, PTEN und K-ras.

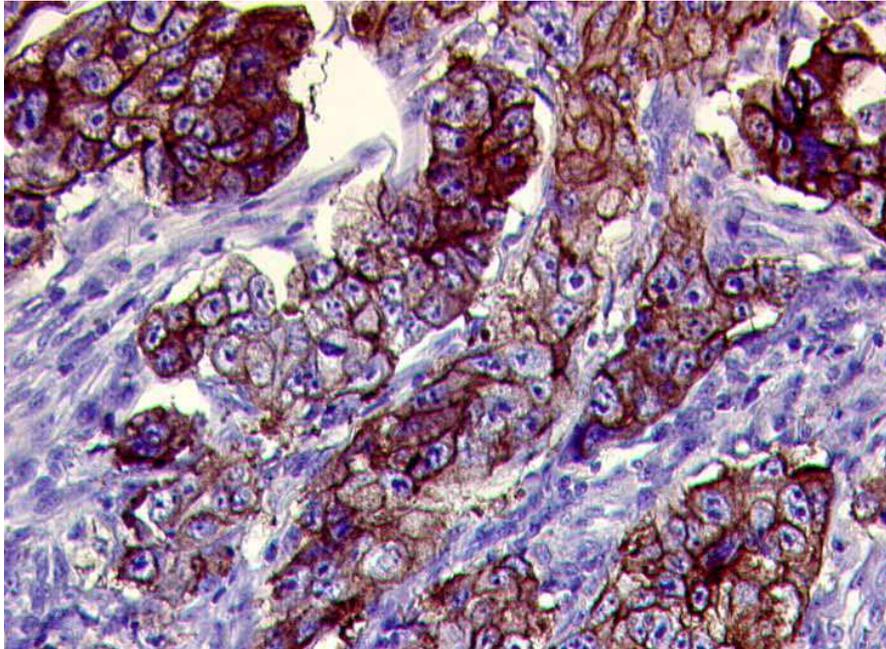


Abbildung 4: Typisches Färbemuster von EGFR mit zytoplasmatischer und membranärer Ausprägung

Das kolorektale Karzinom zeigt in Abbildung 4 eine starke zytoplasmatische und membranäre Expression von EGFR. Mehr als 90% der Zellen sind angefärbt, die Färbeintensität ist stark.

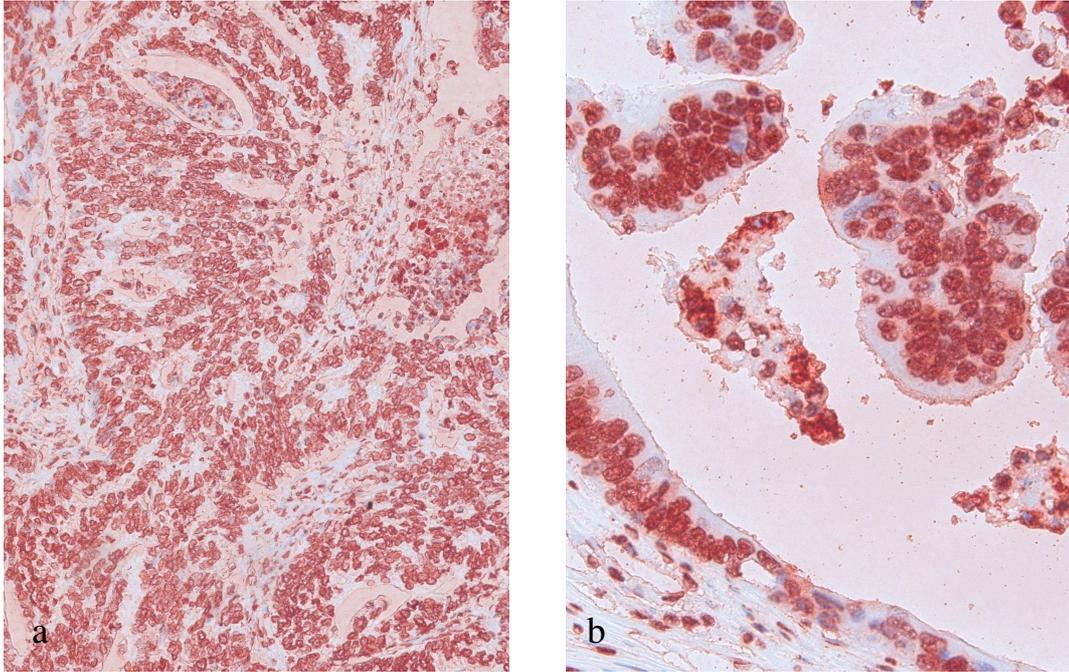


Abbildung 5 a) 200fach b) 400fach: Typisches immunhistochemisches Expressionsmuster von PTEN

In Abbildung 5 wird exemplarisch das Expressionsmuster von PTEN im kolorektalen Karzinom deutlich. Mehr als 90% der Zellen sind stark angefärbt.

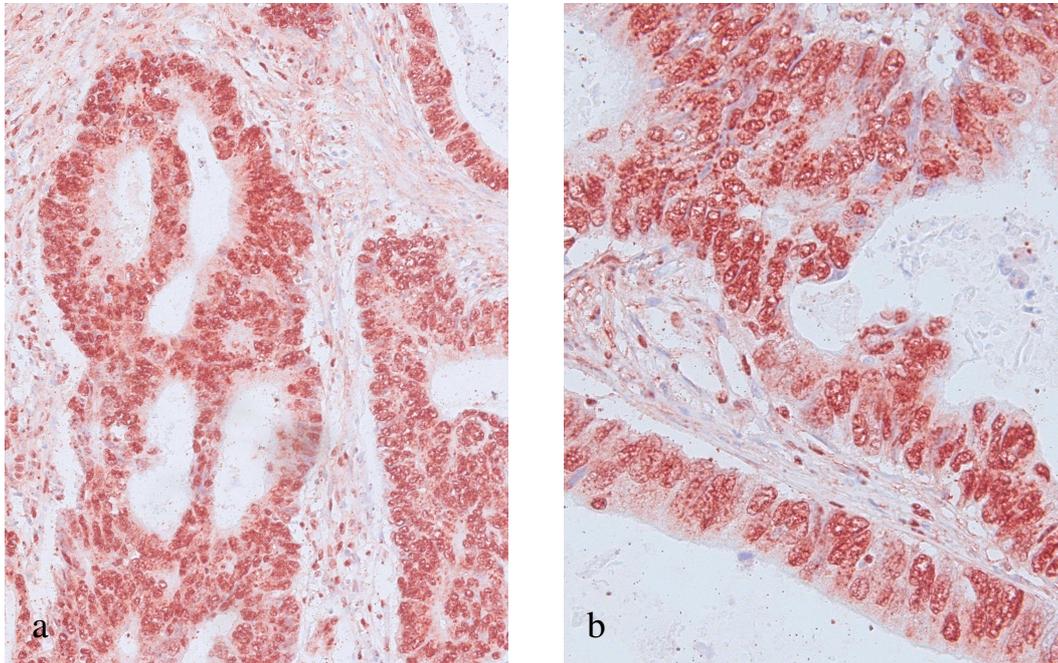


Abbildung 6 a) 200fach b) 400fach: Typisches immunhistochemisches Expressionsmuster von K-ras

Ebenfalls ein starkes Färbemuster zeigt Abbildung 6 bezüglich der K-ras-Expression. Der Nucleus weist eine deutliche K-ras-Expression auf, die Membran ist nicht beteiligt. Alle Tumorzellen sind angefärbt, das Bindegewebe dagegen kaum.

3.2. Beschreibung des Patientenkollektivs

Die Gewebeproben der kolorektalen Adenokarzinome wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. E. Gabbert) entnommen. Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung an 201 Patienten mit potentiell kurativer Resektion eines kolorektalen Adenokarzinoms in den Jahren 1990-1995.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 82 männlichen und 119 weiblichen Patienten zusammen. Das Alter des jüngsten Patienten betrug 29 Jahre, das des Ältesten 88 Jahre. Das mediane Alter lag bei 70,6 Jahren.

3.2.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

Tabelle 4

Variable	Anzahl	Prozent
Lokalisation		
Colon ascendens	48	23,9
Colon transversum*	21	10,4
Colon desc., Sigma	63	31,3
Rectum	69	34,3
Total	201	100,0

* inklusive beider Flexuren

pT		
1	14	7,0
2	34	16,9
3	138	68,7
4	15	7,5
Total	201	100,0

pN		
0	130	64,7
1	48	23,9
2	23	11,4
Total	201	100,0

pM n=2	1%	
---------------	----	--

UICC	Häufigkeit	Prozent
1	40	19,9
2	90	44,8
3	69	34,3
4	2	1,0
Total	201	100,0

Ergebnisse

Grading		
1	4	2,0
2	151	75,1
3	44	21,9
4	2	1,0
Total	201	100,0

Lymphatic vessel invasion (LVI)		
negativ	148	73,6
positiv	53	26,4
Total	201	100,0

Blood vessel invasion (BVI)		
negativ	186	92,5
positiv	15	7,5
Total	201	100,0

3.2.2. Korrelation der klinisch-pathologischen Daten des Gesamtkollektivs und der 5-Jahres-Überlebensrate

Tabelle 5

	Univariant		Multivariant	
	5 JÜR	p-Wert	Hazard-Ratio	p-Wert
Alter			1,06/Jahr	0,000
Geschlecht		n.s.		
- männlich	67%			
- weiblich	63%			
Lokalisation				n.s.
pT		0.014		
1	79%			
2	85%			
3	63%			
4	27%			
pN		0.002		0,001
0	73%		1 (ref)	-
1	63%		1,4	
2	36%		3,0	
pM	zu wenig Fälle			

Ergebnisse

UICC		0.025		n.s.
1	85%			
2	65%			
3	54%			
4	-			
Grading		n.s		n.s.
1-2	65%			
3-4	62%			
LVI		n.s		n.s.
negativ	67%			
positiv	58%			
BVI		n.s.		n.s.
negativ	66%			
positiv	44%			

Bei der Betrachtung der Korrelation der klinisch-pathologischen Daten des Gesamtkollektivs mit der 5-Jahres-Überlebensrate konnten einige statistisch signifikante Zusammenhänge ermittelt werden. Einer der Zusammenhänge war das Verhältnis vom pT-Stadium und der 5-Jahres-Überlebensrate. Dies wurde in der nachfolgenden Abbildung graphisch dargestellt.

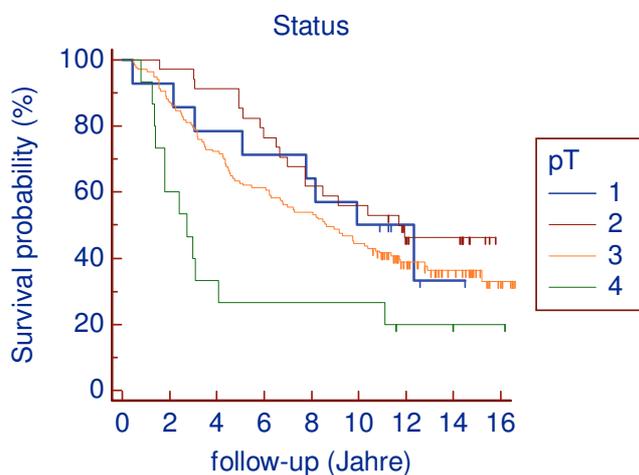


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Überlebensrate in Abhängigkeit vom pT-Stadium

Ebenfalls konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem der 5-Jahres-Überlebensrate und dem pN-Stadium festgestellt werden.

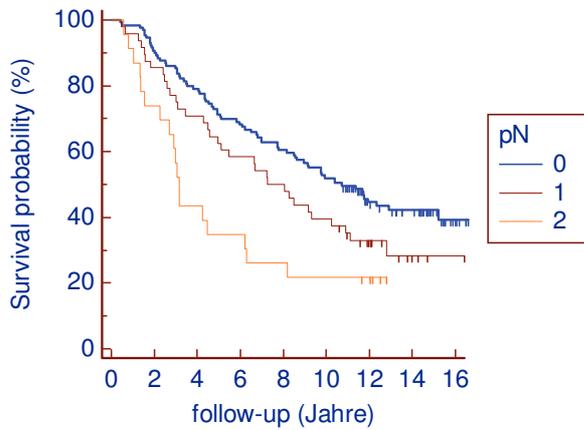


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Überlebensrate in Abhängigkeit vom pN-Stadium

Eine statistische Relevanz zeigte sich auch beim Betrachten der Korrelation vom UICC-Stadium und der 5-Jahres-Überlebensrate.

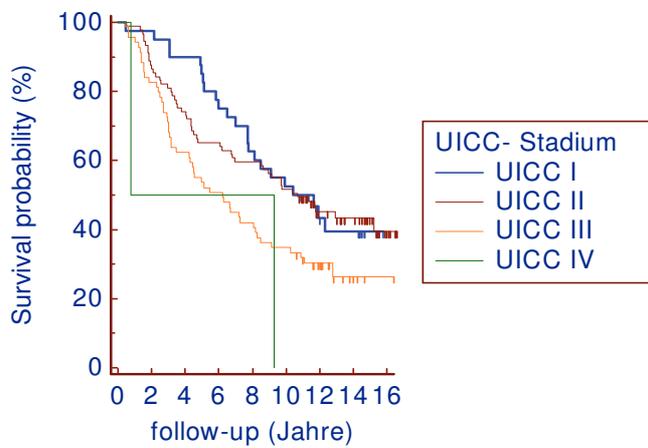


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Überlebensrate in Abhängigkeit vom UICC-Stadium

3.3 Statistische Analyse der EGFR Immunhistochemie

3.3.1. Häufigkeitsverteilung der EGFR-Expression an Invasionsfront und im Tumorzentrum

Alle 201 kolorektalen Gewebeproben wurden mit dem EGFR-Antikörper angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die prozentuale Anfärbbarkeit des EGFR-Rezeptors im Gewebe wurde in einem vierstufigen Bewertungssystem erfasst und jeweils in Invasionsfront und im Tumorzentrum separat ausgewertet.

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der EGFR-Expression

Invasionsfront		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	136 (67,6%)
2	≥ 10 – 49%	34 (16,9%)
3	≥ 50 % - 89%	22 (10,9%)
4	≥ 90%	9 (4,5%)
Tumorzentrum		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	132 (65,7%)
2	≥ 10 – 49%	43 (21,4%)
3	≥ 50 % - 89%	19 (9,4%)
4	≥ 90%	7 (3,5%)

Zusätzlich zur Häufigkeitsverteilung wurde die EGFR-Anfärbbarkeit hinsichtlich ihrer Farbintensität ausgewertet. Hierbei wurden drei Intensitätsgrade (schwach, mittel und stark) unterschieden.

Tabelle 7: EGFR-Färbeintensität in Invasionsfront und im Tumorzentrum

Invasionsfront		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
0	keine	59 (29,3%)
1	schwach	104 (51,7%)
2	mittel	33 (16,4%)
3	stark	5 (2,5%)
Tumorzentrum		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
0	keine	59 (29,3%)
1	schwach	103 (51,3%)
2	mittel	33 (16,4%)
3	stark	6 (2,9%)

3.3.2. Beziehung zwischen der EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Um die Beziehung zwischen der EGFR-Expression und den verschiedenen klinisch-pathologischen Variablen aufzuzeigen, wurden Kontingenztafeln erstellt. Die Ergebnisse werden hinsichtlich Anfärbungshäufigkeit (Score) und Farbintensität (Stärke) getrennt dargestellt.

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der EGFR-Anfärbungshäufigkeit und der Lokalisation, dem UICC-Stadium sowie dem Grading festgestellt werden (Tab. 8). Zwischen Geschlecht, den TNM-Stadien und der Lymphgefäß- bzw. Blutgefäßinvasion bestand kein Zusammenhang.

Die Farbintensität (Tab. 9) korrelierte signifikant mit dem Grading, nicht jedoch mit dem Geschlecht, der Lokalisation, den UICC-, pTNM-Stadien oder der Lymph- bzw. Blutgefäßinvasion

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen der EGFR-Anfärbungshäufigkeit und klinisch-pathologischen Parametern

Score		EGFR IF 1/ 2/ 3/ 4	EGFR TZ 1/ 2/ 3/ 4	EGFR NG -/ 1/ 2/ 3/ 4
Geschlecht	p	0.316	0.050	0.680
Männlich	n=82	61/ 10/ 7/ 4	62/ 15/ 4/ 1	8/ 56/ 11/ 3/ 4
weiblich	n=119	75/ 24/ 15/ 5	70/ 28/ 15/ 6	8/ 82/ 22/ 4/ 3
Alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/19/ 7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

Lokalisation	p	0.909	0.049	0.527
Colon ascend.	n=48	30/ 9/ 6/ 3	25/ 11/ 8/ 4	2/ 33/ 8/ 2/ 3
Colon transv.*	n=21	13/ 5/ 2/ 1	14/ 3/ 4/ 0	4/ 13/ 4/ 0/ 0
Colon desc.*	n=63	43/ 10/ 6/ 4	43/ 15/ 2/ 3	5/ 40/ 12/ 2/ 4
Rektum	n=69	50/ 10/ 9/ 1	50/ 14/ 5/ 0	5/ 52/ 9/ 3/ 0
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/19/ 7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

* inklusive beider Flexuren, * inklusive Sigma

pT	p	0.287	0.059	0.403
1	n=14	9/ 2/ 2/ 1	8/ 5/ 0/ 1	1/ 11/ 1/ 1/ 0
2	n=34	30/ 4/ 0/ 0	31/ 2/ 1/ 0	3/ 28/ 2/ 1/ 0
3	n=138	88/ 26/ 17/ 7	83/ 34/ 16/ 5	10/ 89/ 28/ 5/ 6
4	n=15	9/ 2/ 3/ 1	10/ 2/ 2/ 1	2/ 10/ 2/ 0/ 1
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/19/7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

pN	p	0.613	0.258	0.851
1	n=130	93/ 20/ 13/ 4	90/ 29/ 8/ 3	9/ 91/ 20/ 5/ 5
2	n=48	28/ 11/ 6/ 3	30/ 8/ 7/ 3	6/ 32/ 7/ 1/ 2
3	n=23	15/ 3/ 3/ 2	12/ 6/ 4/ 1	1/ 15/ 6/ 1/ 0

Ergebnisse

alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/7	16/ 138/ 33/ 7/ 7
------	-------	----------------	---------------	-------------------

pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n=2	1/ 1/ 0/ 0	0/ 0/ 2/ 0	1/ 1/ 0/ 0

UICC	p	0.504	0.001	0.583
1	n=40	33/ 4/ 2/ 1	32/ 6/ 1/ 1	3/ 32/ 3/ 2/ 0
2	n=90	60/ 16/ 11/ 3	58/ 23/ 7/ 2	6/ 59/ 17/ 3/ 5
3	n=69	42/ 13/ 9/ 5	42/ 14/ 9/ 4	7/ 46/ 12/ 2/ 2
4	n= 2	1/ 1/ 0/ 0	0/ 0/ 2/ 0	0/ 1/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

Grading	p	0.064	0.217	0.444
1-2	n=155	109/ 24/ 18/ 4	2/ 2/ 0/ 0	11/ 108/ 24/ 5/ 7
3-4	n=46	27/ 10/ 4/ 5	104/31/12/ 4	5/ 30/ 9/ 2/ 0
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

LVI	p	0.415	0.962	0.832
negativ	n=148	105/ 22/ 15/ 6	96/ 33/ 14/ 5	11/ 103/ 23/ 6/5
positiv	n=53	31/ 12/ 7/ 3	36/ 10/ 5/ 2	6/ 35/ 10/ 1/ 2
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/19/ 7	16/ 138/ 33/ 7/7

BVI	p	0.322	0.131	0.422
negativ	n=186	123/ 32/ 22/ 9	118/ 42/19/ 7	15/ 125/ 32/ 7/ 7
positiv	n=15	13/ 02/ 0/ 0	14/ 1/ 0/ 0	0/ 13/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen der EGFR-Farbintensität und klinisch-pathologischen Parametern

Stärke		EGFR IF 0/ 1/ 2/ 3	EGFR TZ 0/ 1/ 2/ 3	EGFR NG 0/ 1/ 2/ 3/
Geschlecht	P	0.622	0.138	0.187
männlich	N=82	27 /40 /14/ 1	26/ 45/ 11/ 0	8/ 20/ 38/ 14/ 2
weiblich	N=119	32/ 64/ 19/ 4	33/ 58/ 22/ 6	8/ 37/ 60/ 14/ 0
alle	N=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

Lokalisation	P	0.577	0.204	0.528
Colon ascend.	N=48	10/ 28/ 7/ 3	9/ 27/ 8/ 4	2/ 15/ 25/ 6/ 0
Colon transv.*	N=21	6/ 10/ 4/ 1	7/ 10/ 4/ 0	4/ 9/ 7/ 1/ 0
Colon desc.*	N=63	20/ 31/ 11/ 1	17/ 32/ 12/ 2	5/ 17/ 28/ 12/ 1
Rektum	N=69	23/ 35/ 11/ 0	26/ 34/ 9/ 0	5/16/ 38/ 9/ 1
alle	N=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

* inklusive beider Flexuren, * inklusive Sigma

pT	P	0.236	0.202	0.835
1	N=14	2/ 10/ 1/ 1	4/ 6/ 4/ 0	1/ 3/ 7/ 3/ 0
2	n=34	12/ 19/ 3/ 0	16/ 16/ 2/ 0	3/ 10/ 17/ 4/ 0

Ergebnisse

3	n=138	42/ 65/ 28/ 3	35/ 72/ 26/ 5	10/ 38/ 67/ 21/ 2
4	n=15	3/ 10/ 1/ 1	4 / 9/ 1/ 1	2/ 6/ 7/ 0/ 0
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

pN	p	0.318	0.071	0.009
1	n=130	44/ 62/ 22/ 2	45/ 61/ 21/ 3	9/ 38/ 63/ 20/ 0
2	n=48	9/ 31/ 6/ 2	10/ 30/ 5/ 3	6/ 15/ 22/ 5/ 0
3	n=23	6/ 11/ 5/ 1	4/ 12/ 7/ 0	1/ 4/ 13/ 3/ 2
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n= 2	0/ 1/ 1/ 0	0/ 1/ 1/ 0	16/ 1/ 0/ 1/ 0

UICC	p	0.324	0.280	0.423
1	n=40	12/ 23/ 4/ 1	18/ 16/ 6/ 0	3/ 9/ 21/ 7/ 0
2	n=90	32/ 39/18/ 1	27/ 45/ 15/ 3	6/ 29/ 42/ 13/ 0
3	n=69	15/ 41/ 10/ 3	14/ 41/ 11/ 3	7/ 18/ 35/ 7/ 2
4	n= 2	0/ 1/ 1/ 0	0/ 1/ 1/ 0	0/ 1/ 0/ 1/ 0
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

Grading	p	0.252	0.022	0.599
1-2	n=155	49/ 81/ 22/ 3	51/ 79/ 23/ 2	11/ 42/ 79/ 22/ 1
3-4	n=46	10/ 23/ 11/ 2	8/ 24/ 10/ 4	5/ 15/ 19/ 6/ 1
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

LVI	p	0.597	0.740	0.137
negativ	n=148	46/ 77/ 22/ 3	45/ 77/ 22/ 4	11/ 47/ 71/ 17/ 2
positiv	n=15	13/ 27/ 11/ 2	14/ 26/ 11/ 2	5/ 10/ 27/ 11/ 0
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

BVI	p	0.460	0.625	0.970
negativ	n=186	52/ 98/ 31/ 5	54/ 94/ 32/ 6	15/ 53/ 90/ 26/ 2
positiv	n=6	7/ 6/ 2/ 0	5/ 9/ 1/ 0	1/ 4/ 8/ 2/ 0
alle	n=201	59/ 104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/6	16/ 57/ 98/ 28/ 2

3.3.3. Überlebensanalyse

Teil der Fragestellung war es, herauszufinden, ob die EGFR-Expression in kolorektalen Karzinomen die Überlebensrate beeinflusst. Dazu wurde die EGFR-Expression in zwei Gruppen unterteilt (<10% bzw. >10%) und hinsichtlich Invasionsfront, Tumorzentrum und Normalgewebe bewertet. Ebenso wurde die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten bestimmt und nachfolgend mit der EGFR-Expression verglichen.

Ergebnisse

Die Testergebnisse zeigen, dass es statistisch gesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten bezüglich hoher oder niedriger EGFR-Expression gibt.

Auch die EGFR-Färbintensität zeigte weder in der Invasionsfront noch im Tumorzentrum einen Zusammenhang mit der 5-Jahres-Überlebensrate.

Tabelle 10: Korrelation zwischen EGFR Score und Stärke mit der 5-Jahres-Überlebensrate

	Univariant		Multivariant	
	5 JÜR	p-Wert	Hazard-Ratio	p-Wert
EGFR IF		n.s.		n.s.
<10%	64%			
>10%	63%			
EGFR TZ		n.s.		n.s.
<10%	63%			
>10%	64%			
EGFR NG		n.s.		n.s.
<10%	64%			
>10%	62%			
EGFR Stärke IF		n.s.		n.s.
0	64%			
1	64%			
2-3	67%			
EGFR Stärke TZ		n.s.		n.s.
0	65%			
1	65%			
2-3	66%			

3.4 Statistische Analyse der PTEN Immunhistochemie

3.4.1. Häufigkeitsverteilung der PTEN-Expression in Invasionsfront und Tumorzentrum

Die 201 kolorektalen Gewebeproben wurden mit dem PTEN-Antikörper nach der EnVision™-Methode angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die prozentuale Anfärbbarkeit des Tumorsuppressors im Gewebe und die Farbtintensität wurde in einem vierstufigen Bewertungssystem erfasst und jeweils in Invasionsfront und Tumorzentrum separat ausgewertet (siehe Kapitel 2, Material und Methoden).

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der PTEN Expression in Invasionsfront und mTumorzentrum

Invasionsfront		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	0
2	≥ 10 – 49%	9 (4,5%)
3	≥ 50 % - 89%	127 (63,1%)
4	≥ 90%	65 (32,3%)
Tumorzentrum		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	0
2	≥ 10 – 49%	4 (1,9%)
3	≥ 50 % - 89%	142 (70,6%)
4	≥ 90%	55 (27,7%)

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der PTEN-Farbtintensität an Invasionsfront und mTumorzentrum

Invasionsfront		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
1	schwach	19 (9,5%)
2	mittel	117 (58,2%)
3	stark	65 (32,3%)
Tumorzentrum		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
1	schwach	21 (10,4%)
2	mittel	93 (46,3%)
3	stark	87 (43,3%)

3.4.2. Beziehung zwischen der PTEN-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Auch für PTEN und die festgelegten klinisch-pathologischen Variablen wurden Kontingenztabeln erstellt, um die Korrelation untereinander aufzudecken.

Die Ergebnisse werden erneut bezüglich Anfärbungshäufigkeit (Score) und Farbintensität (Stärke) getrennt dargestellt.

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der PTEN-Farbintensität im Tumorzentrum und dem UICC-Stadium ermittelt werden (Tabelle 14), nicht jedoch zu den restlichen klinisch-pathologischen Parametern.

Eine Korrelation zwischen pTNM, dem Grading oder der Lymph- bzw. Blutgefäßinvasion konnte nicht gezeigt werden.

Tabelle 13: Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Score		PTEN IF 1 / 2 / 3 / 4	PTEN TZ 1 / 2 / 3 / 4	PTEN NG - / 2 / 3 / 4
Geschlecht	p	0.428	0.804	0.137
männlich	n=82	0/ 2/ 51/ 29	0/ 1/ 58/ 23	11/ 2/ 52/ 17
weiblich	n=119	0/ 7/ 76/ 36	0/ 3/ 84/ 32	10/ 8/ 86/ 16
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

Lokalisation	p	0.688	0.481	0.123
Colon ascend.	n=48	0/ 3/ 31/ 14	0/ 1/ 34/ 13	2/ 1/ 34/ 11
Colon transv.*	n=21	0/ 2/ 14/ 5	0/ 1/ 15/ 5	5/ 0/ 11/ 5
Colon desc.*	n=63	0/ 1/ 41/ 21	0/ 1/ 39/ 23	8/ 4/ 45/ 6
Rektum	n=69	0/ 3/ 41/ 25	0/ 1/ 54/ 14	6/ 5/ 48/ 10
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

pT	p	0.755	0.361	0.177
1	n=14	0/ 0/ 8/ 6	0/ 0/ 10/ 4	1/ 3/ 8/ 2
2	n=34	0/ 3/ 22/ 9	0/ 1/ 23/ 10	4/ 2/ 21/ 7
3	n=138	0/ 5/ 88/ 45	0/ 4/ 102/ 33	14/ 4/ 101/ 19
4	n=15	0/ 1/ 9/ 5	0/ 0/ 7/ 8	2/ 1/ 8/ 4
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

pN	p	0.353	0.383	0.142
1	n=130	0/ 8/ 78/ 44	0/ 2/ 96/ 32	11/ 7/ 93/ 19
2	n=48	0/ 1/ 31/ 16	0/ 2/ 29/ 17	7/ 3/ 26/ 12
3	n=23	0/ 0/ 18/ 5	0/ 0/ 17/ 6	3/ 0/ 19/ 1
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n=2	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 1/ 1

Ergebnisse

UICC	p	0.629	0.627	0.650
1	n=40	0/ 3/ 23/14	0/ 1/ 27/ 12	3/ 4/ 28/ 5
2	n=90	0/ 5/ 55/ 30	0/ 1/ 69/ 20	8/ 3/ 65/ 14
3	n=69	0/ 1/ 47/ 21	0/ 2/ 44/ 23	10/ 3/ 44/ 12
4	n=2	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 1/ 1
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

Grading	p	0.996	0.428	0.706
1-2	n=155	0/ 7/ 98/ 50	0/ 4/ 107/ 44	15/ 9/ 107/ 24
3-4	n=44	0/ 2/ 29/ 15	0/ 0/ 35/ 11	6/ 1/ 31/ 8
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

LVI	p	0.889	0.554	0.390
negativ	n=148	0/ 6/ 94/ 48	0/ 2/ 105/ 41	15/ 6/ 100/ 27
positiv	n=53	0/ 3/ 33/ 17	0/ 2/ 37/ 14	6/ 4/ 38/ 5
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

BVI	p	0.515	0.059	0.331
negativ	n=186	0/ 9/ 119/ 58	0/ 4/ 135/ 47	20/ 8/ 127/ 31
positiv	n=15	0/ 0/ 8/ 6	0/ 0/ 7/ 8	1/ 2/ 11/ 1
alle	n=201	0/ 9/ 127/ 65	0/ 4/ 142/ 55	21/ 10/ 138/ 32

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen der PTEN-Farbintensität und klinisch-pathologischen Parametern

Stärke		PTEN IF 1 / 2 / 3	PTEN TZ 1 / 2 / 3	PTEN NG - / 1 / 2 / 3
Geschlecht	p	0.420	0.246	0.366
männlich	N=82	10/ 44/ 28	5/ 40/ 37	11/ 7/ 39/ 25
weiblich	N=119	9/ 73/ 37	16/ 53/ 50	10/ 13/ 68/ 28
alle	N=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

Lokalisation	p	0.425	0.614	0.017
Colon ascend.	n=48	3/ 29/ 16	3/ 24/ 21	2/ 2/ 24/ 20
Colon transv.*	n=21	4/ 14/ 3	1/ 12/ 8	5/ 0/ 11/ 5
Colon desc.*	n=63	7/ 35/ 21	10/ 26/ 27	8/ 11/ 30/ 14
Rektum	n=69	5/ 39/ 25	7/ 31/ 31	6/ 7/ 42/ 14
alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

* inklusive beider Flexuren, * inklusive Sigma

pT	p	0.521	0.290	0.902
1	n=14	1/ 8/ 5	1/ 6/ 7	1/ 1/ 8/ 4
2	n=34	5/ 20/ 9	1/ 19/ 14	4/ 4/ 15/ 11
3	n=138	10/ 83/ 45	18/ 64/ 56	14/ 14/ 78/ 32
4	n=15	3/ 6/ 6	1/ 4/ 10	2/ 1/ 6/ 6
alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

Ergebnisse

pN	p	0.695	0.061	0.224
1	n=130	14/ 77/ 39	9/ 69/ 52	11/ 14/ 75/ 30
2	n=48	4/ 28/ 16	8/ 16/ 24	7/ 5/ 18
3	n=23	1/ 12/ 10	4/ 8/ 11	3/ 1/ 14/ 5
alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

pM	p	n.s.	n.s.	n.s
1	n=2	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 2/ 0	0/ 0/ 1/ 1

UICC	p	0.708	0.026	0.260
1	n=40	3/ 24/ 11	1/ 20/ 19	3/ 5/ 20/ 12
2	n=90	11/ 53/ 26	8/ 49/ 33	8/ 9/ 55/ 18
3	n=69	5/ 38/ 26	11/ 23/ 35	10/ 5/ 31/ 23
4	n=2	0/ 2/ 0	1/ 1/ 0	0/ 1/ 1/ 0
Alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

Grading	p	0.402	0.736	0.752
1-2	n=155	17/ 89/ 49	16/ 74/ 65	15/ 14/ 84/ 42
3-4	n=46	2/ 28/ 16	5/ 19/ 22	6/ 6/ 23/ 11
Alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

LVI	p	0.956	0.238	0.214
negativ	n=148	14/ 97/ 47	13/ 73/ 62	15/ 11/ 83/ 39
Positiv	n=53	5/ 30/ 18	8/ 20/ 25	6/ 9/ 24/ 14
Alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

BVI	p	0.058	0.876	0.572
negativ	n=186	18/ 112/ 56	20/ 86/ 80	20/ 18/ 97/ 51
positiv	n=15	1/ 5/ 9	1/ 7/ 7	1/ 2/ 10/ 2
Alle	n=201	19/ 117/ 65	21/ 93/ 87	21/ 20/ 107/ 53

3.4.3. Überlebensanalyse

Um herauszufinden, ob die PTEN-Expression einen Einfluss auf die Überlebensrate hat, wurden die Gewebeproben in jeweils zwei Gruppen unterteilt (Anfärbbarkeit < 90% bzw. > 90%) und jeweils an Invasionsfront, im Tumorzentrum und im Normalgewebe bewertet. Danach wurde die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit den beiden Gruppen verglichen.

Tabelle 15: Korrelation zwischen PTEN Score und Stärke mit der 5-Jahres-Überlebensrate

	Univariant		Multivariant	
	5 JÜR	p-Wert	Hazard-Ratio	p-Wert
PTEN IF		n.s.		n.s.
<90%	68%			
>90%	57%			
PTEN TZ		0,001		0,000
<90%	72%		1	
>90%	47%		2,2	
PTEN NG		n.s.		n.s.
<90%	66%			
>90%	53%			
PTEN Stärke IF		n.s.		n.s.
1	90%			
2	64%			
3	58%			
PTEN Stärke TZ		n.s.		n.s.
1	90%			
2	70%			
3	54%			
PTEN Stärke NG		n.s.		n.s.
1	70%			
2	66%			
3	58%			

In den Tests konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression im Tumorzentrum und der Überlebensrate gibt. Dabei zeigte die Gruppe mit der Expressionsrate <90% eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit, als die Gruppe mit der Expressionsrate >90%. Diese Korrelation wird in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

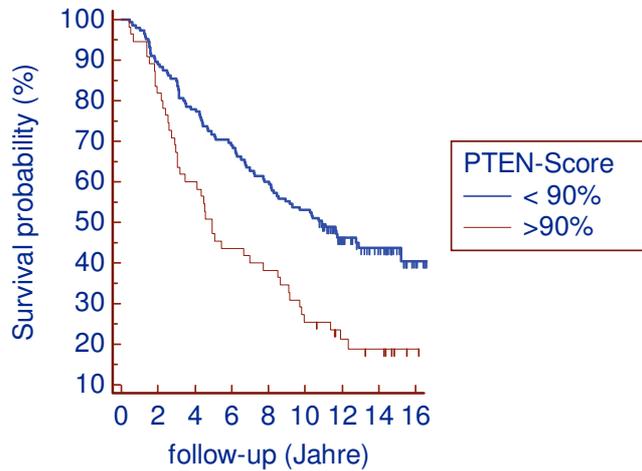


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Überlebensrate in Abhängigkeit vom PTEN Score

3.5 Statistische Analyse der K-ras Immunhistochemie

3.5.1. Häufigkeitsverteilung der K-ras-Expression an Invasionsfront und Tumorzentrum

Die 201 kolorektalen Gewebeproben wurden mit dem K-ras-Antikörper nach der EnVision™-Methode angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die prozentuale Anfärbbarkeit des Onkogens im Gewebe und die Farbintensität wurden in einem vierstufigen Bewertungssystem erfasst und jeweils an Invasionsfront und Tumorzentrum separat ausgewertet (siehe Kapitel 2, Material und Methoden).

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der K-ras-Expression an Invasionsfront und im Tumorzentrum

Invasionsfront		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	0
2	≥ 10 – 49%	6 (3%)
3	≥ 50 % - 89%	7 (3,5%)
4	≥ 90%	188 (93,5%)
Tumorzentrum		
Score	Prozentrang	n (%)
1	< 10%	0
2	≥ 10 – 49%	2 (0,9%)
3	≥ 50 % - 89%	19 (9,4%)
4	≥ 90%	180 (89,5%)

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der K-ras-Farbintensität Invasionsfront und im Tumorzentrum

Invasionsfront		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
0	keine	0
1	schwach	21 (10,4%)
2	mittel	113 (56,2%)
3	stark	67 (33,3%)
Tumorzentrum		
Stärke	Färbeintensität	n (%)
0	keine	0
1	schwach	19 (9,4%)
2	mittel	112 (55,7%)
3	stark	70 (34,8%)

3.5.2. Beziehung zwischen der K-ras-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Um eine Korrelation zwischen K-ras und den festgelegten klinisch-pathologischen Variablen zu entdecken, wurden Kontingenztafeln erstellt.

Die Ergebnisse werden erneut getrennt nach Anfärbungshäufigkeit (Score) und Farbintensität (Stärke) dargestellt.

Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der K-ras-Anfärbungshäufigkeit im Tumorzentrum und der Blutgefäßinfiltration (BVI) nachgewiesen werden (Tabelle 15), nicht jedoch zu den restlichen klinisch-pathologischen Parametern.

Die Farbintensität im Tumorzentrum korrelierte signifikant mit der Lokalisation und dem Geschlecht. Außerdem zeigte sich eine Korrelation zwischen der Farbintensität an der Invasionsfront und dem Geschlecht, sowie dem pT-Stadium.

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen der Ras-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Score		Ras IF 2 / 3 / 4	Ras TZ 2 / 3 / 4	Ras NG - / 1 / 2 / 3 / 4
Geschlecht	p	0.473	0.975	0.448
männlich	N=82	1/ 3/ 78	1/ 8/ 73	11/ 1/ 2/ 14/ 54
weiblich	N=119	5/ 4/ 110	1/ 11/ 107	8/ 1/ 2/ 13/ 95
alle	N=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

Lokalisation	p	0.537	0.697	0.182
Colon ascend.	n=48	1/ 1/ 46	0/ 4/ 44	3/ 0/ 1/ 11/ 33
Colon transv.*	n=21	2/ 0/ 19	0/ 1/ 20	6/ 0/ 1/ 1/ 15
Colon desc.*	n=63	1/ 3/ 59	1/ 9/ 53	5/ 0/ 2/ 5/ 51
Rektum	n=69	2/ 3/ 64	1/ 5/ 63	5/ 2/ 0/ 10/ 52
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

* inklusive beider Flexuren, * inklusive Sigma

pT	p	0.803	0.914	0.961
1	n=14	0/ 0/ 14	0/ 2/ 12	1/ 0/ 0/ 1/ 12
2	n=34	0/ 2/ 32	0/ 2/ 32	2/ 1/ 1/ 4/ 25
3	n=138	6/ 4/ 128	2/ 14/ 122	13/ 1/ 3/ 19/100
4	n=15	0/ 1/ 14	0/ 1/ 14	1/ 0/ 0/ 2/ 12
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

pN	p	0.757	0.389	0.787
1	n=130	4/ 6/ 120	1/ 14/ 115	12/ 2/ 3/ 19/ 94
2	n=48	1/ 1/ 46	0/ 4/ 44	5/ 0/ 1/ 4/ 38
3	n=23	1/ 0/ 22	1/ 1/ 21	2/ 0/ 0/ 4/ 17

Ergebnisse

alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149
------	-------	-----------	------------	------------------

pM	p	n.s.	n.s.	n.s
1	n=2	0/ 2/ 0	0/ 1/ 1	-/ 0/ 0/ 0/ 2

UICC	p	0.758	0.450	0.967
1	n=40	0/ 2/ 38	0/ 4/ 36	2/ 1/ 1/ 5/ 31
2	n=90	4/ 4/ 82	1/ 10/ 79	10/ 1/ 2/ 14/ 63
3	n=69	2/ 1/ 66	1/ 4/ 64	7/ 0/ 1/ 8/ 53
4	n=2	0/ 0/ 2	0/ 1/ 1	0/ 0/ 0/ 0/ 2
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

Grading	p	0.289	0.406	0.661
1-2	n=155	4/ 7/ 144	1/ 13/ 141	13/ 2/ 3/ 23/114
3-4	n=46	2/ 0/ 44	1/ 6/ 39	6/ 0/ 1/ 4/ 35
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

LVI	p	0.549	0.650	0.468
negativ	n=148	4/ 4/ 140	1/ 15/ 132	16/ 1/ 4/ 21/106
positiv	n=53	2/ 3/ 48	1/ 4/ 48	3/ 1/ 0/ 6/ 43
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

BVI	p	0.522	0.033	0.111
negativ	n=186	5/ 7/ 174	1/ 19/ 166	18/ 1/ 4/ 24/139
positiv	n=15	1/ 0/ 14	1/ 0/ 14	1/ 1/ 0/ 3/ 110
alle	n=201	6/ 7/ 188	2/ 19/ 180	19/ 2/ 4/ 27/149

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen der Ras-Färbeintensität und klinisch-pathologischen Parametern

Stärke		Ras IF 1 / 2 / 3	Ras TZ 1 / 2 / 3	Ras NG - / 1 / 2 / 3
Geschlecht	p	0.029	0.049	0.237
männlich	N=82	4/ 54/ 24	5/ 54/ 23	10/ 23/ 39/ 10
weiblich	N=119	17/ 59/ 43	14/ 58/ 47	9/ 25/ 61/ 24
alle	N=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

Lokalisation	p	0.098	0.007	0.356
Colon ascend.	n=48	3/ 21/ 24	2/ 23/ 23	2/ 17/ 20/ 9
Colon transv.*	n=21	3/ 10/ 8	0/ 8/ 13	6/ 5/ 7/ 3
Colon desc.*	n=63	6/ 42/ 15	9/ 37/ 17	5/ 12/ 33/ 13
Rektum	n=69	9 / 40/ 20	8/ 44/ 17	6/ 14/ 40/ 9
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

* inklusive beider Flexuren, * inklusive Sigma

Ergebnisse

pT	p	0.014	0.177	0.251
1	n=14	0/ 5/ 9	1/ 7/ 6	1/ 3/ 9/ 1
2	n=34	2/ 26/ 6	1/ 24/ 9	3/ 8/ 17/ 6
3	n=138	18/ 76/ 44	16/ 76/ 46	14/ 33/ 70/ 21
4	n=15	1/ 6/ 8	1/ 5/ 9	1/ 4/ 4/ 6
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

pN	p	0.521	0.295	0.394
1	n=130	10/ 76/ 44	9/ 77/ 44	12/ 32/ 68/ 18
2	n=48	7/ 25/ 16	8/ 24/ 16	5/ 11/ 23/ 9
3	n=23	4/ 12/ 7	2/ 11/ 10	2/ 5/ 9/ 7
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

pM	p	n.s.	n.s.	n.s
1	n=2	0/ 2/ 0	1/ 1/ 0	0/ 0/ 1/ 1

UICC	p	0.489	0.208	0.629
1	n=40	2/ 24/ 14	1/ 24/ 15	3/ 9/ 21/ 7
2	n=90	8/ 52/ 30	8/ 53/ 29	9/ 23/ 47/ 11
3	n=69	11/ 35/ 12	9/ 34/ 26	7/ 16/ 31/ 15
4	n=2	0/ 2/ 0	1/ 1/ 0	0/ 0/ 1/ 1
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

Grading	p	0.319	0.157	0.486
1-2	n=155	14/ 91/ 50	13/ 92/ 50	13/ 39/ 79/ 24
3-4	n=46	7/ 22/ 17	6/ 20/ 20	6/ 9/ 21/ 10
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

LVI	p	0.123	0.221	0.824
negativ	n=148	12/ 84/ 52	11/ 86/ 51	16/ 35/ 71/ 26
positiv	n=53	9/ 29/ 15	8/ 26/ 19	3/ 13/ 29/ 8
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

BVI	p	0.509	0.443	0.314
negativ	n=186	20/ 106/ 60	17/ 106/ 63	18/ 43/ 95/ 30
positiv	n=6	1/ 7/ 7	2/ 6/ 7	1/ 5/ 5/ 4
alle	n=201	21/ 113/ 67	19/ 112/ 70	19/ 48/ 100/ 34

3.5.3. Überlebensanalyse

Auch hier wurden die Gewebeproben in jeweils zwei Gruppen unterteilt (Anfärbbarkeit < 90% bzw. > 90%) und jeweils an Invasionsfront, im Tumorzentrum und im Normalgewebe bewertet. Danach wurde die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit den beiden Gruppen verglichen.

Ergebnisse

Die Testergebnisse zeigen, dass es statistisch gesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Überlebenswahrscheinlichkeiten bezüglich hoher oder niedriger Ras-Expression gibt.

Auch die EGFR-Färbintensität zeigte weder in der Invasionsfront noch im Tumorzentrum einen Zusammenhang mit der 5-Jahres-Überlebensrate.

Tabelle 20: Korrelation zwischen dem Ras-Score und Stärke mit der 5-Jahres-Überlebensrate

	Univariant		Multivariant	
	5 JÜR	p-Wert	Hazard-Ratio	p-Wert
Ras IF		n.s.		n.s.
<90%	65%			
>90%	64%			
Ras TZ		n.s.		n.s.
<90%	74%			
>90%	63%			
Ras NG		n.s.		n.s.
<90%	53%			
>90%	68%			
Ras Stärke IF		n.s.		n.s.
1	67%			
2	66%			
3	62%			
Ras Stärke TZ		n.s.		n.s.
1	78%			
2	60%			
3	69%			
Ras Stärke NG		n.s.		n.s.
1	62%			
2	69%			
3	59%			

4 Diskussion

4.1 Analyse der klinisch-pathologischen Daten

In der vorliegenden Untersuchung wurden 201 kolorektale Karzinome untersucht. Die statistische Analyse zeigt hinsichtlich der Lokalisation eine deutliche Präferenz im Bereich der distalen Darmabschnitte. Die meisten Karzinome wurden im Bereich des Colon descendens, des Sigmoideums und des Rektums nachgewiesen (insgesamt 65,6 %). Diese Verteilung der kolorektalen Karzinome konnte von Obrand et al. 1998 bestätigt werden.

Im vorliegenden Kollektiv zeigte das kolorektale Karzinom keine Geschlechtsspezifität. Männer und Frauen waren nahezu gleichhäufig betroffen (67% bzw. 63%). Dies konnte auch in anderen epidemiologischen Studien nachgewiesen werden (Parkin et al. 2002).

Bei Betrachtung der Korrelation von klinisch-pathologischen Daten und der 5-Jahres-Überlebensrate konnte ein signifikanter Zusammenhang sowohl zwischen dem pT- ($p= 0,014$) als auch dem pN – Stadium ($p= 0,002$) und der Überlebenszeit beobachtet werden. Eine signifikante Korrelation bezüglich pN zeigte sich in der hier vorliegenden Studie nicht nur in der univariaten, sondern auch in der multivariaten Analyse, wodurch pN zu einem unabhängigen Prognoseparameter wird. Dies konnte Leitch et al. 2007 für alle drei TNM-Faktoren zeigen.

Zwischen Überlebenszeit und pM-Stadium konnte dagegen keine Korrelation erstellt werden, Ursache hierfür kann die geringe Menge an pM-Patienten in dem hier vorliegendem Patientenkollektiv sein ($n=2$).

Die o.g. Ergebnisse können durch mehrere immunhistochemische Studien nachvollzogen werden. Mehrkhani et al. 2008 bestätigen, dass jeder der drei Faktoren, sowohl die Infiltrationstiefe (T), als auch die Anzahl der Fernmetastasen (M) und der Lymphknotenbefall (N) sich auf die Überlebenszeit auswirkt.

Zlobec et Lugli beschreiben 2008 die TNM-Stadien als Goldstandard der prognostischen Faktoren, da die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit kolorektalem Karzinom sehr stark von dem TNM-Stadium abhing. Die TNM-Klassifikation hat sich daher als zuverlässiges Prognosesystem etabliert.

In der hier vorliegenden immunhistochemischen Studie zeigen nicht nur die Faktoren des TNM-Systems einen Einfluss auf die Überlebenszeit, auch das davon abhängige UICC-Stadium ($p= 0,025$). Dieses Ergebnis kann in Arbeiten von Mehrkhani et al. 2008, Leitch et al. 2007 und Compton 1999 nachvollzogen werden.

Neben den TNM-Stadien wurden verschiedene andere tumorassoziierte Prognosefaktoren untersucht. In einigen Arbeitsgruppen konnte z.B. gezeigt werden, dass nicht nur venöse sondern auch lymphatische Gefäßinfiltrationen eine wichtige Rolle in der Mikrometastasenverteilung und somit für die Tumorprogression spielen. Blut- ebenso wie Lymphgefäßinfiltration wurden als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert (Zlobec et al. 2008, Compton et al. 1999, Minsky et al. 1999). Zwischen Blut- oder Lymphgefäßinfiltration und der Überlebenszeit konnte in dieser Studie jedoch kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Auch hier variieren die Zahlen der unterschiedlichen Gruppen (Lymphknoteninvasion/ Blutgefäßinfiltration negativ oder positiv) stark.

4.2 Analyse der immunhistochemischen Expressionsmuster

4.2.1. EGFR – Qualitative und quantitative Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Überlebenszeit

In dieser Studie wurde die EGFR-Expression im kolorektalen Karzinom untersucht. Es wurde sowohl die Quantität, als auch die Qualität der immunhistochemischen Färbung im Zentrum des Tumors als auch in der Randzone des Tumors (Invasionsfront) erfasst.

Um den EGFR nachzuweisen wird beim kolorektalen Karzinom neben den Standardtechniken der Proteinexpression und der PCR sehr häufig die Immunhistochemie verwendet.

In der hier vorliegenden Studie konnte immunhistochemisch eine allgemeine EGFR-Expression in 35 – 97% der kolorektalen Karzinome nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit denen anderer Arbeitsgruppen (Shia et al. 2008, Zlobec et al. 2007, Bibeau et al. 2006, Goldstein et Armin, 2001, McKay et al. 2002, Spano et al. 2005, Messa et al. 1998). Sie alle zeigten in ihren Studien an kolorektalen Karzinomen eine EGFR-Expression in mehr als 65% der Fälle.

Eine positive EGFR-Reaktion konnte in dieser immunhistochemischen Studie bei mehr als 70% der Tumoren nachgewiesen werden. Eine starke Anfärbung kam jedoch selten vor (ca. 3%), ebenso selten waren mehr als 90% der Zellen angefärbt (Score 4 maximal bei 4,5% der Patienten). Die Zahl der geringgradig angefärbten Präparate (Score 1 und 2) überwog.

Goldstein et Armin zeigten allerdings im Gegensatz zu diesen Ergebnissen eine deutlich höhere Expressionsrate (bei 34,5% der Patienten Score 3-4), ebenso wie Spano et al. 2005 (bei 82% der Patienten Score 3-4). Studien von Khorana et al. 2003 sowie Koretz et al. 1990 konnten unsere Expressionsraten (15,4% bzw. 12,9% Score 3-4) dagegen bestätigen.

Hinsichtlich Invasionsfront und Tumorzentrum varrierten die Zahlen nicht wesentlich. Im Vergleich mit anderen Studien konnte keine erhöhte EGFR-Reaktivität in tieferen Tumorschichten gefunden werden. Die EGFR-Reaktivität an Invasionsfront (4,5%) und im Tumorzentrum (3,5%) unterschied sich kaum. Goldstein und Armin hingegen zeigten eine signifikant höhere EGFR-Reaktivität in den tieferen Tumorschichten verglichen mit den oberflächlichen Anteilen des Tumors (16,9% versus 7,9%).

Diese sehr unterschiedlichen EGFR-Expressionsraten sind wahrscheinlich durch unterschiedliche immunhistochemische Methoden (unterschiedliche Antikörper, Färbeprotokolle und Fixationstechniken) zu erklären, ebenso wie durch die Qualität der Präparate und die nicht-standardisierten Score-Einteilungen bei der Auswertung.

Der Vergleich der EGFR-Expression mit klinisch-pathologischen Daten zeigte in der hier vorliegenden Arbeit deutlich variierende Ergebnisse.

Es konnte keine Korrelation zwischen EGFR-Expression und Geschlecht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen aus vorangegangenen Studien (McKay et al. 2002, Giralt et al. 2002, Antonacopoulou et al. 2008).

Es konnte allerdings ein schwach signifikanter Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und der Lokalisation gefunden werden ($p=0,049$). Die Anzahl der EGFR-reaktiven Zellen nahm nach distal ab, die wenigsten (Score 1) waren im Rektum zu finden. Koretz et al. 1990 fanden in ihrer Studie zwar keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und der Lokalisation, wohl aber einen Trend Richtung Kolon und Sigmoid. Beide Darmabschnitte zeigten im Vergleich zum Rektum eine höhere EGFR-Expression. Ursachen für diese Beobachtung stehen aktuell noch aus und sind Bestandteil weiterer Erforschungen.

Wie andere Autoren konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der EGFR-Reaktivität und den pTNM-Stadien bewiesen werden (Antonacopoulou et al. 2008, Giralt et al. 2002, Porebska et al. 2000, Koretz et al. 1990).

Die UICC-Stadien dagegen korrelierten schon mit der EGFR-Expression ($p=0,001$). Hier zeigte sich bei niedrigem UICC-Stadium ebenfalls eine niedrige EGFR-Expression. Ähnliche Resultate wurden auch in anderen klinischen Studien gefunden (Koretz et al. 1990, All et al, 2007). Dies ist ein weiterer Hinweis für die Rolle der EGFR-Überexpression in fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen.

Verschiedene Arbeitsgruppen (Steele et al. 1990, Klufftinger et al. 1992 und McKay et al. 2002) konnten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen einen statistischer Zusammenhang zwischen der EGFR-Anfärbbarkeit im Tumorzentrum und dem Grading belegen ($p=0,022$). Diese Signifikanz liegt nur bezüglich des Tumorzentrums nicht jedoch der Invasionsfront vor.

Allerdings gibt es mehrere Arbeitsgruppen, die in ihren Studien im Widerspruch zu den o. g. Ergebnissen keine Korrelation zwischen der EGFR-Expression und dem Grading finden konnten (Messa et al. 1998, Koretz et al., Spano et al. 2005, Antonacopoulou et al., 2008, Zlobec et al. 2007).

In unserer Studie konnte zwar ein Zusammenhang zwischen der EGFR-Farbintensität und dem Grading, nicht aber zwischen der Anzahl der EGFR-positiven Zellen und dem Grading gefunden werden ($p=0,217$).

Keine Bedeutung scheint die EGFR-Expression für die Blut- und Lymphgefäßinfiltration zu haben (Zlobec et al. 2007). Auch der hier vorliegenden Studie wurde weder für den einen noch für den anderen Parameter eine signifikante Korrelation gefunden.

Betrachtet man nun die Ergebnisse immunhistochemischer Studien hinsichtlich der EGFR-Expression und der Überlebenszeit, so wird deutlich, dass eine Korrelation zwischen den beiden Faktoren vermutlich nicht existiert.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen EGFR-Expression und Überlebenszeit bleibt die Studienlage weiterhin unklar. Auch hier führen wahrscheinlich unterschiedliche Methoden und heterogene Studiengruppen zu gegenteiligen Aussagen. Diese Aussage sollte aufgrund der nicht-standardisierten Ergebnisse und Methoden kritisch hinterfragt werden.

So konnte eine Reihe von Autoren mehrere Hinweise für eine schlechtere Prognose bei erhöhter EGFR-Expression finden (Khorana et al. 2003, Zlobec et al. 2007, Goldstein et al. 2001).

Nicholson et al. zeigten 2001 jedoch in einer groß angelegten Metastudie über 20.000 Patienten, dass in 52% der Studien eine erhöhte EGFR-Expression ein eher geringer Prognoseindikator darstellt.

Dieses Ergebnis kann von Saeki et al. 1992, Koenders et al. 1995 und McKay et al. 2002 verstärkt werden. Sie beschrieben keinen Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und der Überlebenszeit. Auch die hier vorliegende Studie kann einen Einfluss der EGFR-Expression auf ein kürzeres Überleben oder eine schlechtere Prognose nicht beweisen.

Allerdings fand Radinsky et al. ein erhöhtes Risiko bei hoher EGFR-Expression für Lebermetastasen. Zusätzlich wurde eine erhöhte EGFR Expression mit einem aggressiveren Wachstumsverhalten und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Metastasen in Verbindung gebracht (Prewett et al. 2001).

Die Bedeutung des EGFR bezüglich der Überlebenszeit bleibt offensichtlich unklar. Tendenziell kann derzeit nicht von einer bestehenden Assoziation ausgegangen werden. Weitere Studien sind nötig, um die Datenlage bezüglich der EGFR-Expression der daraus folgenden prognostischen Bedeutung weiter zu erschließen.

Trotz unterschiedlicher Antikörper, Patientenkollektive und Klassifikationssystemen entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit grundsätzlich denen anderer immunhistochemischer. Bestehende Zusammenhänge beziehen sich v.a. auf das Tumorzentrum, die Invasionsfront scheint bezüglich der EGFR-Expression eine geringe Rolle zu spielen.

4.2.2. PTEN – Qualitative und quantitative Expression Korrelation zu klinisch- pathologischen Parametern und Überlebenszeit

In dieser Studie wurde die PTEN-Expression im kolorektalen Karzinom sowohl qualitativ als auch quantitativ im Zentrum sowie an der Invasionsfront des Tumors erfasst.

PTEN ist ein negativer Regulator des Proteinkinase B (PKB)/Akt Signalwegs. Seine Inaktivierung führt zur unkontrollierten Signalgabe und somit zu erhöhter Zellproliferation, Zellgröße und Zellüberleben.

In dieser Studie war die Mehrzahl der Proben der kolorektalen Karzinome PTEN-positiv. Weder im Tumorzentrum, noch in der Invasionsfront konnte eine PTEN-Expression < 10% nachgewiesen werden.

In der Invasionsfront zeigte sich in 63,1%, im Tumorzentrum bei 70,6% eine starke Anfärbbarkeit. Fast die gleichen Ergebnisse wurden in einer Studie von Sawai et al. 2008 demonstriert: Eine starke PTEN-Expression zeigte sich bei 62,9% der kolorektalen Karzinome ohne Lebermetastasen. Ein starker Unterschied zeigte sich in Sawais Studie zu den Proben von Patienten mit Lebermetastasen. Dort war die PTEN-Expression zum größten Teil schwach (75, 4%). Nur 24,6% der Zellen zeigten eine stärkere PTEN-Expression. Da in der hier vorliegenden Studie bei weniger als 1% der Patienten Fernmetastasen vorlagen, können die letztgenannten Ergebnisse nicht übertragen werden.

Abubaker et al. berichten in ihrer immunhistochemischen Studie von einem Verlust der PTEN-Expression in 66,1% der primären kolorektalen Karzinome. Dieser Wert kann in dieser immunhistochemischen Studie keinesfalls belegt werden, da sowohl im Tumorzentrum, als auch in der Invasionsfront keine Probe PTEN-negativ war.

Bezüglich der Anfärbungshäufigkeit (Score) gab es zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront kaum wesentliche Unterschiede. Sowohl an Invasionsfront als auch im Tumorzentrum lässt sich eine ähnliche Verteilung beobachten. Bei genauerer Betrachtung zeigt die Invasionsfront im Vergleich zum Tumorzentrum eher einen Trend zur geringen PTEN-Expression (Invasionsfront 4,5% PTEN-niedriges Score gegen 1,9% im Tumorzentrum).

Auch die Farbintensität war innerhalb der Invasionsfront gering reduziert (nur 32,3% stark angefärbte Zellen bezogen auf 43,3% im Tumorzentrum).

Dies lässt vermuten, dass ein PTEN-Verlust und eine dadurch unkontrollierte Signalabgabe eher eine Rolle im Gebiet des infiltrierenden Tumors spielt.

Auch Colagoglu et al. untersuchten 2008 die PTEN-Farbintensität in kolorektalen Karzinomen und fanden ähnliche Ergebnisse für den mittleren-schwachen, sowie den starken Bereich. Er unterschied in seiner Arbeit allerdings nicht zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront.

Chen et al. zeigten 2007 in ihrer Studie eine signifikante Korrelation zwischen niedriger PTEN-Expression und entsprechend niedrigem Grading in kolorektalen Karzinomen. Mit diesen Beobachtungen kommt die hier vorliegende Studie allerdings nicht überein. Beobachtet werden konnte dagegen ein klinischer Zusammenhang zwischen dem Grad der PTEN-Farbstärke im Tumorzentrum und den UICC-Stadien. Eine schwache PTEN-Expression war laut Sawai et al. 2008 signifikant mit einem erhöhten TNM-Stadium und Lymphknoten-Metastasen verbunden.

Eine derartige Korrelation konnte in dieser immunhistochemischen Studie nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig einen Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression und anderen klinisch-pathologischen Daten wie Geschlecht, Lokalisation, Lymph- und Blutgefäßinfiltration.

Vereinzelt existieren Studien, die entsprechende Ergebnisse bestätigen.

Colagoglu et al. 2008 konnten in ihrer Studie ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Staging, Lymphgefäßinfiltration und der PTEN-Expression nachweisen. Allerdings wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression und dem Geschlecht dargestellt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine niedrigere PTEN-Expression häufiger in distalen Karzinomen zu finden war. Dies war bereits 2006 von Rychahou et al. beschrieben worden.

Ob ein Zusammenhang zwischen der PTEN-Expression und der Überlebensrate besteht, wird in der Literatur derzeit kontrovers diskutiert. Sawai et al. postulierte 2008, dass die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit kolorektalem Karzinom signifikant höher bei Patienten mit positiver als mit negativer PTEN-Expression war. Colagoglu et al. 2008 konnten bezüglich des kolorektalen Karzinoms wiederum keinen Zusammenhang zwischen PTEN-Expression und Überlebenszeit finden. Stattdessen belegten sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen PTEN-Expression und Auftreten eines Lokalrezidivs.

In der hier vorliegenden immunhistochemischen Studie zeigte sich sowohl in der uni- ($p=0,001$) als auch in der multivariaten ($p=0,000$) Überlebensanalyse eine signifikante Korrelation zwischen einer reduzierten Expression von PTEN im Tumorzentrum und einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da PTEN als Tumorsuppressor die proliferativen Signalkaskaden hemmt und seine Abwesenheit zu einem unkontrollierten Zellwachstum führt.

Der Grund für die nachgewiesenen erhöhte Überlebensrate bei geringer PTEN-Expression beruht wahrscheinlich auf einem statistischen Fehler. In allen Korrelationen wird eine hohe Anzahl von Proben mit positiver PTEN-Expression mit einer sehr kleinen Gruppe schwach angefärbter bzw. PTEN-negativer Präparate verglichen und analysiert.

Welche Rolle PTEN bezüglich der Überlebenszeit im kolorektalen Karzinom spielt bleibt weiterhin uneindeutig und bedarf einer weiteren Abklärung in zukünftigen Studien. Ursache für die teilweise kontroversen Ergebnisse können vor allem die methodischen Differenzen sein. Besonders die unterschiedlichen Scoringsysteme als auch die vielfältigen Antikörper sind hier zu nennen.

4.2.3. K-ras – Qualitative und quantitative Expression Korrelation zu klinisch- pathologischen Parametern und Überlebenszeit

In der vorliegenden Studie wird die K-ras Expression im kolorektalen Karzinom untersucht. Es werden auch hier Quantität und Qualität der immunhistochemischen Färbung im Zentrum und in der Randzone des Tumors (Invasionsfront), sowie im Bereich morphologisch intakter Mukosa erfasst.

Es handelte sich bei der K-ras Färbung um eine sehr starke Färbung. Im Tumorzentrum und an der Invasionsfront zeigten sich fast alle Tumorzellen K-ras positiv (Invasionsfront 93,5%, Tumorzentrum 89,5%). Im Gegensatz zur hohen Anzahl der angefärbten Zellen zeigte sich die Färbeintensität in beiden Lokalisationen eher mittelstark ausgeprägt. Komplette K-ras-negative Präparate waren weder in der Invasionsfront, noch im Tumorzentrum zu finden. Dies trat nur im entfernt liegenden Normalgewebe auf.

Die K-ras-Expression wurde ebenso wie die EGFR- und PTEN-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen verglichen.

Hierbei zeigte sich zwar eine signifikante Korrelation zwischen der K-ras-Expression sowohl im Tumorzentrum, als auch in der Invasionsfront ($p= 0,029$ bzw. $p=0,049$) und dem Geschlecht. Dieses Ergebnis sollte jedoch kritisch hinterfragt werden, da die Gruppen der weiblichen bzw. männlichen Patienten stark voneinander abweicht ($n=82$ bzw. 119). Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und K-ras-Expression konnte in keiner Studie nachgewiesen werden (Zhang et al. 1998, Beranek et al. 1999, Okulczyk 2004).

Außerdem konnte in der hier vorliegenden Studie ein signifikanter Zusammenhang zwischen der K-ras-Expression und der Lokalisation ($p=0.007$) beobachtet werden. Eine starke K-ras-Färbung fand sich besonders im Colon transversum und Colon descendens (bei ca. 90%); eine mittelstarke Färbung wurde besonders häufig im Rektum nachgewiesen.

Zu dieser Erkenntnis gelangen auch Okulczyk et al. 2004, in ihrer Studie wurde eine erhöhte K-ras-Proteinexpression im linken Kolon erwiesen.

Andere Studien hingegen können unser Ergebnis nicht bestätigen (Zhang et al. 1998, Beranek et al. 1999, Tortola et al. 1999, Esteller et al. 2001, Milano et al. 2008, Morrin et al. 1994).

In den oben genannten Studien wurde ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der K-ras-Expression und weiteren klinisch-pathologischen Parametern wie beispielsweise den TNM-Stadien, dem Grading oder den UICC-Stadien. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der hier vorliegenden immunhistochemischen Studie überein.

Einzigste Ausnahme besteht in dem Nachweis einer Korrelation zwischen der K-ras Färbeintensität an der Invasionsfront und dem pT-Stadium in der hier vorliegenden immunhistochemischen Studie ($p=0,014$).

Außerdem besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der K-ras-Expression und der Blutgefäßinfiltration ($p=0,033$). Dieses Ergebnis sollte jedoch kritisch bewertet werden, da die gegenübergestellten Gruppen der Blutgefäß-positiven bzw. -negativen stark variierte ($n=148$ zu 53).

Tanaka et al. konnten 1994 in ihrer Studie zwar ebenfalls eine Korrelation der K-ras-Expression und der Blutgefäßinfiltration belegen, eine Korrelation zwischen K-ras-Expression und Lymphgefäßinfiltration konnte dort allerdings ebenso wenig nachgewiesen werden. Tortola et al. 1999 zeigten weder bezüglich Blut- noch Lymphgefäßinfiltration eine klinische Signifikanz. Zu diesem Schluss kamen auch

Esteller et al. 2001. Die Rolle der K-ras-Expression in Bezug auf die Blut-/Lymphgefäßinfiltration kann daher aufgrund der nicht ausreichenden und widersprüchlichen Studienlage derzeit nicht abschließend bewertet werden.

Neben den klinisch-pathologischen Parametern wurde in dieser Studie der Zusammenhang von K-ras und der Überlebenszeit untersucht. Bezüglich der Überlebenszeit finden sich in der Literatur teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse.

In der groß angelegten RASCAL Studie von Andreyev et al. 1998 wurde nachgewiesen, dass K-ras-Mutationen mit einer schlechteren Prognose verbunden sind. Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch Conlin et al. 2005 und Cerottini et al. 1998. Andere Studien dagegen konnten keinen signifikanten Zusammenhang finden und lehnen eine Abhängigkeit von K-ras-Expression und schlechterer Überlebenszeit aufgrund mangelnder Signifikanz der Daten ab. (Markowitz et al. 1995 und Morrin et al. 1994). Zu diesem Schluss kommt auch die hier vorliegende Arbeit.

Aufgrund der geringen Anzahl von immunhistochemischen Studien scheint eine endgültige Beurteilung der Bedeutung von K-ras im kolorektalen Karzinom hinsichtlich der Prognose schwierig. Probleme der Vergleichbarkeit ergeben sich aufgrund der unterschiedlichen Patientenkollektive, den variierenden Detektionsmethoden als auch durch Unterschiede in analytischen Prozessen.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört aktuell zu den häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Um die Therapie von kolorektalen Karzinomen zu optimieren, ist es wichtig die Kenntnisse der molekularen Veränderungen in der Karzinogenese weiter zu vertiefen. Ebenso von großem Interesse sind neue Bewertungskriterien, die eine verbesserte Prognosevoraussage und Therapieplanung ermöglichen.

Eine veränderte EGFR-Expression bzw. ein veränderter, vom EGFR ausgehender Signalweg scheint im kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle zu spielen.

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Pathway sowie der PI3K/PTEN/AKT-Pathway sind zwei wichtige Downstream-Faktoren des EGF-Rezeptors. Sie regulieren neben Zellwachstum und Zelldifferenzierung auch die Apoptose.

Die Rolle ihrer Expression für die Progression und Prognose des kolorektalen Karzinoms wurde in zahlreichen Studien untersucht, bisher wurden aber mögliche Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Untersuchung wurden Tissue-Microarrays von 201 kolorektalen Adenokarzinomen hergestellt, die sowohl Tumorzentrum, als auch Invasionsfront repräsentativ erfassen. Nach einem immunhistochemischen Nachweis der Proteine EGFR, PTEN und K-ras mit Hilfe des EnVision/HRP-Systems (DakoCytomation), wurden die Präparate mikroskopisch ausgewertet und mit klinisch-pathologischen Parametern sowie der 5-Jahres-Überlebenszeit korreliert.

Die Anfärbarkeit für EGFR-, PTEN- als auch für K-ras zeigte sich unabhängig von Invasionsfront und Tumorzentrum in der Mehrzahl der Präparate.

Eine starke EGFR-Expression im Tumorzentrum korrelierte mit der Lokalisation (bevorzugt proximales Kolon) und dem UICC-Stadium bzw. dem Grading.

Dagegen korrelierte eine starke K-ras-Immunreaktivität mit der lokalen Tumorprogression (pT), ebenso wie mit der Tumorlokalisierung (distales Colon). Weder EGFR noch K-ras korrelierten mit der 5-Jahres-Überlebensrate.

Die Mehrzahl der Präparate zeigte sich PTEN-positiv, Unterschiede im Ausprägungsgrad bezüglich Invasionsfront und Tumorzentrum konnten ebenso wenig wie bei EGFR und K-ras gefunden werden. Belegt werden konnte allerdings eine Korrelation zwischen niedriger PTEN-Expression im Tumorzentrum und niedrigem UICC-Stadium. Eine reduzierte PTEN-Expression im Tumorzentrum war mit einem signifikant besseren Überleben in uni- wie multivariater Analyse assoziiert.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abubaker, J. et al. P. Bavi, S. Al-Harbi, M. Ibrahim, A. K. Siraj, N. Al-Sanea, A. Abduljabbar, L. H. Ashari, S. Alhomoud, F. Al-Dayel, S. Uddin, and K. S. Al-Kuraya** Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene*. 27 (25): 3539-45 (2008).
2. **Amado RG, W.M., Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD.** Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 26(10):1626-34. (2008).
3. **Andreyev, H.J. et al.** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*. 90 (9): 675-84 (1998).
4. **Antonacopoulou, A.G. et al.** EGFR, HER-2 and COX-2 levels in colorectal cancer. *Histopathology*. 53 (6): 698-706 (2008).
5. **B, H.** Akute Nebenwirkung unter Therapie mit Biologics: Wie und Warum? *Hautarzt* 59:438-438. (2008).
6. **Bat, L. et al.** Colorectal adenomatous polyps and carcinoma in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews in Israel. *Cancer*. 58 (5): 1167-71 (1986).
7. **Beranek, M. et al.** A relationship between K-ras gene mutations and some clinical and histologic variables in patients with primary colorectal carcinoma. *Clin Chem Lab Med*. 37 (7): 723-7 (1999).
8. **Berlau, J. et al.** Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal Bioanal Chem*. 378 (3): 737-43 (2004).
9. **Bibeau, F. et al.** Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray. *Virchows Arch*. 449 (3): 281-7 (2006).
10. **Bingham, S.A. et al.** Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 361 (9368): 1496-501 (2003).
11. **Böcker, W.** Pathologie. *Urban & Fischer Bei Elsevier*. 3. (744) (2004).
12. **Bokemeyer C, B.I., Hartmann J, et al.** . KRAS Status and Efficacy of First-Line Treatment of Patients with Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) with FOLFOX with or without Cetuximab: The OPUS Experience. Proceedings from the 2008 annual meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO). . *Abstract #4000*. (2008).
13. **Bonneau, D. & Longy, M.** Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat*. 16 (2): 109-22 (2000).

14. **Bos, J.L.** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49 (17): 4682-9 (1989).
15. **Burmer, G.C. & Loeb, L.A.** Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (7): 2403-7 (1989).
16. **Cappuzzo F, V.-G.M., Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, Rimassa L, Rossi E, Ligorio C, Di Tommaso L, Holmes AJ, Toschi L, Tallini G, Destro A, Roncalli M, Santoro A, Jänne PA** Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 99(1):83-9. (2008).
17. **Castagnola, P. & Giaretti, W.** Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1756 (2): 115-25 (2005).
18. **Cerottini, J.P. et al.** The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg.* 175 (3): 198-202 (1998).
19. **Chan, A.O. et al.** CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol.* 160 (5): 1823-30 (2002).
20. **Chan, C.C. et al.** Colon cancer 15 years after ureterosigmoidostomy. *J Clin Oncol.* 26 (10): 1755-7 (2008).
21. **Chen, W.C. et al.** Survey of molecular profiling during human colon cancer development and progression by immunohistochemical staining on tissue microarray. *World J Gastroenterol.* 13 (5): 699-708 (2007).
22. **Cheng, K. & Raufman, J.P.** Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem Pharmacol.* 70 (7): 1035-47 (2005).
23. **Chung, D.C.** The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology.* 119 (3): 854-65 (2000).
24. **Chung, D.C. & Rustgi, A.K.** The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 138 (7): 560-70 (2003).
25. **Ciardello F, T.G.** A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7:2958-70. (2001).
26. **Cohen, L.A.** Diet and cancer. *Sci Am.* 257 (5): 42-8 (1987).
27. **Cohen, S.J. et al.** Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer--more than skin deep. *J Clin Oncol.* 23 (23): 5374-85 (2005).
28. **Colakoglu, T. et al.** Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *Am J Surg.* 195 (6): 719-25 (2008).

29. **Compton, C.C. et al.** Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 124 (7): 979-94 (2000).
30. **Conlin, A. et al.** The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* 54 (9): 1283-6 (2005).
31. **Cross, A.J. et al.** A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med.* 4 (12): e325 (2007).
32. **Cruz-Correa, M. & Giardiello, F.M.** Familial adenomatous polyposis. *Gastrointest Endosc.* 58 (6): 885-94 (2003).
33. **Cunningham D, H.Y., Siena S, Khayat D, Bleiberg H** Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. . *N Engl J Med* 351:337-45. (2004).
34. **De Roock W, P.H., De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S** KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. . *Ann Oncol.* 9(3):508-15. (2008).
35. **Di Nicolantonio F, M.M., Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A** Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26(35):5705-12. (2008).
36. **Eide, T.J.** Remnants of adenomas in colorectal carcinomas. *Cancer.* 51 (10): 1866-72 (1983).
37. **Ellis, C.A. & Clark, G.** The importance of being K-Ras. *Cell Signal.* 12 (7): 425-34 (2000).
38. **Esplen, M.J. et al.** Colorectal cancer survivors undergoing genetic testing for hereditary non-polyposis colorectal cancer: motivational factors and psychosocial functioning. *Clin Genet.* 72 (5): 394-401 (2007).
39. **Esplen, M.J. et al.** The FAP self-concept scale (adult form). *Fam Cancer.* 8 (1): 39-50 (2009).
40. **Esteller, M. et al.** K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 19 (2): 299-304 (2001).
41. **Fearon, E.R. & Vogelstein, B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61 (5): 759-67 (1990).
42. **Flood, A. et al.** Dietary patterns as identified by factor analysis and colorectal cancer among middle-aged Americans. *Am J Clin Nutr.* 88 (1): 176-84 (2008).

43. **Fuchs, C.S. et al.** Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med.* 340 (3): 169-76 (1999).
44. **Gatalica, Z. & Torlakovic, E.** Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer.* 7 (1): 15-26 (2008).
45. **Geido, E. et al.** Combined DNA flow cytometry and sorting with k-ras2 mutation spectrum analysis and the prognosis of human sporadic colorectal cancer. *Cytometry.* 50 (4): 216-24 (2002).
46. **Ghadirian, P. et al.** Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer.* 80 (5): 858-64 (1997).
47. **Gillen, C.D. et al.** Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut.* 35 (11): 1590-2 (1994).
48. **Giovannucci, E. & Michaud, D.** The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology.* 132 (6): 2208-25 (2007).
49. **Giralt, J. et al.** Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 54 (5): 1460-5 (2002).
50. **Goldstein, N.S. & Armin, M.** Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer.* 92 (5): 1331-46 (2001).
51. **Greene, F.L. & Sobin, L.H.** The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin.* 58 (3): 180-90 (2008).
52. **Grünwald V, H.M.** Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer* 95:851-67 (2003).
53. **Guan, R.J. et al.** Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology.* 116 (5): 1063-71 (1999).
54. **Guanti, G. et al.** Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. *Hum Mol Genet.* 9 (2): 283-7 (2000).
55. **Herbst, R.S.** Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59 (2 Suppl): 21-6 (2004).
56. **Herold, G.** Chronisch entzündliche Darmerkrankungen 430 (2007).
57. **Huang, A. & McPherson, G.A.** Colonic carcinoma after ureterosigmoidostomy. *Postgrad Med J.* 76 (899): 579-81 (2000).

58. **Ilyas, M. et al.** Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer.* 35 (14): 1986-2002 (1999).
59. **Jass, J.R. & Morson, B.C.** Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 40 (9): 1016-23 (1987).
60. **Jass JR, S.L.** WHO Histological Typing of Intestinal Tumours. *Springer Verlag* (2nd): 32-33 (1989).
61. **Jass, J.R.a.B.C.M.** Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 40(9): p. 1016-23. (1987).
62. **Karameris, A. et al.** Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract.* 189 (2): 133-7 (1993).
63. **Karapetis CS, K.-F.S., Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR** K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 359(17):1757-65. (2008).
64. **Khorana, A.A. et al.** Vascular endothelial growth factor, CD68, and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with Stage II and Stage III colon carcinoma: a role for the host response in prognosis. *Cancer.* 97 (4): 960-8 (2003).
65. **Kinzler, K.W. & Vogelstein, B.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87 (2): 159-70 (1996).
66. **Kinzler KW, V.B.** Familiar cancer syndromes: the role of caretakers and gatekeepers *The genetic basis of human cancer.* New York, *Mc Graw-Hill:* 209-210 (2002).
67. **Kluftinger, A.M. et al.** Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol.* 1 (1): 97-105 (1992).
68. **Koch, R.I.** Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. *Robert Koch Institut.* 6. überarbeitete Auflage: 34-37 (2008).
69. **Koenders, P.G. et al.** Epidermal growth factor receptor levels are lower in carcinomatous than in normal colorectal tissue. *Br J Cancer.* 65 (2): 189-92 (1992).
70. **Koretz, K. et al.** Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 416 (4): 343-9 (1990).

71. **Kuhnle, G.G. & Bingham, S.A.** Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 35 (Pt 5): 1355-7 (2007).
72. **Kullmann, F.** Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. *Internist* 44: 254-267 (2003).
73. **Leitch, E.F. et al.** Comparison of the prognostic value of selected markers of the systemic inflammatory response in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 97 (9): 1266-70 (2007).
74. **Leslie, N.R. & Downes, C.P.** PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J.* 382 (Pt 1): 1-11 (2004).
75. **Lièvre A, B.J., Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P** KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 26(3):374-9. (2008).
76. **Markowitz, S. et al.** Mutant K-ras oncogenes in colon cancers Do not predict Patient's chemotherapy response or survival. *Clin Cancer Res.* 1 (4): 441-5 (1995).
77. **Marsh, D.J. et al.** Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet.* 16 (4): 333-4 (1997).
78. **Mayer, A. et al.** The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer.* 71 (8): 2454-60 (1993).
79. **McKay, J.A. et al.** Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer.* 38 (17): 2258-64 (2002).
80. **McMenamin, M.E. et al.** Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 59 (17): 4291-6 (1999).
81. **Mehrkhani, F. et al.** Prognostic factors in survival of colorectal cancer patients after surgery. *Colorectal Dis.* 11 (2): 157-61 (2009).
82. **Mellemkjaer, L. et al.** Crohn's disease and cancer risk (Denmark). *Cancer Causes Control.* 11 (2): 145-50 (2000).
83. **Mendelsohn J, B.J.** Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 1:2787-99. (2003).
84. **Messa, C. et al.** EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol.* 37 (3): 285-9 (1998).

85. **Milano, G. et al.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 19 (12): 2033-8 (2008).
86. **Minsky, B.D. & Cohen, A.M.** Blood vessel invasion in colorectal cancer--an alternative to TNM staging? *Ann Surg Oncol.* 6 (2): 129-30 (1999).
87. **Morrin, M. et al.** Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance. *Gut.* 35 (11): 1627-31 (1994).
88. **Morson, B.C.** Evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer.* 34 (3): suppl:845-9 (1974).
89. **Nagahara, H. et al.** Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11 (4): 1368-71 (2005).
90. **Nelen, M.R. et al.** Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet.* 6 (8): 1383-7 (1997).
91. **Nicholson, R.I. et al.** EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 37 Suppl 4: S9-15 (2001).
92. **Normanno N, B.C., De Luca A, Maiello MR, Salomon DS** . Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10:1-21 (2003).
93. **Obrand, D.I. & Gordon, P.H.** Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. *Br J Surg.* 85 (2): 246-8 (1998).
94. **Okulczyk, B. et al.** Clinical usefulness of K-RAS mutation detection in colorectal cancer and in surgical margins of the colon. *Rocz Akad Med Bialymst.* 49 Suppl 1: 52-4 (2004).
95. **Parkin D. Max, M.F.B.J.F.P.P.** Global Cancer Statistics 2002. *CA A Cancer Journal for Clinicians.* 55 (2) (2005).
96. **Pischon, T. et al.** Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst.* 98 (13): 920-31 (2006).
97. **Porebska, I. et al.** Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol.* 21 (2): 105-15 (2000).
98. **Radinsky, R. et al.** Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 1 (1): 19-31 (1995).
99. **Rychahou, P.G. et al.** Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. *Ann Surg.* 243 (6): 833-42; discussion 843-4 (2006).

100. **Saal, L.H. et al.** PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 65 (7): 2554-9 (2005).
101. **Saeki, T. et al.** Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas. *Jpn J Clin Oncol.* 25 (6): 240-9 (1995).
102. **Salomon, D.S. et al.** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 19 (3): 183-232 (1995).
103. **Saltz LB, M.N., Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ** Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. . *J Clin Oncol* 22:1201-8. (2004).
104. **Samowitz, W.S. et al.** The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology.* 121 (4): 830-8 (2001).
105. **Sanchez-Pernaute, A.** [Bile secretion -- at the crossroads of colorectal carcinogenesis]. *Rev Esp Enferm Dig.* 99 (9): 487-90 (2007).
106. **Sansal, I. & Sellers, W.R.** The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol.* 22 (14): 2954-63 (2004).
107. **Sawai, H. et al.** Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival. *BMC Gastroenterol.* 8: 56 (2008).
108. **Schlessinger, J.** Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 110 (6): 669-72 (2002).
109. **Schmiegel, W.H.** [Oncogenes and tumor suppressor genes: genetic changes mark the adenoma-carcinoma sequence]. *Internist (Berl).* 32 (6): 315-20 (1991).
110. **Shao, T. & Yang, Y.X.** Cholecystectomy and the risk of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 100 (8): 1813-20 (2005).
111. **Shia, J. et al.** Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 18 (10): 1350-6 (2005).
112. **Simpson, L. & Parsons, R.** PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 264 (1): 29-41 (2001).
113. **Sobin LH, W.C.** TNM Classification of Malignant Tumours. *UICC International Union Against Cancer.* 6th Edition 72-76 (2002).
114. **Spano, J.P. et al.** Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* 16 (1): 102-8 (2005).

115. **Steele, R.J. et al.** Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg.* 77 (12): 1352-4 (1990).
116. **Stintzing S, H.V., Jung A, Moosmann N, Hiddemann W, Kirchner T** Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern. *Dtsch Arztebl.* 106(12):262-6. (2009).
117. **Sulis, M.L. & Parsons, R.** PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 13 (9): 478-83 (2003).
118. **Takayama, T. et al.** Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 41 (3): 185-92 (2006).
119. **Tanaka, M. et al.** Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J Surg Oncol.* 57 (1): 57-64 (1994).
120. **Tang, J.M. et al.** Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer.* 51 (2): 181-91 (2006).
121. **Tejpar, S. & Van Cutsem, E.** Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 16 (2): 171-85 (2002).
122. **Tong, W.M. et al.** Epidermal growth factor receptor expression in primary cultured human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer.* 77 (11): 1792-8 (1998).
123. **Toriola, A.T. et al.** Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study. *Eur J Epidemiol.* 23 (6): 395-401 (2008).
124. **Tortola, S. et al.** p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 17 (5): 1375-81 (1999).
125. **Tsunoda, A. et al.** Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. *Anticancer Res.* 17 (1B): 729-32 (1997).
126. **Van Cutsem E, I.L., G. D'haens.** KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. Proceedings from the 2008 annual meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO). *Abstract #2.* (2008).
127. **Vasen, H.F. et al.** Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut.* 57 (5): 704-13 (2008).
128. **Verla-Tebit, E. et al.** Cigarette smoking and colorectal cancer risk in Germany: a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 119 (3): 630-5 (2006).

129. **Vogelstein, B. et al.** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319 (9): 525-32 (1988).
130. **Voldborg, B.R. et al.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* 8 (12): 1197-206 (1997).
131. **Wang, Z.J. et al.** Genetic pathways of colorectal carcinogenesis rarely involve the PTEN and LKB1 genes outside the inherited hamartoma syndromes. *Am J Pathol.* 153 (2): 363-6 (1998).
132. **Whittemore, A.S. et al.** Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst.* 82 (11): 915-26 (1990).
133. **Winawer, S.J. et al.** Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 329 (27): 1977-81 (1993).
134. **Wittekind, C., et al.** TNM residual tumor classification revisited. *Cancer.* 94(9) (p. 2511-6) (2002).
135. **Wittekind, C. et al.** TNM residual tumor classification revisited. *Cancer.* 94 (9): 2511-6 (2002).
136. **Worthley, D.L. et al.** Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 13 (28): 3784-91 (2007).
137. **Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X.** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 (2): 127-37 (2001).
138. **Yasui, W. et al.** Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res.* 48 (1): 137-41 (1988).
139. **Zhang, H. et al.** K-ras mutations in colorectal adenocarcinomas and neighbouring transitional mucosa. *Eur J Cancer.* 34 (13): 2053-7 (1998).
140. **Zhou, X.P. et al.** PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* 161 (2): 439-47 (2002).
141. **Zisman, T.L. & Rubin, D.T.** Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 14 (17): 2662-9 (2008).
142. **Zlobec, I. & Lugli, A.** Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J.* 84 (994): 403-11 (2008).
143. **Zlobec, I. et al.** A simple and reproducible scoring system for EGFR in colorectal cancer: application to prognosis and prediction of response to preoperative brachytherapy. *Br J Cancer.* 96 (5): 793-800 (2007).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Luczak, M. Christin
Geburtsdaten	28.09.1983 in Datteln
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

2001 – 2003	Abitur am Theodor-Heuss Gymnasium, Waltrop
10/2003	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
09/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2008 – 06/2009	Praktisches Jahr an der Uniklinik Düsseldorf und am Mater Dei Hospital, Msida, Malta Wahlfach Pädiatrie
10/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2009	Approbation
seit Dezember 2009	Assistenzärztin im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Helios Kliniken Wuppertal

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meinem Promotionvorhaben begleitet und bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. S.E. Baldus für die Überlassung des Themas sowie die stets freundliche Betreuung und Unterstützung.

Frau Prof. Dr. med. E. Bollschweiler für ihre kompetente Hilfe und Beratung hinsichtlich der statistischen Datenauswertung.

Frau S. Schreckenberg und **Frau Schneeloch** für die freundliche und kompetente Zusammenarbeit bei dem praktischen Teil dieser Arbeit.

Katrin Reinwald für die moralische Unterstützung sowie die schöne, gemeinsame Zeit im Labor und während der gesamten Studienzeit.

Meiner Schwester **Katharina Luczak** für das kritische Korrekturlesen.