

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 Hif-1 α
und VEGF 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
Katrin Christina Reinwald

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: Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz

Für die Eltern und Großeltern,
für Sebastian und Renate
und für Andreas

Inhaltsverzeichnis

- 1. EINLEITUNG**
- 1.1 Kolorektale Karzinome**
 - 1.1.1 Epidemiologie
- 1.2 Ätiologie und Pathogenese**
- 1.3 Lokalisation, Makroskopie, Histologie**
 - 1.3.1 Makroskopie
 - 1.3.2 Histologische WHO Klassifikation der Tumore des Kolons und Rektums
- 1.4 Grading / Staging**
 - 1.4.1. Histopathologisches Tumorigradung der UICC
 - 1.4.2 TNM-System und Stadieneinteilung der UICC (2002)
- 1.5 Tumorangiogenese und „Angiogenic Switch“**
- 1.6 Der „Angiogenic Switch“**
- 1.7 Molekulare Kanzerogenese**
- 1.8 EGFR (Endothelial growth factor receptor)**
 - 1.8.1 Allgemeines
 - 1.8.2 EGFR und Tumorprogression
 - 1.8.3 Prognostische Bedeutung von EGFR
 - 1.8.4 EGFR und therapeutische Optionen
- 1.9 VEGF (Vascular endothelial growth factor)**
 - 1.9.1 Allgemeines
 - 1.9.2 Regulation der VEGF Genexpression
 - 1.9.3 VEGF und Tumorprogression
 - 1.9.4 VEGF-Rezeptoren
 - 1.9.5 Prognostische Bedeutung von VEGF
- 1.10 Hif-1 (Hypoxia-inducible factor 1)**
 - 1.10.1 Allgemeines
 - 1.10.2 Hif-1 und Tumorprogression
 - 1.10.3 Prognostische Bedeutung von Hif-1
- 1.11 Zusammenhang von EGFR, VEGF und Hif-1 α**
- 1.12 Fragestellung**

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

2.2 Tissue microarray

2.2.1 Herstellung der Mikroarrays

2.3 Verwendete Antikörper

2.4 Immunhistochemische Methode

2.5 Färbung

2.5.1 EGFR- Färbeprotokoll

2.5.2 VEGF und Hif-1 α Färbeprotokoll, EnVision+ HRP (Fa.DAKO)

2.6 Mikroskopische Auswertung und statistische Analyse

3. ERGEBNISSE

3.1 Immunhistochemisches Expressionsmuster

3.2 Patientenkollektiv

3.2.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

3.2.2 Überlebensanalyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

3.3 Statistische Analyse der EGFR-Immunhistochemie

3.3.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und der Färbeintensität

3.3.2 Beziehung zwischen EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

3.3.3 Überlebensanalyse

3.4 Statistische Analyse der VEGF-Immunhistochemie

3.4.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität

3.4.2 Beziehung zwischen VEGF-Expression und klinisch-Pathologischen Parametern

3.4.3 Überlebensanalyse VEGF

3.5 Statistische Analyse der Hif-1 α -Immunhistochemie

3.5.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität

3.5.2 Beziehung zwischen Hif-1 α -Expression und klinisch-pathologischen Parametern

3.5.3 Überlebensanalyse Hif-1 α

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Identifizierung von unabhängigen Prognosefaktoren bei dem kolorektalen Karzinom

4.2 Zusammensetzung des Patientenkollektives

4.3 EGFR-Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

4.4 VEGF-Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

4.5 Hif-1 α -Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Kolorektale Karzinome

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen der Gegenwart. Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen für Männer auf 37.250 und für Frauen auf etwa 36.000 geschätzt. Mit 16,2 % bei den Männern und 17,5% bei den Frauen rangiert die Tumorlokalisation im Darm somit an 2. Stelle. Bei Männern liegt das Prostatakarzinom (mit 25,4%) an erster Stelle und bei Frauen das Mammakarzinom (mit 27,8%). Am kolorektalen Karzinom erkranken Männer im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Im Allgemeinen steigt mit zunehmendem Alter das Risiko zu erkranken. Im Jahr 2004 starben 13.748 Männer und 14.034 Frauen allein in Deutschland am kolorektalen Karzinom. Es belegt den zweiten Platz aller Krebstodesfälle. An erster Stelle der Krebstodesfälle in Deutschland rangiert bei den Männern die Lunge und bei den Frauen die Brustdrüse (Robert-Koch-Institut, 2008).

Weltweit wurden im Jahr 2002 eine Million neue Kolon- und Rektumkarzinomfälle gezählt (9,4 % der weltweiten Gesamtzahl). Somit stellt das kolorektale Karzinom bei Männern den vierthäufigsten und bei Frauen den dritthäufigsten Tumor weltweit dar. Die höchsten Inzidenzraten lassen sich in Nord Amerika, Australien, Neuseeland, West Europa und bei Männern in Japan feststellen. Niedrige Inzidenzraten dagegen findet man in Afrika und Asien. Die südlichen Teile von Südamerika nehmen eine mittlere Position ein. In Studien mit Migranten wurde beobachtet, dass es durch Migration aus einem Gebiet mit geringem Risiko für ein kolorektales Karzinom in ein Gebiet mit hohem Risiko eines kolorektalen Karzinoms zu einem schnellen Anstieg der Inzidenzrate innerhalb der ersten Generation kommt (Parkin et al., 2005). Im Allgemeinen sind die Inzidenzraten, vor allem bei jüngeren Personen, in Gebieten mit eher niedrigem Darmkrebs-Risiko angestiegen, während sie sich in Gebieten mit hohem Risiko stabilisiert bzw. vermindert haben (Parkin et al., 2001).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Der Entstehungsprozess eines malignen Tumors aus einer normalen Kolon- bzw. Rektumschleimhaut ist begleitet von zahlreichen molekularen Veränderungen unterschiedlicher Ätiologie. In diesem Kontext richtet sich unter anderem ein großes Interesse auf die funktionelle Interaktion zwischen Nahrungsmitteln und Genexpression.

Begründet ist dieses Interesse in der bedeutenden klinischen Relevanz von Erkenntnissen auf diesem Gebiet (Lipkin et al., 1999). Bis heute wurde schon eine Vielzahl von Publikationen über den Zusammenhang zwischen Ernährungsgewohnheiten und dem Auftreten des kolorektalen Karzinoms bzw. Adenoms veröffentlicht. Zum Beispiel fand man in einer Fallkontrollstudie eine starke positive Assoziation zwischen Ölsäureaufnahme und dem Risiko eines kolorektalen Adenoms. Eine erhöhte Aufnahme von Ballaststoffen war hier mit einer mäßigen Verringerung des Adenomrisikos assoziiert (Mathew et al., 2004). Eine weitere Publikation beschreibt, dass rotes Fleisch und Fleisch, welches bei hohen Temperaturen zubereitet wird, mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Adenome einhergeht (Sinah et al., 2005). Auch die Ergebnisse von Flood et al., 2008, weisen darauf hin, dass Ernährungsmuster, welche durch eine geringe Aufnahme von Fleisch und Kartoffeln und durch häufigen Konsum von Früchten, Gemüse und fettreduzierten Nahrungsmitteln charakterisiert sind, mit einem verringerten Risiko für ein kolorektales Karzinom einhergehen. Allerdings können Daten von Fuchs et al. aus dem Jahr 1999 die Existenz eines bedeutenden protektiven Effektes von ballaststoffreicher Ernährung gegen das kolorektales Karzinom oder Adenom bei Frauen nicht unterstützen.

In den oben exemplarisch ausgewählten Publikationen wird deutlich, dass man zurzeit noch keine eindeutige Aussage über die protektive Wirkung von verschiedenen Nahrungsmitteln in Bezug auf das kolorektales Adenom und Karzinom tätigen kann. In den neueren Publikationen zeigt sich aber dennoch der Trend, dass durch eine gesunde, ausgewogene Ernährung eine Risikoreduktion möglich ist (Berlau et al., 2004). Einigkeit scheint auch über den Zusammenhang zwischen Fleischkonsum, insbesondere bei rotem Fleisch, und einem erhöhten Risiko für ein kolorektales Karzinom zu herrschen. Nicht nur die Ernährung spielt bei der Pathogenese eine Rolle, auch der körperliche Aktivitätsgrad zeigt Auswirkungen. So ist es möglich, durch körperliche Aktivität das Risiko für ein kolorektales Karzinoms zu senken. Verbringt man dagegen viel Zeit sitzend, ist dies assoziiert mit einem erhöhten Risiko für ein kolorektales Karzinom (Howard et al., 2008). Auch Alkoholkonsum steigert das Risiko eines kolorektalen Karzinoms (Toriola et al., 2008). Allerdings ist der karzinogene Effekt von Alkohol reduziert, wenn Wein im Alkoholkonsum enthalten ist (Pedersen et al., 2003).

Einen weiteren Risikofaktor für ein kolorektales Karzinom stellen die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen dar. Insbesondere Patienten mit einer langjährigen

schweren Colitis ulcerosa haben ein erhöhtes Risiko (Freeman et al., 2008). Laut Gillen et al., 1994, beträgt das kumulative Karzinomrisiko nach 20 Jahren sieben Prozent. Aber auch Patienten mit Morbus Crohn haben ein erhöhtes Risiko (Zisman et al., 2008). Hier differieren die Zahlen in der Literatur allerdings deutlich. Diese Unstimmigkeit kann darauf zurückgeführt werden, dass bei Patienten mit Morbus Crohn, häufig relativ früh in der Krankengeschichte, eine Kolektomie durchgeführt wird, um Symptome, welche sich schlecht medikamentös beherrschen lassen, zu therapieren (Gillen et al., 1994).

Neben dem sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinom findet man auch hereditäre Formen. Sie machen etwa 10% aller Fälle aus. Den größten Bekanntheitsgrad besitzt wohl das autosomal-dominant vererbte hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC; Lynch Syndrom). Es verursacht etwa 5-7% aller kolorektalen Karzinome und erhöht außerdem das Risiko für extrakolische Neoplasien (Abdel-Rahman et al., 2006). Eine Manifestation in jungen Jahren und eine überwiegende Tumorlokalisation im proximalen Kolon sind Charakteristika des HNPCC. Ursächlich liegen diesem Syndrom Mutationen in spezifischen DNA-Mismatch-Repair-Genen (MMR-Genen) zugrunde (vor allem MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) (Woods et al., 2007). Auch bei der FAP (familiären adenomatösen Polyposis) handelt es sich um ein hereditäres Syndrom. Weniger als 1% der kolorektalen Karzinome können auf die familiäre adenomatöse Polyposis zurückgeführt werden (Gatalica et al., 2008). Die FAP wird autosomal dominant vererbt und ist charakterisiert durch das sehr frühe Auftreten von hunderten kolorektalen Adenomen. Unbehandelt führen diese Adenome bis zum 35-40 Lebensjahr mit einer Wahrscheinlichkeit von fast 100% zum kolorektalen Karzinom (Galiatsatos et al., 2006). Ursächlich liegt hier eine Mutation im APC-Tumorsuppressor-Gen vor, welches auf dem Chromosom 5 (5q21-q22) lokalisiert ist (Bodmer et al., 1987; Esplen et al., 2008). Auch hier kommt es zu einer vermehrten Assoziation mit extrakolischen Karzinomen (Groen et al., 2008). Für das seltene autosomal-dominant vererbte Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) ist das Auftreten von Polypen des Gastrointestinaltrakts mit einem erhöhten kolorektalen Karzinomrisiko und Pigmentflecken auf Lippen- und Wangenschleimhaut charakteristisch (Boardman et al., 1998; Schulmann et al., 2008).

In einigen Fällen kann das kolorektale Karzinom auch iatrogen verursacht werden. So kommt es nach einer Ureterosigmoidostomie zu einem erhöhten kolorektalen Karzinom Risiko (Labow et al., 1979; Rivard et al., 1975). Ebenso kann eine Bestrahlung des kleinen Beckens zu einer Steigerung des Risikos führen (Black et al., 1965; Tsunoda et al., 1997).

1.3 Lokalisation, Makroskopie, Histologie

Etwa 60 % der Karzinome befinden sich im Rektum und 20-25 % im Colon sigmoideum. Damit sind über 80 % aller kolorektalen Karzinome im rektosigmoidalen Bereich lokalisiert (Böcker et al., 2004). In letzter Zeit scheint es allerdings zu einer Veränderung der Verteilung mit einem steigenden Anteil an proximalen Karzinomen zu kommen (1928 S. 107 WHO Kopie).

1.3.1 Makroskopie

Makroskopisch unterscheidet man schüsselförmig ulzerierende, polypoide und diffus-infiltrierende Wachstumsformen (Böcker et al., 2004).

1.3.2 Histologische WHO Klassifikation der Tumore des Kolons und Rektums

- *Adenokarzinome*

Von einem Adenokarzinom spricht man, wenn eine Invasion durch die Muscularis mucosae in die Submukosa stattgefunden hat. Läsionen, welche den morphologischen Kriterien eines Adenokarzinoms entsprechen, sich aber auf das Epithel beschränken oder nur die Lamina propria infiltriert haben, zeigen nahezu kein Risiko zu metastasieren. Diese Läsionen werden als „high-grade intraepithelial neoplasia“ oder „Adenokarzinom in situ“ oder „Intramukosale Neoplasie“ bezeichnet.

- *Muzinöse Adenokarzinome*

Adenokarzinome werden als muzinös bezeichnet, wenn > 50% der Läsion eine extrazelluläre Verschleimung aufweisen.

- *Siegelringzellkarzinome*

Adenokarzinome werden als Siegelringzellkarzinome bezeichnet, wenn > 50% der Tumorzellen intracytoplasmatisches Muzin enthalten. Charakteristisch für die typische Siegelringzelle ist eine große muzingefüllte Vakuole, welche den Zellkern verdrängt.

- *adenosquamöse Karzinome*

Reine adenosquamöse Karzinome sind sehr selten.

- *medulläre Karzinome*

- *undifferenzierte Karzinome*

- *kleinzellige Karzinome* (Hamilton et al., 2000)

1.4. Grading / Staging

1.4.1 Histopathologisches Tumorgrading der UICC (= International Union Against Cancer, 2002)

Tabelle 1: Histopathologisches Tumorgrading der UICC

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

1.4.2 TNM-System und Stadieneinteilung der UICC (2002)

1932 wurde von Dukes eine Klassifikation für Rektumkarzinome erarbeitet, die später auch Kolonkarzinome mit einbezog. Heute findet sie v.a. in den USA noch Verwendung, ansonsten ist sie aber weitgehend durch die TNM-Klassifikation abgelöst. Die Tumorausbreitung wird nach den Regeln der UICC für Kolon- und Rektumkarzinome einheitlich klassifiziert.

Die TNM-Klassifikation beschreibt die anatomische Ausdehnung des Tumors. Sie basiert auf der Annahme, dass Behandlungschance und Überlebenschance von der Ausdehnung des Primärtumors vom Fehlen oder Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen und vom Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen abhängig ist (Greene et al., 2008).

Tabelle 2: die TNM-Klassifikation

T = Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepitheliale Neoplasie oder Invasion der Lamina propria
T1	Tumorinfiltration in die Submucosa
T2	Tumorinfiltration in die Muscularis propria
T3	Tumorinfiltration durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das nicht peritonealisierte perikolische oder perirektale Gewebe
T4	Tumorinfiltration in andere Organe oder Strukturen und/oder Tumor perforiert das viszerale Peritoneum

N = Regionale Lymphknoten

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

M = Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen TNM-Klassifikation, UICC-Stadien und Dukes-Klassifikation (Stage Grouping)

UICC	T	N	M	Dukes
Stage 0	Tis	N0	M0	
Stage I	T1, T2	N0	M0	A
Stage II A	T3	NO	M0	B
II B	T4	NO	M0	B
Stage III A	T1, T2	N1	M0	C
III B	T3, T4	N1	M0	C
III C	Any T	N2	M0	C
Stage IV	Any T	Any N	M1	D

(Sobin et al, 2002; Ruf et al, 2005)

1.5 Tumorangiogenese und „Angiogenic Switch“

Schon vor mehr als einem Jahrhundert wurde ein Zusammenhang zwischen Tumoren und Blutgefäßen bemerkt (Thiersch et al., 1865; Goldman et al., 1907). Dann vergingen viele Jahre der Forschung, bis Judah Folkman im Jahr 1971 eine entscheidende Publikation veröffentlichte. Seine Publikation enthielt verschiedene gewichtige Hypothesen (Folkman et al., 1971).

1. So können laut seiner Publikation solide Tumoren nicht größer als 1-2 mm³ werden, ohne dass sie neue Blutgefäße benötigen, die Sauerstoff und Nährstoffe transportieren, um das weitere Tumorwachstum zu ermöglichen. Bis zu diesem Grenzwert können avaskuläre Tumore den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf über Diffusion decken. 2. Tumorzellen können, so vermutete er, diffusible angiogene Moleküle sezernieren. 3. Er

beschrieb ein Modell, bei dem es durch Blockade der Angiogenese zu einem Ruhezustand des Tumors kam. 4. Außerdem beschrieb er den Begriff der Antiangiogenese. 5. Er prophezeite die Entdeckung eines Angiogenese Inhibitors. 6. Weiterhin stellte er die These auf, dass ein Antikörper gegen Tumorangiosefaktoren (TAF) ein „Anti-Krebs“-Medikament sein könnte. Die Theorie, welche besagt, dass Tumorwachstum von der Angiogenese abhängig ist, und auch seine anderen Aussagen wurden in nachfolgenden Veröffentlichungen erweitert und ausgebaut. So leitete diese Publikation im New England Journal of Medicine 1971 die Angiogenese-Forschung ein.

Wie versorgt sich nun der Tumor mit ausreichend Nährstoffen? In der avaskulären Phase des Tumors werden die Tumorzellen durch Diffusion aus umliegenden Gefäßen ernährt. Wenn diese Diffusion aufgrund der weiteren Tumorexpansion nicht weiterhin für eine suffiziente Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sorgen kann, gibt es 4 verschiedene Möglichkeiten, um eine ausreichende Ernährung aufrecht zu erhalten (Bergers et al., 2003; Ribatti et al., 2003). Die erste und wichtigste Möglichkeit ist, den „angiogenic switch“ zu induzieren und damit die Angiogenese zu initiieren (siehe Kapitel 1.6 Der „Angiogenic Switch“). Es kommt zur Induktion von Endothelzellproliferation, Endothelzellmigration und zum Gefäß- „sprouting“. Neue Gefäße entstehen also durch Aussprossung. Außerdem entstehen zahlreiche Gefäße durch Invagination, d.h. durch Aufspaltung von einem Gefäß in zwei. Hierbei bildet sich das neue Gefäß im Lumen des bereits existierenden (Burri et al., 2004). Der zweite Weg, um eine ausreichende Versorgung der Tumorzellen aufrecht zu erhalten, ist das Wachstum entlang bereits existierender Gefäße. Pezella war einer der ersten, der dieses Phänomen anhand des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms beschrieb (Pezella et al., 1997). Diese Variation der Blutversorgung macht eine zusätzliche Angiogenese überflüssig. Klassisches Beispiel hierfür ist das Astrozytom (Bergers et al., 2003). Die dritte Möglichkeit ist die sog. Vaskulogenese, d.h. vom Knochenmark abgeleitete Vorläuferzellen bilden die neuen Gefäße (Rafii et al., 2002). Der vierte Weg ist ein Prozess, der als „vascular mimicry“ bezeichnet wird und dessen Relevanz noch Gegenstand einiger Diskussionen ist. Hier wird das Lumen nicht von Endothelzellen, sondern von Tumorzellen selber geformt. Dieses Phänomen wurde bei malignen Melanomen entdeckt (Maniotis et al., 1999; Hendrix et al., 2003). In ein und demselben Tumor können nebeneinander mehrere dieser Strategien gefunden werden.

1.6 Der „Angiogenic Switch“

Neben zahlreichen genetischen und epigenetischen Veränderungen während der Tumorentstehung spielt der sog. „Angiogenic Switch“ eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression und Ausbreitung (Hanahan et al., 2000). Er ist der Mechanismus, der die Angiogenese induziert und aufrechterhält. Denn genau wie nicht tumoröses Gewebe benötigen auch die Tumorzellen eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff, Metaboliten und einen effektiven Weg ihre Abfallstoffe zu beseitigen (Papetti et al., 2002). Allerdings differieren die Ansprüche zwischen verschiedenen Tumortypen und können sich im Verlauf der Tumorprogression auch verändern (Hlatky et al., 2002). 1996 stellten Hanahan und Folkman die Hypothese auf, dass der „Angiogenic Switch“ durch das Verhältnis von pro-angiogenen zu anti-angiogenen Faktoren bestimmt wird. Die Angiogenese wird entweder durch eine Hochregulation von pro-angiogenen Faktoren oder durch Herabregulation der anti-angiogenen Faktoren oder auch durch beides reguliert. In vielen nachfolgenden Publikationen wurde diese Theorie bestätigt. Als bedeutender angiogener Faktor wurde der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) entdeckt (siehe Kapitel 1.9 VEGF).

Der „Angiogenic Switch“ kann in verschiedenen Stadien der Tumorprogression entstehen, abhängig vom Tumortyp und der Umgebung. Staton et al., 2007, fand heraus, dass bei der Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms der Angiogenic Switch schon beim Adenom stattfindet. Die angiogene Aktivität von Tumoren korreliert nicht zwangsläufig mit der Tumoraggressivität. Trotzdem kann sie einen prognostischen Faktor für bestimmte Tumortypen darstellen (Bergers et al., 2003).

1.7 Molekulare Kanzerogenese

An der Entstehung kolorektaler Karzinome sind verschiedene molekulare Mechanismen beteiligt. Aufgrund eines unterschiedlichen Entstehungsprozesses unterscheidet man zwei verschiedene Typen von kolorektalen Karzinomen.

Die erste Gruppe wird als LOH-positiv bezeichnet („loss of heterozygosity“). Hier entstehen die Tumore auf dem sog. Tumorsuppressor- Pathway. Mehr als zwei Drittel der kolorektalen Karzinome gehören zu dieser Gruppe (Grizzle et al., 2001; Laurent-Puig et al., 1999). LOH-positive Tumore aktivieren ihren Signalweg durch eine Mutation im APC-Tumorsuppressorgen. Die APC-Mutation wurde als erstes von Fearon und Vogelstein bei der familiären adenomatösen Polyposis beschrieben.

Adenom -Karzinom -Sequenz

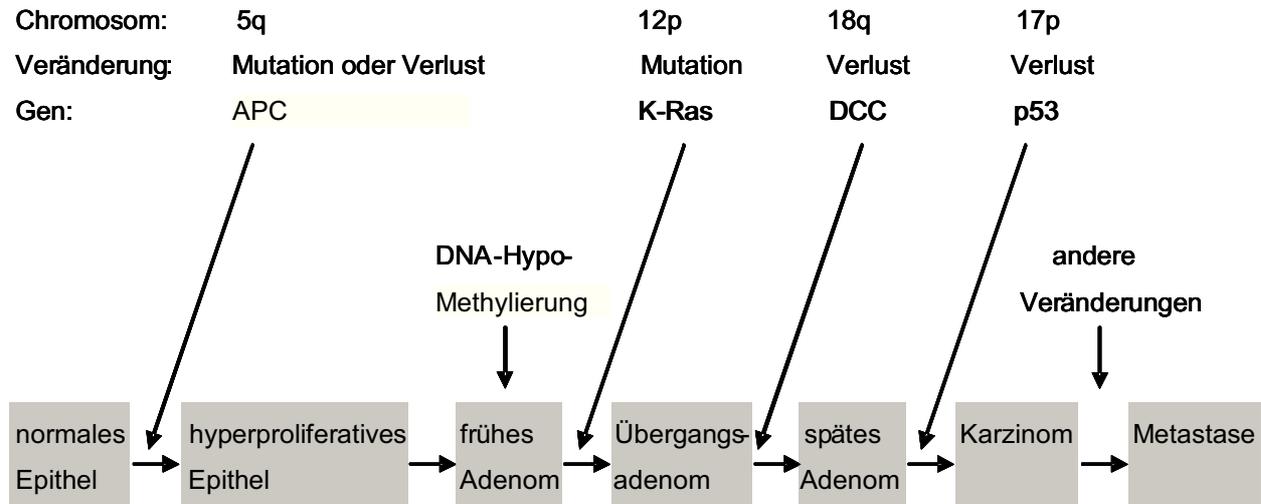


Abb.1.1 genetisches Modell der Tumorigenese, modifiziert nach Fearon und Vogelstein (1990).

Die Tumorigenese entsteht durch eine Serie von genetischen Veränderungen, welche Onkogene (ras) und Tumorsuppressorgene betreffen (insbesondere solche auf 5q, 17p und 16q). Den Patienten mit einer FAP wurde die Mutation auf Chromosom 5q vererbt. Auch bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen, die nicht an einer FAP leiden, kommt es in einem frühen Stadium zu einer Mutation im APC-Gen (Fearon et al., 1990).

Die zweite Gruppe kolorektaler Karzinome entsteht auf dem Boden des sog. Mutator-Pathways. Diese Karzinome werden als MSI-positive Tumore (Mikrosatelliteninstabile Tumore) bezeichnet und sind charakterisiert durch eine genetische Instabilität an Mikrosatelliten-Loci (Laurent-Puig et al., 1999). Im Unterschied zum Tumorsuppressor-Pathway kommt es hier nicht zur Akkumulation grober chromosomaler DNA-Schäden (Rüschoff et al., 1998). Der „Mutator Pathway“ trifft etwa auf 10-20% der kolorektalen Karzinome zu. Zu welchem Zeitpunkt die molekularen Veränderungen in der Dysplasie-Karzinom-Sequenz auftreten, ist bislang nicht geklärt. Allerdings tritt bei sporadischen Tumoren die MSI später in der Karzinogenese auf und ist deshalb bei Adenomen selten (<5%) anzutreffen (Rüschoff et al., 1995).

1.8 EGFR (Epidermal growth factor receptor)

1.8.1 Allgemeines

1984 wurde der EGF-Rezeptor erstmals beschrieben (Ullrich et al., 1984). Er gehört zu der EGF-Rezeptor-Familie, die aus 4 verschiedenen Rezeptoren besteht: EGFR/ErbB1, HER-2/ErbB2, HER-3/ErbB3 und HER-4/ErbB4 (Yarden et al., 2001a).

Gemeinsam ist diesen Rezeptoren, dass sie sich aus einer extrazellulären Domäne, welche für die Bindung des Liganden verantwortlich ist, einer transmembranären Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität zusammensetzen. Eine Ausnahme stellt hier allerdings der ErbB3 Rezeptor dar, da dieser aufgrund einer Mutation keine Tyrosinkinase-Aktivität in seiner zytoplasmatischen Domäne besitzt (Wells et al., 1999).

Bindet nun ein Ligand an die extrazelluläre Domäne, so kommt es zur Dimerisierung des Tyrosinkinase-Rezeptors. Hierbei kann es sowohl zur Formation von Homodimeren (z.B. EGFR+EGFR) als auch von Heterodimeren kommen (z.B. EGFR+ErbB3). Durch die Dimerisierung wird die Tyrosinkinase intrazellulär aktiviert und führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors (Alroy et al., 1997). An diese Phosphotyrosinreste können nun verschiedenste Proteine andocken und dadurch aktiviert werden. Es kann nun zu einer Reihe von intrazellulären Signalkaskaden kommen. Diese Signalkaskaden kann man in 2 Hauptwege einteilen: Den traditionellen Signalweg und den neueren direkten Signalweg. Bei dem traditionellen Weg kommt es nach ligandeninduzierter Phosphorylierung der Tyrosylreste zu einer intrazellulären Signalkaskade bis in den Zellkern. Hier sind die wichtigsten Kaskaden: PLC- γ -CaMK/PKC, Ras-Raf-MAPK, PI-3K-Akt-GSK und STATs. Bei dem neuen Weg kommt es zu einem Transport des EGFR von der Zelloberfläche in den Zellkern und zu einer Transkriptionsregulation von Zielgenen (Lo et al., 2006). Bisher sind eine Reihe von Liganden mit unterschiedlicher Affinität zu den einzelnen Rezeptoren bekannt: EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor alpha), Amphiregulin, HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor), Betacellulin, Epiregulin und Neuregulins 1-4 (Atalay et al., 2003).

1.8.2 EGFR und Tumorprogression

Der EGF-Rezeptor ist in vielen verschiedenen menschlichen Tumoren exprimiert bzw. vermehrt exprimiert. Unter anderem im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, im Mamma, Kopf- und Nacken-, Magen-, kolorektalen-, Ösophagus-, Prostata-, Blasen-, Nieren-, Pankreas- und Ovarialkarzinom (Salomon et al., 1995). Die tumorstimulierende Wirkung von EGFR kann über unterschiedliche Mechanismen erfolgen. 1. Autokrine Stimulation. Die Tumorzellen exprimieren nicht nur EGFR, sondern auch gleichzeitig Wachstumsfaktoren, die an den EGFR binden und so zu einer kontinuierlichen Autostimulation führen. 2. EGFR-Überexpression. 3. Koexpression mit amplifiziertem HER2. Es kommt zur Kooperation des EGFR mit dem amplifizierten HER2, wie zum Beispiel beim HER2-überexprimierenden Mammakarzinom. Dadurch kann die Weiterleitung von Signalen über den EGFR verstärkt werden. 4. EGFR-Mutationen. Durch verschiedene Mutationen kann es zum Beispiel zu einem verminderten Abbau oder zu einer verstärkten Aktivierung des Rezeptors kommen (Yarden et al., 2005). Die Aktivierung des EGFR führt zu verschiedenen Effekten: Zellproliferation, Migration, Angiogenese und Hemmung der Apoptose (Ciardiello et al., 2001; Yarden et al., 2001b; Musallam et al., 2001).

1.8.3 Prognostische Bedeutung von EGFR

In den letzten 20 Jahren wurden in verschiedenen Tumoren erhöhte Werte von EGFR und seinen Liganden nachgewiesen. In vielen Fällen scheint diese Veränderung ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese und eine essentielle Triebkraft für aggressives Verhalten von Tumorzellen zu sein (Nicholson et al., 2001).

Nicholson und seine Kollegen verglichen 2001 über 200 veröffentlichte Studien zu EGFR und seiner prognostischen Aussagekraft in Bezug auf Überlebenszeit und die rezidivfreie Zeit. Sie fanden heraus, dass EGFR als überzeugender prognostischer Indikator für Kopf- und Nacken-, Ovarial-, Cervix-, Blasen- und Ösophagustumoren zu werten ist, da in 70 % der Studien eine erhöhte EGFR-Expression mit einem reduzierten rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert war (Nicholson et al., 2001). Auch zum kolorektalen Karzinom und der EGFR-Expression sind bis heute einige Publikationen veröffentlicht worden. Hier sind die Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung allerdings widersprüchlich. Einige Studien fanden eine signifikante Korrelation zwischen EGFR oder EGFR-Expression und Dukes Klassifikation, Differenzierung, TNM und Prognose (Giacomelli et al., 2003, Khorana et

al., 2003; Spano et al., 2005; Zlobec et al., 2007; All et al., 2007) und andere Studien konnten diese Korrelation nicht bestätigen (Langlois et al., 1997; Saeki et al., 1995; Koretz et al., 1990; Doger et al., 2006).

1.8.4 EGFR und therapeutische Optionen

Die ersten EGFR-Antikörper wurden in den 80er Jahren entwickelt. In der klinischen Anwendung finden sich zwei Klassen von EGFR-Antagonisten, welche erfolgreich in Phase-3-Studien getestet wurden (Normanno et al., 2003; Ciardiello et al., 2001; Grünwald et al., 2003; Mendesohn et al.; 2003). Die eine Klasse der EGFR-Antagonisten blockiert die extrazelluläre EGFR-Domäne und die andere Klasse führt zu einer Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität. In Deutschland sind derzeit zwei Antikörper, Cetuximab und Panitumumab, zugelassen, welche gegen die extrazelluläre EGFR-Domäne gerichtet sind. Bei Cetuximab (Handelsname Erbitux) handelt es sich um einen chimären monoklonalen Maus-Mensch-IgG1-Antikörper (Homey et al., 2008; Galizia et al., 2007)) und bei Panitumumab um den ersten rein humanen IgG2-Antikörper gegen den EGFR. 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. Es zeigte sich, dass die Patienten von der Kombinationstherapie auch dann profitierten, wenn sie zuvor auf alleinige Irinotecan-Therapie nicht mehr angesprochen hatten (Cunningham et al., 2004). Cetuximab wurde im Jahr 2004 und Panitumumab im Jahr 2007 für die Behandlung von Patienten mit therapierefraktären kolorektalen Karzinomen zugelassen. Neben der Blockade der extrazellulären EGFR-Domäne ist auch die Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib möglich. Allerdings wurde Erlotinib beim metastasierten kolorektalen Karzinom bisher nur in frühen Studienphasen getestet. Die Zulassung beschränkt sich zurzeit noch auf andere metastasierte Tumore wie das Pankreaskarzinom und nicht kleinzellige Bronchialkarzinom (Stintzing et al., 2009).

Das Ausmaß der immunhistochemisch nachgewiesenen EGFR-Expression korreliert nicht mit der Effektivität der anti-EGFR-Therapie (Cunningham et al., 2004; Saltz et al., 2004). Eine KRAS-Mutation hingegen hat Einfluss auf die anti-EGFR-Therapie. So weisen einige Studien darauf hin, dass bei Vorliegen einer KRAS-Mutation die Behandlung mit Cetuximab und Panitumumab ineffektiv ist (Amado et al., 2008;

Karapetis et al., 2008; Lievre et al., 2008; De Roock et al., 2008; Cappuzzo et al., 2008). Aus diesem Grund sollte vor einer Therapie mit EGFR- Antikörpern eine KRAS-Mutation ausgeschlossen werden. Derzeit ist Cetuximab Standard in der Therapie vorbehandelter Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom.

Auf der Jahrestagung der ASCO im Jahr 2009 wurden die CRYSTAL-Studie und die OPUS-Studie vorgestellt, welche den Einsatz von Cetuximab in der Erstlinientherapie untersuchten (Van Cutsem et al., 2008; Bokemeyer et al., 2008). Beide Studien waren große multinationale kontrollierte Erstlinienstudien, die randomisiert eine klassische Chemotherapie (FOLFIRI bzw. FOLFOX) mit und ohne Cetuximab verglichen haben. Die aktuell auf der ASCO-Jahrestagung vorgestellten Analysen prüften den Einfluss des KRAS-Status auf die Wirksamkeit von Cetuximab. Es konnte gezeigt werden, dass Cetuximab eine gesteigerte Effektivität bei Patienten mit einem KRAS-Wildtyp-Tumor aufweist, so dass diese Patienten besonders von der Zugabe von Cetuximab zu Standardchemotherapien profitieren.

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

1.9 VEGF (Vascular endothelial growth factor)

1.9.1 Allgemeines

Im Jahr 1983 isolierten Senger und Dvorak einen Faktor, den sie „vascular permeability factor“ (VPF) nannten (Senger et al., 1983). Mitte 1989 wurde dann von Ferrara und seinen Kollegen ein „neues“ angiogenes Protein entdeckt und zusätzlich auch noch sequenziert: VEGF (vascular endothelial growth factor) (Ferrara et al., 1989). Ebenfalls Connolly und seine Kollegen veröffentlichten unabhängig von Ferrara die Isolation und Sequenzierung von VPF (Connolly et al., 1989). 1990 wurde dann überraschend klar, dass es sich bei VPF und VEGF um die gleichen Moleküle handelte.

VEGF-A ist der Prototyp eines pro-angiogenen Faktors, der in vielfältige physiologische und auch pathologische Prozesse involviert ist. Er stellt einen überlebenswichtigen Faktor für Endothelzellen dar. Außerdem induziert er Proliferation und Migration von Endothelzellen und führt zur Permeabilitätssteigerung und Relaxation von Gefäßwänden. Er induziert die Angiogenese unter anderem durch einen direkten Effekt

auf die Endothelzellen (Carmeliet et al., 2005). VEGF-A ist Mitglied in einer Gen-Familie, welche PlGF (placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D enthält.

VEGF-A ist ein heparin-bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (Ferrara et al., 1989). Das menschliche Gen, welches für VEGF-A codiert, ist in 8 Exons organisiert (Houck et al., 1991) und befindet sich auf dem Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al., 1996). Durch alternatives Spleißen können verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher Wirkung und Funktion entstehen. Zum Beispiel VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991), VEGF₁₄₅ (Poltorak et al., 1997), VEGF₁₈₃ (Jingjing et al., 1999), VEGF₁₆₂ (Lange et al., 2003), VEGF 165 b (Bates et al., 2002). Insgesamt sind bis heute 12 verschiedene Spleißisoformen bekannt, von denen einige angiogene (VEGF_{xxx}) und andere anti-angiogene (VEGF_{xxx}b) Wirkungen entfalten (Perrin et al., 2005). Viele verschiedene Tumore sezernieren VEGF-A. Wie Tumore des Endometriums (Guidi et al., 1996), der Blase und Niere (Brown et al., 1993), der Brust (Yoshiji et al., 1996), der Lunge (Volm et al. 1997), des Gastrointestinaltraktes (Staton et al., 2007) und einige intrakranielle Tumoren. VEGF-C und VEGF-D regulieren die Lymphangiogenese (Karkkainen et al., 2002).

1.9.2 Regulation der VEGF Genexpression

Das Sauerstoffangebot spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von verschiedenen Genen. Eine wichtige Rolle nimmt das Sauerstoffangebot auch bei der Regulation der VEGF-Genexpression ein (Safran et al., 2003). Eine Schlüsselfunktion spielt hier Hif-1 (siehe Kapitel 1.10 HIF-1).

IGF-1 (Warren et al., 1996), PDGF (Finkenzeller et al., 1997), EGFR, TGF- β 1 TNF- α und KGF (Frank et al., 1995) stimulieren die VEGF mRNA-Expression. Auch Hormone (Soh et al., 1996; Shifren et al., 1998; Ferrara et al., 1998) oder inflammatorische Zytokine wie Interleukin 6 können die VEGF-Genexpression stimulieren (Cohen et al., 1996). Bei Kolonadenomen, bei denen regelmäßig eine Mutation im Wnt-Signalweg zu finden ist, kommt es ebenfalls zu einer Hochregulation der VEGF-Genexpression (Zhang et al., 2001). In einer anderen Studie von Seno et al. im Jahr 2002, die mit Knockout Mäusen (Apc (Delta 716)), welche ein Model für die FAP darstellten, durchgeführt wurde, wurde festgestellt, dass sowohl in benignen als auch in malignen intestinalen Tumoren eine erhöhte COX-2-Expression zu einer Erhöhung des

Prostaglandins E2 führt. Das Prostaglandin E2 wiederum stimuliert den EP2 Rezeptor, woraufhin es zur Induktion von VEGF kommt und damit zur Tumorangiogenese (Seno et al., 2002).

1.9.3 VEGF und Tumorprogression

Ohne adäquate Gefäßversorgung können solide Tumore die kritische Größe von 1-2 mm³ wegen mangelnder Sauerstoff- und Nährstoffversorgung nicht überschreiten. So spielt die Initiierung und Aufrechterhaltung der Angiogenese eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression. Hier liegt die Bedeutung von VEGF als zentraler Mediator (Bergers et al., 2003; Carmeliet et al., 2005).

1.9.4 VEGF-Rezeptoren

VEGFR-1 und VEGFR-2 sind sog. Tyrosinkinaserzeptoren. Sie besitzen sieben Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen in ihrer extrazellulären Domäne. (Shibuya et al., 1990). Auch der VEGFR-3 (Flt-4) Rezeptor gehört zu der Familie der RTKs (receptor tyrosine kinases) (Pajusola et al., 1992). Hier binden die lymphangiogenen Faktoren VEGF-C und VEGF D (Karkkainen et al., 2002). Der VEGFR-1 auch Flt-1 genannt (fms-like tyrosine kinase) bindet VEGF-A, VEGF-B und außerdem PlGF (Karkkainen et al., 2002). Bindet nun VEGF an den VEGF-1 Rezeptor, so führt dies zu einer leichten Autophosphorylierung des Rezeptors (Waltenberger et al., 1994). Bis heute scheint es so, als hätte der VEGF-1 Rezeptor je nach Umstand stimulierende oder auch hemmende Einflüsse auf die Angiogenese (Kendall et al., 1993). An den VEGF-2 Rezeptor bindet VEGF-A (Millauer et al., 1993). Durch die Bindung kommt es zu Dimerisation und einer starken Autophosphorylierung. Der VEGFR-2 stellt den wichtigsten Mediator für permeabilitätssteigernde, angiogene und mitogene Effekte dar.

1.9.5 Prognostische Bedeutung von VEGF

Eine wichtige Voraussetzung für Tumorwachstum und Metastasierung stellt die Angiogenese dar. Bei der Angiogenese wiederum spielt der Vascular Endothelial Growth Factor eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund richtet sich großes Interesse auf den VEGF, da er sich möglicherweise als objektiver Parameter mit prognostischer Aussagekraft identifizieren läßt. Für verschiedene solide Tumore und auch Tumore des hämatologischen Systems hat sich eine prognostische Signifikanz

von VEGF bestätigt (Poon et al., 2004; Hu et al., 2004; Raspollini et al., 2004; Kaya et al., 2004). Auch zum kolorektalen Karzinom wurden bis heute schon eine Vielzahl von Publikationen über die prognostische Bedeutung von VEGF veröffentlicht. In der Mehrzahl der Studien wird ein Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression von Tumorzellen und einer schlechteren Prognose hinsichtlich Rezidiven und Überlebenszeit gesehen (Guetz et al., 2006; Nakayama et al., 2002; McLeod et al., 1999, Kaio et al., 2003). Allerdings gibt es auch Studien, die diese Ergebnisse nicht bestätigen (Doger et al., 2006; Lee et al., 2000).

1.10 Hif-1 (Hypoxia-inducible factor 1)

1.10.1 Allgemeines

Der Hif-1 (hypoxia-inducible factor 1) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der durch niedrigen Sauerstoffgehalt aktiviert wird und an „regulatorische Sequenzen“ bindet (Gruber et al., 2006). Bei ihm handelt es sich um ein basisches Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein, welches aus einer 120 kDa schweren α - und einer 91 bis 94 kDa schweren β -Untereinheit besteht (Wang et al., 1995). Die β -Untereinheit ist auch bekannt als ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Von beiden Untereinheiten sind jeweils 3 Isoformen bekannt, die an unterschiedlichen Genloci exprimiert werden. Zur Hif- α Familie gehören: Hif-1 α , Hif-2 α , Hif-3 α . Zur Hif- β Familie gehören ARNT, ARNT2 und MOP3 (Member of PAS Protein 3) (Gruber et al., 2006).

Die Aktivität von Hif wird durch die α -Untereinheit bestimmt, da nur sie sauerstoffabhängig reguliert wird. Die α -Untereinheit wird zwar konstitutiv transkribiert und translatiert, unter normoxischen Bedingungen jedoch durch das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) ubiquitiniert und im Proteasom degradiert. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Bindung von VHL an Hif-1 α inhibiert. (Hon et al., 2002; Maxwell et al., 1999; Min et al., 2002). Die HIF-1 β Untereinheit wird im Kern sauerstoffunabhängig konstitutiv exprimiert. Um seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor zu erlangen, muss HIF-1 α an seinen Dimerisierungspartner, eine Hif- β -Untereinheit, binden und in den Kern translozieren. Neben der hypoxie-induzierten Induktion von Hif-1 α ist auch eine vom MAP-Kinase und Phosphatidylinositol-3-kinase Signalweg abhängige Induktion bekannt (Fukuda et al., 2002). Zudem ist eine Stimulation der Proteinbiosynthese von Hif-1 durch aktiviertes mTOR („mammalian target of rapamycin“) möglich. (Hudson et al., 2002; Semenza 2003; Majumder et al, 2004; Land SC et al, 2007; Lang et al, 2007). Bis heute sind über 60 Hif-1 regulierte Gene

identifiziert (Semenza GL 2002). Sie beinhalten z.B. Erythropoetin (Jiang et al., 1996), VEGF (Forsythe et al., 1996), glykolytische Enzyme (Semenza et al., 1994) und viele mehr. Die Proteinprodukte dieser Gene spielen eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, bei der Gefäßreaktivität und dem Gefäßumbau, beim Glucose- und Energiemetabolismus, bei der Zellproliferation und beim Zellüberleben, bei der Erythropoese und der Eisenhomöostase (Semenza et al., 2001).

1.10.2 Hif-1 und Tumorprogression

Entwickeln sich während des Tumorwachstums hypoxische Bedingungen, so steigt die Aktivität von Hif-1 (Semenza et al., 2001). Bedingt durch die Hypoxie kommt es zu einer Abnahme der Degradation von Hif-1 α durch sauerstoffabhängige Prolylhydroxilierung (Huang et al., 1998). Eine Aktivierung von Hif-1 α ist aber auch durch genetische Veränderung von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen möglich. Hier kommt es zu einer sauerstoffunabhängigen Regulation. Unter anderem durch einen Anstieg der Synthese (durch eine abnorme Aktivierung des MAPK pathways) oder durch Abnahme der Ubiquitination (durch eine Mutation von VHL, p53, PTEN) (Furlan et al., 2008). Bis heute hat man in zahlreichen Primärtumoren oder auch Metastasen eine Überexpression von Hif-1 α gefunden (z.B. Lunge, Brust, Prostata u.a.) (Zhong et al., 1999). Da Hif-1 α die Expression von VEGF initiieren kann, kommt ihm eine bedeutende Rolle in der Tumorangiogenese zu.

1.10.3 Prognostische Bedeutung von Hif-1

Bis heute sind die meisten in vivo Studien über Hif-1 immunhistochemische Analysen. In diesen konnte gezeigt werden, dass das Hif-1 α Protein in vielen primären Tumoren und Metastasen überexprimiert ist und in bestimmten Karzinomen einen signifikanten prognostischen Marker darstellt (Semenza et al., 2003; Zhong et al., 1999; Sivridis et al., 2002; Birner et al., 2000; Birner et al., 2001; Giatromanolaki et al., 2001).

Zur Hif-1 α Expression beim kolorektalen Karzinom gibt es noch nicht viele Publikationen. Die bisherigen Ergebnisse sind widersprüchlich, was die Assoziation mit klinisch-pathologischen Eigenschaften oder die Bedeutung der Hif-1 α Expression in Bezug auf die Prognose des kolorektalen Karzinoms angeht (Kuwai et al., 2003; Krishnamachary et al., 2003; Yoshimura et al., 2004; Furlan et al., 2007, Furlan et al., 2008).

1.11 Zusammenhang von EGFR, VEGF und Hif-1 α

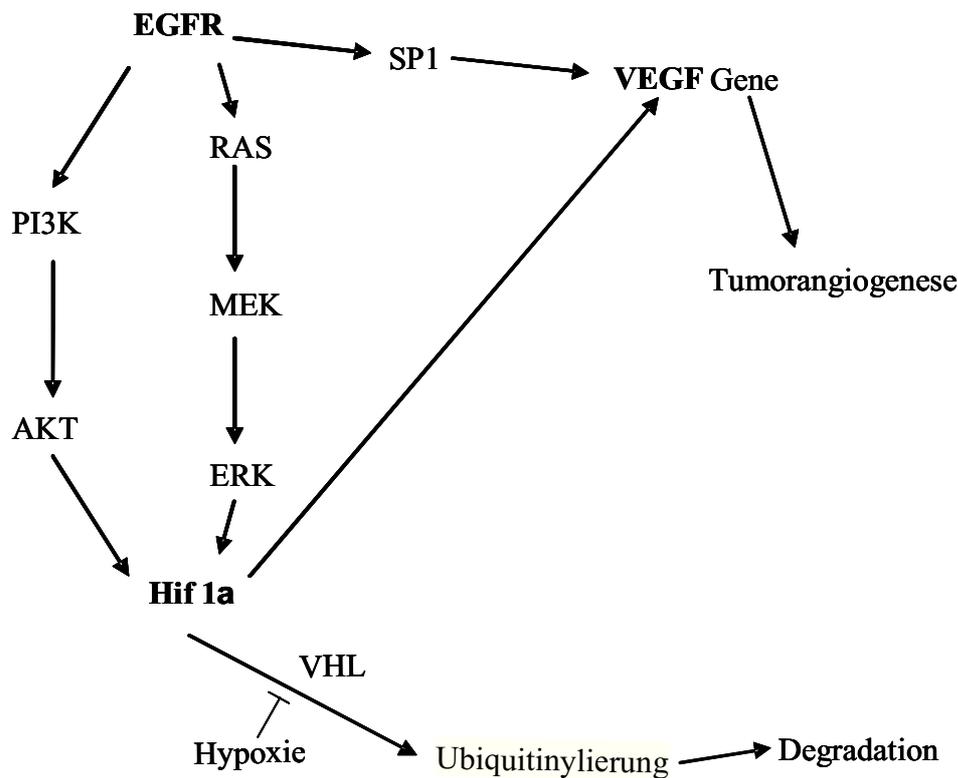


Abb. 2 modifiziert nach Laughner et al., 2001; Pore et al., 2003; Pore et al., 2004; Semenza et al., 2003 ; Garcia et al., 2006

Bindet ein Ligand (z.B. EGF) an den EGF-Rezeptor, kann der PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) Signalweg aktiviert werden. PI3K aktiviert die Down-Stream-Serin/Threonin-Kinase AKT (auch bekannt als Proteinkinase B (PKB)). Alternativ kann aber auch der MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg aktiviert werden. Hier wird ERK (extracellulärsignal-regulierte Kinase) durch MEK (MAP/ERK Kinase) aktiviert. Beide Wege führen zu einer vermehrten Transkription von Hif-1 α . Der Sauerstoffgehalt wiederum reguliert die Degradation von Hif-1 α . Bei Hypoxie kommt es zu einer verminderten proteasomalen Degradation und damit zu einer vermehrten Produktion von Hif-1 α (Semenza et al., 2003). Hif-1 α wiederum führt zu einer vermehrten VEGF-Genexpression und damit zur Tumorangio-genese. Zudem fungiert mTOR, der einen zentralen Mediator für Transkription und Translation im PI3K/Akt Signaltransduktionsweg darstellt, als „upstream regulator“ von Hif-1. Somit hat mTOR auch einen Einfluss auf die VEGF-Genexpression und damit auf die Angiogenese. (Hudson et al, 2002; Lang et al, 2007; Land et al, 2007; Wouters et al,

2008; Harada et al, 2009). Die VEGF-Genexpression und damit die Tumorangiogenese kann auch durch einen Hif-1 α unabhängigen und damit auch Sauerstoff unabhängigen Signalweg initiiert werden. Dieser Weg führt über Sp1 zur VEGF-Genexpression (Garcia et al., 2006; Pore et al., 2004; Pore et al., 2003; Laughner et al., 2001).

1.12 Fragestellung

Die EGFR-vermittelte sowie die VEGF-vermittelte Signaltransduktion beim kolorektalen Karzinom stellen wichtige tumorbiologische Mechanismen und Therapietargets dar. Nach der Rezeptoraktivierung können verschiedene Signalkaskaden bzw. Downstream-Signalkaskaden aktiviert werden, die zu unterschiedlichen Effekten in der Tumorzelle führen. Die Rolle der Expression von EGFR, VEGF und Hif-1 α für die Progression und Prognose des kolorektalen Karzinoms wurde in zahlreichen Studien untersucht. Allerdings wurden bislang mögliche Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher tissue microarrays von 201 kolorektalen Adenokarzinomen hergestellt, in denen sowohl Tumorzentrum als auch Invasionsfront repräsentativ erfasst wurden.

Die Arbeit soll folgende Fragen beantworten:

- Wie viele der untersuchten Karzinome zeigen eine Expression von EGFR, VEGF und Hif-1 α im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront ?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR, VEGF und Hif-1 α im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront und klinisch-pathologischen Parametern wie z.B. Grading, Staging sowie der TNM-Klassifikation?
- Beeinflusst die Expression von EGFR, VEGF und Hif-1 α im Tumorzentrum bzw. an der Invasionsfront die Prognose der Patienten?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Gewebeproben der kolorektalen Adenokarzinome wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Helmut Erich Gabbert) entnommen und waren routinemäßig formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung an 201 Patienten mit potentiell kurativer Resektion eines kolorektalen Adenokarzinoms. Die Klassifikation der Karzinome erfolgte nach den Vorgaben der UICC. Aus den Paraffinblöcken wurden Tissue microarrays hergestellt, wobei jeweils zwei Proben aus dem Tumorzentrum und zwei Proben aus der Invasionsfront sowie eine Probe (als Kontrolle) aus der nicht-neoplastischen kolorektalen Mukosa gewonnen wurden. Der Stanzendurchmesser betrug 1mm.

2.2 Tissue microarray

Das Prinzip des Tissue microarrays besteht darin, dass Gewebeproben von konventionellen histologischen Paraffinblöcken (Spenderblöcke) mittels Stanze in einen Empfängerparaffinblock verbracht werden. So wird es möglich, Gewebeproben von verschiedenen Patienten in einen Paraffinblock zu transferieren und später Schnitte anzufertigen, auf denen eine Vielzahl von Patientengewebe angefärbt werden kann. Diese Methode zeigt im Vergleich zur konventionellen immunhistochemischen Methode Vorteile. Da sich auf einem Block Gewebe von mehreren Patienten befindet, kann gewährleistet werden, dass sie einen einheitlichen Färbeprozess und Auswertungsprozess durchlaufen. Durch den kleinen Durchmesser der Stanzen, mit denen das Gewebe aus den Spenderblöcken entnommen wird, wird insgesamt weniger Gewebe verbraucht, so dass die Spenderblöcke noch für weitere Diagnostik zur Verfügung stehen können. Für den Färbeprozess wird weniger Material benötigt. Insgesamt stellt die Herstellung des Tissue microarray eine kosten- und zeitsparende Methode dar.

2.2.1 Herstellung des Tissue mikroarrays

Von den Spenderblöcken wurden Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Unter dem Mikroskop wurden auf dem Objektträger jeweils zwei geeignete Regionen an der Invasionsfront und zwei geeignete Regionen im Tumorzentrum für die späteren Gewebstanzen markiert. Diese Bezirke sollten eine

für den Tumor typische Histologie zeigen. Die markierten Bereiche auf den HE-Schnitten wurden im nächsten Schritt durch Auflegen der Objektträger auf den Spenderblock den entsprechenden Bereichen der Spenderblöcke zugeordnet. Hierdurch wurde versucht, bei dem späteren Stanzen den vorher im Mikroskop markierten Gewebsabschnitt mit möglichst großer Sicherheit aus dem Spenderblock zu entnehmen. Mit Hilfe eines speziellen Gerätes (Tissuearrayer, Beecher Instruments, San Prairie USA) wurden dann, mittels einer Stanze mit 1mm Durchmesser, aus den geplanten Regionen in dem Spenderblock Gewebszylinder ausgestanzt und in ein gleich großes Loch in den Empfängerblock überführt. Von jedem Patienten wurden jeweils zwei Proben aus der Invasionsfront, zwei Proben aus dem Tumorzentrum und eine Probe aus dem Normalgewebe überführt. Zwischen diesen fünf Proben wurde jeweils ein Abstand von 0,5 mm belassen. Insgesamt war es so möglich, die Gewebeproben von bis 20 Patienten in einen Empfängerblock zu verbringen. An das Ende des Empfängerblockes (in der vorliegenden Studie unten re) wurden noch zwei Proben, jeweils eine aus Plazenta- bzw. Schilddrüsengewebe, als externe Kontrolle verbracht. Zum Abschluss wurde der fertig gestellte Paraffinblock 5 min bei 60°C erwärmt und die Oberfläche mit einem Objektträger geglättet. Nun konnten die Schnitte, welche dann immunhistochemisch gefärbt wurden, angefertigt werden.

2.3 Verwendete Antikörper

Der EGFR wurde mit Hilfe des EGFR pharmDX™ Kit (DakoCytomation, Hamburg) dargestellt. VEGF wurde mit Hilfe des Kaninchen Anti-VEGF (Zymed Laboratories Inc., USA), einem polyklonalen Antikörper, und Hif-1 α mit Hilfe des Maus Anti-Hif-1 α (Chemicon International, Deutschland, USA, Kanada, Australien), einem monoklonalen Antikörper, dargestellt.

Als Sekundärantikörper dienten EnVision™+ System-HRP, Rabbit, bzw. Mouse der Firma Dakocytomation, Hamburg, 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.

2.4 Immunhistochemische Methode

Die Polymerkonjugatmethode, welche hier verwendet wurde, nutzt ein sowohl enzym- als auch antikörpermarkiertes Polymerkonjugat. Das „Rückrat“ des Polymerkonjugates besteht aus einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid), an das durchschnittlich 70 Enzymmoleküle und 10 Antikörper binden können.

Bei dem EnVision™-System, welches für den Nachweis von VEGF und Hif-1 α genutzt wurde, ist der Sekundärantikörper an das Dextran-Trägermolekül gebunden. Im ersten Schritt wird der Primärantikörper gebunden und im zweiten Schritt dann das EnVision™-Polymer. Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, dass weniger Inkubationsschritte als bei anderen Verfahren notwendig sind. Außerdem zeigt es eine hohe Sensitivität und gleichzeitig eine geringe Neigung zu unspezifischen Hintergrundfärbungen.

2.5 Färbung

2.5.1 EGFR- Färbeprotokoll

Entparaffinierung

Vor einer immunhistochemischen Färbung müssen die Gewebeschnitte entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Dazu werden die 2- 4 μ m dicken Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C getrocknet und danach 15 Minuten lang in Xylol getaucht. Das Eintauchen für jeweils eine Minute in eine absteigende Alkoholreihe mit 2x100%, 2x95%, 1x70% und das abschließende Spülen mit Leitungswasser führt zur Ausschwemmung des Paraffins und zur Rehydrierung des Gewebes. Eine vollständige Entparaffinierung ist wichtig, da Überreste des Paraffins eine unspezifische Färbung zur Folge haben können.

Proteinkinase K

Die Gewebeprobe wird mit Hilfe der Proteinkinase K proteolytisch angedaut. Es wird soviel Proteinase-K-Lösung hinzugegeben, dass die Proben bedeckt sind (mindestens 3 Tropfen (100 μ L)) und danach inkubiert man sie für 5 (\pm 0,5) Minuten. Danach wird das Gewebe mit Wasser gespült und 5 (\pm 1) Minuten in ein frisches Wasserbad von Reagenzqualität gestellt. Damit es nicht zu einer Zerstörung der Zellmembran durch proteolytische Andauung kommt, sollten die genauen Zeitangaben nicht überschritten werden.

Peroxidase-Block

Ziel des Peroxidase-Blocks ist die Reduktion einer Hintergrundfärbung durch die endogene Peroxidase. Hierzu werden die Proben mit einem Peroxidase-Block (3% Hydrogen Peroxid) bedeckt (mindestens 3 Tropfen (100 µL)) und 5 (±1) Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben mit Wasser gespült und in ein Bad aus 0,03% Triton aqua dest. gestellt.

Primärantikörper

Die Gewebeprobe wird mit dem primären Antikörper (mindestens 3 Tropfen (100 µL)) und einem negativen Kontrollreagenz 30 (±1) Minuten in einer feuchten Kammer (um Austrocknung zu vermeiden) inkubiert und danach erneut gespült.

Markiertes Polymer

Es wird eine ausreichende Menge (mindestens 3 Tropfen (100 µL)) von dem markierten Polymer zugegeben und erneut 30 (±1) Minuten inkubiert. Danach wird erneut gespült.

DAB+ Substrat-Chromogenlösung

Es wird eine ausreichende Menge (mindestens 3 Tropfen (100 µL)) von DAB+ Substrat-Chromogenlösung zugegeben und für 10 (±1) Minuten inkubiert. Danach werden die Proben 2–5 Minuten in ein frisches Wasserbad von Reagenzqualität gestellt.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Die Objektträger werden für 6 Minuten in Meyer's Hämatoxylin gestellt. Bei dem anschließenden Spülen mit Leitungswasser ist es wichtig, dass alle Hämatoxylinreste vollständig entfernt werden. Nach einem Wasserbad für 2-5 Minuten werden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol behandelt.

Eindecken

Die gefärbten Gewebeschnitte werden mit angewärmter Glycerin-Gelatine benetzt und blasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt.

Negativkontrolle

Es sollte, um Färbeartefakte durch unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, bei jedem Färbedurchlauf eine negative Kontrollgewebeprobe angefertigt

werden. Diese 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 bleiben.

2.5.2 VEGF und Hif-1 α Färbeprotokoll, EnVision+ HRP (Fa.DAKO)

Entparaffinierung

Zur vollständigen Entfernung des Paraffins werden die Gewebeschnitte für 2 x 5 Minuten in Xylol und danach für 2 x 5 Minuten in 100% Aceton gestellt. Es folgt eine Spülung für 2 x 5 Minuten mit Leitungswasser.

Vorbereitung des Antikörpers

Die Gewebeschnitte werden in einen Citratpuffer gestellt (pH6) und für 3 x 5 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt. Hierbei sollte beachtet werden, dass der Puffer die Schnitte die ganze Zeit bedeckt. Verkochter Citratpuffer wird durch frischen Puffer aufgefüllt. Nach der Mikrowellenbehandlung müssen die Objektträger 10 Minuten abkühlen und anschließend werden sie mit Leitungswasser abgespült und weitere 5 Minuten darin stehen gelassen.

Peroxidaseblock

Die Gewebeschnitte werden für 20 Minuten in einem 0,3%igem H₂O₂-Methanol-Bad inkubiert (1ml H₂O₂ in 100ml Methanol bei zwei Küvetten), mit Leitungswasser gespült und anschließend 2 x 5 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4) gestellt.

Primärantikörper

Der Antikörper wird mit einem Antikörperverdünnungspuffer (Zymed, San Francisco, USA) verdünnt. VEGF wird 1:100 und Hif-1 α 1:500 verdünnt. Diese Verdünnung wird auf die Gewebeprobe aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

EnVision™-Polymerlösung

Nachdem die Gewebeschnitte 2 x 5 Minuten in einen TBS Puffer (pH 7,4) gestellt wurden, 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.

Substratlösung

Bei Raumtemperatur werden die Gewebeschnitte 10 Minuten lang in AEC-Substratlösung inkubiert. Bei AEC kann die Inkubation bis zu 30 min verlängert werden. Anschließend wird mit Leitungswasser gespült.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Für 5 Minuten werden die Gewebeschnitte in Meyer's Hämatoxylin gestellt und anschließend mit Leitungswasser gespült. Danach bläuen sie 5 Minuten in warmen Leitungswasser. Abschließend werden sie 15 Minuten in Aqua bidest gestellt.

Eindecken

Die gefärbten Gewebeschnitte werden mit Glycerin-Gelatine benetzt und blasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt.

2.6 Mikroskopische Auswertung und statistische Analyse

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

Score 1: $\leq 10\%$

Score 2: $>10 - 49\%$

Score 3: $\geq 50\% - 89\%$

Score4: $\geq 90\%$

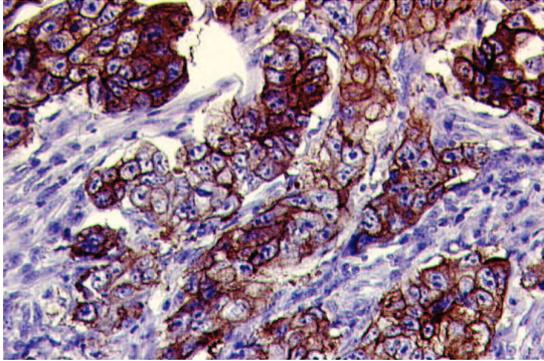
Als Statistikprogramm wurde SPSS Version 12.0 für Windows, welches von The Apache Software Foundation entwickelt wurde, verwendet. Für die statistische Analyse wurden cut-offs ($>50\%$ bzw. $>90\%$) gewählt. Das Signifikanzniveau betrug, unabhängig von den verwendeten Test, 5%. Die Beschreibung des Patientengutes, der histomorphologischen Subgruppen und der Tumorstadien erfolgte mittels deskriptiver Verfahren. Errechnet wurden absolute und relative Häufigkeiten. Für Merkmale, z.B. das Alter des Patientenkollektives, wurden Lageparameter wie Median, arithmetisches Mittel und die Standardabweichung errechnet.

Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte nach der nicht-parametrischen Produkt-Limit Methode von Kaplan-Meier. Überlebende Patienten wurden für mindestens fünf Jahre postoperativ beobachtet. Außerdem wurde eine Multivariatanalyse nach dem Cox-proportional-Hazard-Modell durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemisches Expressionsmuster

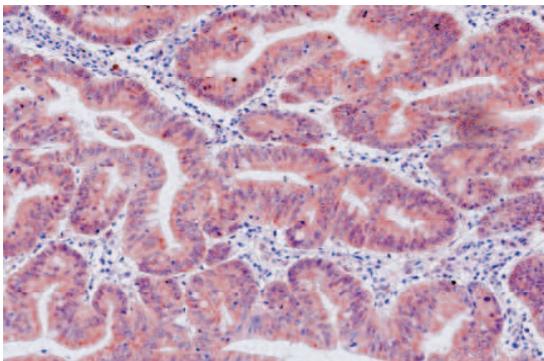
Abb 3 Immunhistochemisches Expressionsmuster des EGFR



In Abb. 3 wird das typische Expressionsmuster des EGF-Rezeptors dargestellt.

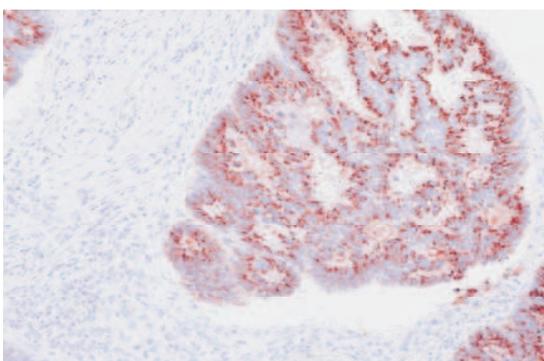
Dabei zeigt das kolorektale Karzinom eine zytoplasmatische und membranäre Expression.

Abb. 4 Immunhistochemisches Expressionsmuster des VEGF



In Abb. 4 ist die für VEGF typische Expression in einem kolorektalen Karzinom dargestellt.

Abb. 5 Immunhistochemisches Expressionsmuster des Hif-1 α



In Abb. 5 ist die für Hif-1 α typische Expression in einem kolorektalen Karzinom dargestellt.

3.2 Patientenkollektiv

Die Gewebeproben der kolorektalen Adenokarzinome wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Helmut Erich 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 der jüngsten Patientin betrug 29 Jahre, das der ältesten 88 Jahre. Das mediane Alter lag bei 70,6 Jahren.

3.2.1 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

Tabelle 4

	Häufigkeit	Prozent
Lokalisation		
Caecum/Ascendens	48	23,9
Transversum*	21	10,4
Sigma/Descendens	63	31,3
Rectum	69	34,3
Total	201	100,0
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
Gesamt	201	100,0
pM1		
	2	1
UICC		
1	40	19,9
2	90	44,8
3	69	34,3
4	2	1,0
Gesamt	201	100,0
Grading		
1-2	155	77,1
3-4	46	22,9
Gesamt	201	100,0

LVI (Lymph vessel invasion)		
negativ	148	73,6
positiv	53	26,4
Gesamt	201	100,0
BVI (Blood vessel invasion)		
negativ	186	92,5
intramural/extramural	15	7,5
Gesamt	201	100,0

* (inklusive beider Flexuren)

3.2.2 Überlebensanalyse des Gesamtkollektives hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

Tabelle 5: Überlebensanalyse

	Univariate			Multivariate	p-value
	5-Jahres-ÜLR	Hazard-Ratio	P	Hazard-Ratio	
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			
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%				
intra-/ extramural	44%				

Hierbei wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen pT und der 5-Jahres-Überlebensrate gefunden.

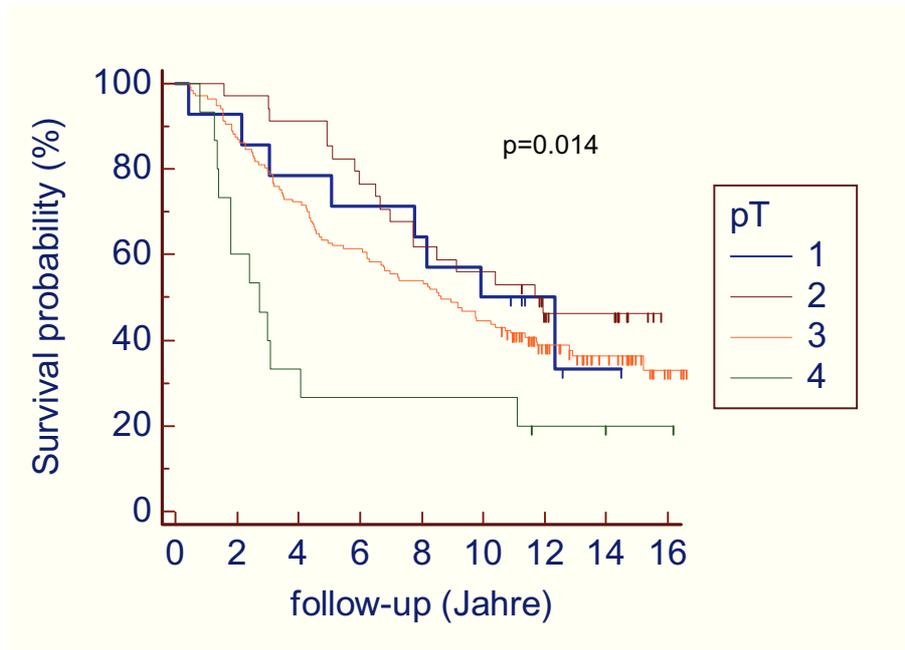


Abb. 3: Zusammenhang von pT und der 5-Jahres-Überlebensrate

Ein signifikanter Zusammenhang wurde ebenfalls zwischen pN und der 5-Jahres-Überlebensrate gefunden.

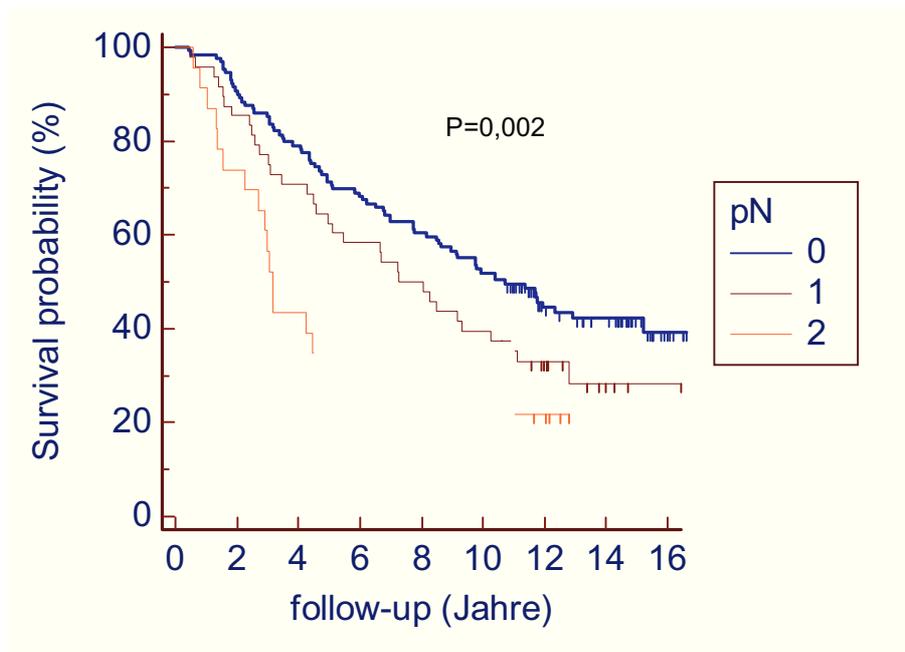


Abb. 4: Zusammenhang von pN und der 5-Jahres-Überlebensrate

Auch zwischen den UICC-Stadien und der 5-Jahres-Überlebensrate wurde ein signifikanter Zusammenhang gefunden.

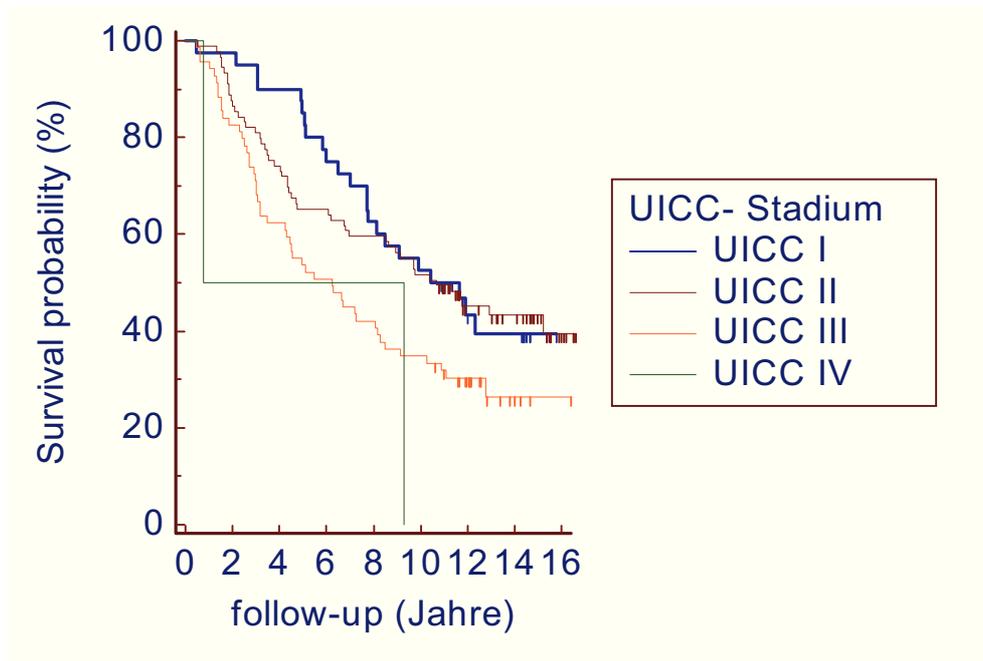


Abb. 5: Zusammenhang von pT und der 5-Jahres-Überlebensrate

3.3 Statistische Analyse der EGFR-Immunhistochemie

3.3.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und der Färbeintensität

Alle 201 kolorektalen Adenokarzinome wurden mit dem EGFR-Antikörper gefärbt. Zur Beurteilung der Reaktivität der Karzinome wurden vier Stufen der prozentualen Anfärbung an der Gesamtheit des Karzinoms gebildet. Außerdem wurde die Färbeintensität in Form von vier Stufen beurteilt.

Es fand sich folgende Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität.

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Reaktivität

Score	Prozentrang	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
1	< 10	136 (68)	132 (65)	138 (74,6)
2	≥ 10 - 49	34 (16,9)	43 (21,4)	33 (17,9)
3	≥ 50 - 89	22 (10,9)	19 (9,5)	7 (3,8)
4	≥ 90	9 (4,5)	7 (3,5)	7 (3,8)

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der Färbeintensität

Stärke	Färbe- intensität	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
0	keine	59 (29,3)	59 (29,3)	57 (30,9)
1	schwach	104 (51,7)	103 (51,3)	98 (53)
2	mittel	33 (16,4)	33 (16,4)	28 (15,1)
3	stark	5 (2,5)	6 (2,9)	2 (1,1)

3.3.2 Beziehung zwischen EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Zur Analyse der Beziehung zwischen EGFR-Expression an der Invasionsfront und Tumorzentrum und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern wurden Kontingenztafeln erstellt. Hierbei fand sich ein klinisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Score der EGFR-Expression im Tumorzentrum und Lokalisation, UICC und Grading. Außerdem zeigte sich ein klinisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Stärke der EGFR-Expression im Tumorzentrum und dem Grading. Weitere signifikante Korrelationen zu den übrigen klinisch-pathologischen Parametern konnten nicht gefunden werden.

Tabelle 8: Zusammenhang zwischen Score der EGFR-Expression 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
	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/ 7	16/ 138/ 33/ 7/ 7
Lokalisation	p	0.909	0.049	0.527
Caecum/Ascendens	n= 48	30/ 9/ 6/ 3	25/ 11/ 8/ 4	2/ 33/ 8/ 2/ 3
Transversum*	n= 21	13/ 5/ 2/ 1	14/ 3/ 4/ 0	4/ 13/ 4/ 0/ 0
Sigma/Descendens	n= 63	43/ 10/ 6/ 4	43/ 15/ 2/ 3	5/ 40/ 12/ 2/ 4
Rectum	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
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
0	n=130	93/ 20/ 13/ 4	90/ 29/ 8/ 3	9/ 91/ 20/ 5/ 5
1	n= 48	28/ 11/ 6/ 3	30/ 8/ 7/ 3	6/ 32/ 7/ 1/ 2
2	n= 23	15/ 3/ 3/ 2	12/ 6/ 4/ 1	1/ 15/ 6/ 1/ 0
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	106/ 33/ 12/ 4	11/ 108/ 24/ 5/ 7
3-4	n= 46	27/ 10/ 4/ 5	26/ 10/ 7/ 3	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	0.396	0.788
negativ	n=186	123/ 32/ 22/ 9	118/ 42/ 19/ 7	15/ 125/ 32/ 7/ 7
intramural/extramural	n= 15	13/ 2/ 0/ 0	14/ 1/ 0/ 0	1/ 13/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	136/ 34/ 22/ 9	132/ 43/ 19/ 7	16/ 138/ 33/ 7/ 7

* (inklusive beider Flexuren)

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen Stärke der EGFR-Expression 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
	n=201	59 /104/ 33/ 5	59/ 103/ 33/ 6	16/ 57/ 98/ 28/ 2
Lokalisation	p	0.577	0.204	0.528
Caecum/Ascendens	n= 48	10/ 28/ 7/ 3	9/ 27/ 8/ 4	2/ 15/ 25/ 6/ 0
Transversum*	n= 21	6/ 10/ 4/ 1	7/ 10/ 4/ 0	4/ 9/ 7/ 1/ 0
Sigma/Descendens	n= 63	20/ 31/ 11/ 1	17/ 32/ 12/ 2	5/ 17/ 28/ 12/ 1
Rectum	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
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
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
0	n=130	44/ 62/ 22/ 2	45/ 61/ 21/ 3	9/ 38/ 63/ 20/ 0
1	n= 48	9/ 31/ 6/ 2	10/ 30/ 5/ 3	6/ 15/ 22/ 5/ 0
2	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= 53	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	0.750	0.59	0.988
negativ	n=186	52/ 98/ 31/ 5	54/ 94/ 32/ 6	15/ 53/ 90/ 26/ 2
intramural/extramural	n= 15	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

* (inklusive beider Flexuren)

3.3.3 Überlebensanalyse

Die statistische Analyse der Überlebenszeit wurde, wie schon in vergleichbarer veröffentlichter Literatur, bei einem Cut-off-point von $\leq 10\%$ untersucht. Hierbei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang der EGFR-Expression (Score) und der Überlebenszeit. Auch für die Stärke der EGFR-Expression und der Überlebenszeit wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden.

Tabelle 10: Überlebensanalyse

	Univariate	Hazard-Ratio	P	Multivariate	p-value
	5-Jahres-ÜLR			Hazard-Ratio	
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 VEGF-Immunhistochemie

3.4.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität

Alle 201 kolorektalen Adenokarzinome wurden mit dem VEGF-Antikörper nach der EnVision™-Methode gefärbt. Die Reaktivität und die Färbeintensität wurden wie die Färbung von EGFR beurteilt.

Hierbei fand sich folgende Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität.

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der Reaktivität

Score	Prozentrang	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
1	< 10	35 (17,4)	33 (16,4)	90 (50)
2	≥ 10 - 49	21 (10,5)	11 (5,5)	48 (26,7)
3	≥ 50 - 89	67 (33,3)	69 (34,3)	25 (13,9)
4	≥ 90	78 (38,8)	88 (43,8)	17 (9,4)

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung der Färbeintensität

Stärke	Färbe- intensität	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
0	keine	33 (16,4)	32 (15,9)	58 (32,2)
1	schwach	114 (56,7)	106 (52,7)	103 (57,2)
2	mittel	53 (26,4)	59 (29,4)	19 (10,6)
3	stark	1 (0,5)	4 (2)	0 (0)

3.4.2 Beziehung zwischen VEGF-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Wie schon bei EGFR wurde auch für die Analyse der Beziehung zwischen der VEGF-Expression und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern Kontingenztafeln erstellt. Hierbei fand sich ein klinisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Score der VEGF-Expression an der Invasionsfront und der Lokalisation und dem UICC. Für UICC wurde auch ein signifikanter Zusammenhang zur Stärke der VEGF-Expression an der Invasionsfront gefunden. Weitere signifikante Korrelationen zu den restlichen klinisch-pathologischen Parametern konnten nicht gefunden werden.

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

SCORE		VEGF IF 1/ 2/ 3/ 4	VEGF TZ 1/ 2/ 3/ 4	VEGF NG - / 1/ 2/ 3/ 4
Geschlecht	p	0.799.	0.208	0.581
männlich	n= 82	14 /10 / 29/ 29	14/ 6/ 33/ 29	13/ 37/ 19/ 9/ 4
weiblich	n=119	21/ 11/ 38/ 49	19/ 5/ 36/ 59	8 / 53/ 29/ 16/ 13
	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
Lokalisat.	p	0.045	0.669	0.269
Caecum/Ascendens	n= 48	11/ 9/ 16/ 12	12/ 1/ 15/ 20	1/ 19/ 12/ 8/ 8
Transversum*	n= 21	3/ 0/ 12/ 6	2/ 2/ 7/ 10	4/ 6/ 4/ 4/ 3
Sigma/Descendens	n= 63	8/ 5/ 22/ 28	7/ 3/ 23/ 30	6/ 32/ 15/ 7/ 3
Rectum	n= 69	13/ 7/ 17/ 32	12/ 5/ 24/ 28	10/ 33/ 17/ 6/ 3
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
pT	p	0.157	0.501	0.520
1	n= 14	0/ 1/ 3/ 10	0/ 0/ 7/ 7	0/ 5/ 7/ 1/ 1
2	n= 34	4/ 3/ 16/ 11	3/ 3/ 13/ 15	3/ 15/ 9/ 5/ 2
3	n=138	28/ 16/ 45/ 49	27/ 8/ 44/ 59	17/ 61/ 28/ 19/ 13
4	n= 15	3/ 1/ 3/ 8	3/ 0/ 5/ 7	1/ 9/ 4/ 0/ 1
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
pN	p	0.448	0.350	0.813
0	n=130	20/ 16/ 48/ 46	19/ 9/ 49/ 53	14/ 57/ 35/ 14/ 10
1	n= 48	9/ 4/ 12/ 23	10/ 0/ 13/ 25	5/ 22/ 8/ 8/ 5
2	n= 23	6/ 1/ 7/ 9	4/ 2/ 7/ 10	2/ 11/ 5/ 3/ 2
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	1/ 0/ 0/ 1	2/ 0/ 0/ 0
UICC	p	0.016	0.180	0.726
1	n= 40	2/ 3/ 17/ 18	1/ 3/ 19/ 17	2/ 16/ 14 /5 / 3
2	n= 90	18/ 13/ 31/ 28	18/ 6/ 30/ 36	12/ 41/ 21/ 9/ 7
3	n= 69	13/ 5/ 19/ 32	13/ 2/ 20/ 34	7/ 31/ 13/ 11/ 7
4	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	1/ 0/ 0/ 1	0/ 2/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
Grading	p	0.368	0.847	0.567
1-2	n=155	23/ 17/ 53/ 62	24/ 9/ 55/ 67	17/ 73/ 35/ 18/ 12
3-4	n= 46	12/ 4/ 14/ 16	9/ 2/ 14/ 21	4/ 17/ 13/ 7/ 5
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17
LVI	p	0.581	0.545	0.720
negativ	n=148	24/ 16/ 53/ 55	24/ 8/ 47/ 69	14/ 66/ 37/ 17/ 14
positiv	n= 53	11/ 5/ 14/ 23	9/ 3/ 22/ 19	7/ 24/ 11/ 8/ 3
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 89	21/ 90/ 48/ 25/ 17
BVI	p	0.388	0.861	0.175
negativ	n=186	32/ 19/ 65/ 70	31/ 10/ 65/ 80	20/ 80/ 44/ 25/ 17
intramural/extramural	n= 15	3/ 2/ 2/ 8	2/ 1/ 4/ 8	1/ 10/ 4/ 0/ 0
alle	n=201	35/ 21/ 67/ 78	33/ 11/ 69/ 88	21/ 90/ 48/ 25/ 17

* (inklusive beider Flexuren)

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen Stärke der VEGF-Expression und klinisch-pathologischen Parametern

STÄRKE		VEGF IF 0/1 / 2 / 3	VEGF TZ 0/1 / 2 / 3	VEGF NG - / 0 / 1 / 2 / 3
Geschlecht	p	0.608	0.292	0.365
männlich	n= 82	12/ 48/ 21/1	14/ 38/ 27/ 3	13/ 20/ 39/ 10/ 0
weiblich	n=119	21/ 66/ 32/ 0	18/ 68/ 32/ 1	8/ 38/ 64/ 9/ 0
	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
Lokalisation	p	0.699	0.374	0.537
Caecum/Ascendens	n= 48	11/ 28/ 9/ 0	12/ 23/ 12/ 1	1/ 11/ 30/ 6/ 0
Transversum*	n= 21	3/ 13/ 5/ 0	2/ 9/ 9/ 1	4/ 4/ 10/ 3/ 0
Sigma/Descendens	n= 63	7/ 36/ 20/ 0	7/ 39/ 17/ 0	6/ 22/ 29/ 6/ 0
Rectum	n= 69	12/ 37/ 19/ 1	11/ 35/ 21/ 2	10/ 21/ 34/ 4/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
pT	p	0.368	0.690	0.823
1	n= 14	0 / 11/ 3/ 0	0/ 10/ 4/ 0	0/ 3/ 10/ 1/ 0
2	n= 34	4/ 20/ 9/ 1	3/ 18/ 12/ 1	3/ 11/ 16/ 4/ 0
3	n=138	26/ 75/ 37/ 0	26/ 70/ 39/ 3	17/ 38/ 71/ 12/ 0
4	n= 15	3/ 8/ 4/ 0	3/ 8/ 4/ 0	1/ 6/ 6/ 2/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
pN	p	0.326	0.546	0.576
0	n=130	18/ 78/ 33/ 1	18/ 71/ 40/ 1	14/ 36/ 66/ 14/ 0
1	n= 48	9/ 22/ 17/ 0	10/ 22/ 14/ 2	5/ 14/ 24/ 5/ 0
2	n= 23	6/ 14/ 3/ 0	4/ 13/ 5/ 1	2/ 8/ 13/ 0/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/ 19/0
pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	1/ 1/ 0/ 0	21/ 2/ 0/ 0/ 0
UICC	p	0.027	0.192	0.422
1	n= 40	2/ 26/ 11/ 1	1/ 25/ 13/ 1	2/ 12/ 23/ 3/ 0
2	n= 90	16/ 52/ 22/ 0	17/ 46/ 27/ 0	12/ 24/ 43/ 11/ 0
3	n= 69	13/ 36/ 20/ 0	13/ 34/ 19/ 3	7/ 20/ 37/ 8/ 0
4	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	1/ 1/ 0/ 0	0/ 2/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
Grading	p	0.202	0.059	0.656
1-2	n=155	21/ 91/ 42/ 1	24/ 86 / 44/ 1	17/ 45/ 77/ 16/ 0
3-4	n= 46	12/ 22/ 11/ 0	8/ 20/ 15/ 3	4/ 13/ 26/ 3/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
LVI	p	0.521	0.787	0.036
negativ	n=148	23/ 88/ 36/ 1	24/ 75/ 46/ 3	14/ 38/ 78/ 18/ 0
positiv	n= 53	10/ 26/ 17/ 0	8/ 31/ 13/ 1	7/ 20/ 25/ 1/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0
BVI	p	0.850	0.072	0.657
negativ	n=186	30/ 107/ 48/ 1	31/ 101/ 51/ 3	20/ 52/ 96/ 18/ 0
intramural/extramural	n= 15	3/ 7/ 5/ 0	1/ 5/ 8/ 1	1/ 6/ 7/ 1/ 0
alle	n=201	33/ 114/ 53/ 1	32/ 106/ 59/ 4	21/ 58/ 103/19/0

* (inklusive beider Flexuren)

3.4.3 Überlebensanalyse VEGF

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang der VEGF-Expression (Score und Stärke) und der Überlebenszeit gefunden.

Tabelle 15: Überlebensanalyse

	Univariate	Hazard-Ratio	P	Multivariate	p-value
	5-Jahres-ÜLR			Hazard-Ratio	
VEGF IF			n.s.		n.s.
<10%	60%				
10-50%	76%				
50-90%	68%				
>90%	60%				
VEGF TZ			n.s.		n.s.
<10%	60%				
10-50%	55%				
50-90%	70%				
>90%	60%				
VEGF NG			n.s.		n.s.
<10%	64%				
10-50%	60%				
50-90%	74%				
>90%	65%				
VEGF-Stärke IF			n.s.		n.s.
0	58%				
1	70%				
2-3	59%				
VEGF-Stärke TZ			n.s.	1	n.s.
1	66%				
2	66%				
3	60%				
VEGF-Stärke NG			n.s.		n.s.
0	66%				
1	64%				
2-3	74%				

3.5 Statistische Analyse der Hif-1 α -Immunhistochemie

3.5.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität

Alle 201 kolorektalen Adenokarzinome wurden mit dem Hif-1 α -Antikörper nach der EnVision™-Methode gefärbt. Die Reaktivität und die Färbeintensität wurden wie die Färbung von EGFR und VEGF beurteilt.

Hierbei fand sich folgende Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und Färbeintensität.

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung der Reaktivität

Score	Prozentrang	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
1	< 10	161 (80,1)	162 (80,6)	169 (95)
2	≥ 10 - 49	16 (8)	15 (7,5)	4 (2,3)
3	≥ 50 - 89	15 (7,5)	13 (6,5)	4 (2,3)
4	≥ 90	9 (4,5)	11 (5,5)	1 (0,6)

Tabelle 17: Häufigkeitsverteilung der Färbeintensität

Stärke	Färbe- intensität	IF n (%)	TZ n (%)	NG n (%)
0	keine	139 (69,2)	132 (65,7)	152 (85,4)
1	schwach	7 (3,5)	6 (3)	3 (1,7)
2	mittel	45 (22,4)	50 (24,9)	17 (9,6)
3	stark	10 (4,9)	13 (6,7)	6 (3,4)

3.5.2 Beziehung zwischen Hif-1 α -Expression und klinisch-pathologischen Parametern

Wie schon bei EGFR und VEGF wurden auch für die Analyse der Beziehung zwischen der Hif-1 α -Expression und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern Kontingenztafeln erstellt. Hierbei fand sich ein klinisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Score der Hif-1 α -Expression an der Invasionsfront und der BVI (blood vessel invasion). Weitere signifikante Korrelationen zu den restlichen klinisch-pathologischen Parametern konnten nicht gefunden werden.

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen Score der Hif-1 α -Expression und klinisch-pathologischen Parametern

SCORE		HIF IF 1/ 2/ 3/ 4	HIF TZ 1/ 2/ 3/ 4	HIF NG - / 1/ 2/ 3/ 4
Geschlecht	p	0.525	0.867	0.204
männlich	n= 82	67/ 8/ 5/ 2	68/ 6/ 4/ 4	11/ 69/ 0/ 1/ 1
weiblich	n=119	94/ 8/ 10/ 7	94/ 9/ 9/ 7	12/ 100/ 4/ 3/ 0
	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
Lokalisation	p	0.856	0.747	0.071
Caecum/Ascendens	n= 48	38/ 3/ 5/ 2	36/ 5/ 4/ 3	3/ 40/ 1/ 3/ 1
Transversum*	n= 21	18/ 1/ 2/ 0	19/ 1/ 1/ 0	6/ 13/ 2/ 0/ 0
Sigma/Descendens	n= 63	50/ 6/ 5/ 2	51/ 5/ 5/ 2	7/ 55/ 0/ 1/ 0
Rectum	n= 69	55/ 6/ 3/ 5	56/ 4/ 3/ 6	7/ 61/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
pT	p	0.803	0.587	0.733
1	n= 14	10/ 1/ 2/ 1	10/ 0/ 2/ 2	1/ 14/ 1/ 1/ 0
2	n= 34	29/ 2/ 1/ 2	28/ 2/ 1/ 3	5/ 29/ 0/ 0/ 0
3	n=138	109/ 11/ 12/ 6	111/ 12/ 9/ 6	15/ 116/ 3/ 3/ 1
4	n= 15	13/ 2/ 0/ 0	13/ 1/ 1/ 0	2/ 13/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
pN	p	0.403	0.698	0.939
0	n=130	102/ 14/ 8/ 6	102/ 12/ 9/ 7	13/ 111/ 3/ 2/ 1
1	n= 48	39/ 1/ 6/ 2	39/ 2/ 4/ 3	9/ 37/ 1/ 1/ 0
2	n= 23	20/ 1/ 1/ 1	21/ 1/ 0/ 1	1/ 21/ 0/ 1/ 1
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	2/ 0/ 0/ 0	2/ 0/ 0/ 0
UICC	p	0.632	0.752	0.988
1	n= 40	32/ 3/ 2/ 3	31/ 2/ 3/ 4	4/ 34/ 1/ 1/ 0
2	n= 90	70/ 11/ 6/ 3	71/ 10/ 6/ 3	9/ 77/ 2/ 1/ 1
3	n= 69	57/ 2/ 7/ 3	58/ 3/ 4/ 4	10/ 56/ 1/ 2/ 0
4	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	2/ 0/ 0/ 0	0/ 2/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
Grading	p	0.778	0.653	0.982
1-2	n=155	122/ 13/ 13/ 7	122/ 13/ 11/ 9	17/ 131/ 3/ 3/ 1
3-4	n= 46	39/ 3/ 2/ 2	40/ 2/ 2/ 2	6/ 38 / 1/ 1/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
LVI	p	0.119	0.364	0.603
negativ	n=148	118/ 14/ 12/ 4	119/ 12/ 11/ 6	17/ 123/ 3/ 4/ 1
positiv	n= 53	43/ 2/ 3/ 5	43/ 3/ 2/ 5	6/ 46/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1
BVI	p	0.282	0.292	0.773
negativ	n=186	151/ 14/ 14/ 7	151/ 13/ 13/ 9	22/ 155/ 4/ 4/ 1
intramural/extramural	n= 15	10/ 2/ 1/ 2	11/ 2/ 0/ 2	1/ 14/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	161/ 16/ 15/ 9	162/ 15/ 13/ 11	23/ 169/ 4/ 4/ 1

* (inklusive beider Flexuren)

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen Stärke der Hif-1 α -Expression und klinisch-pathologischen Parametern

STÄRKE		HIF IF 0/ 1/ 2/ 3	HIF TZ 0/ 1/ 2/ 3	HIF NG - / 0/ 1/ 2/ 3
Geschlecht	p	0.242	0.324	0.477
männlich	n= 82	60/ 1/ 19/ 2	57/ 1/ 21/ 3	11/ 64/ 1/ 5/ 1
weiblich	n=119	79/ 6/ 26/ 8	75/ 5/ 29/ 10	12/ 88/ 2/ 12/ 5
	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
Lokalisation	p	0.796	0.387	0.160
Caecum/Ascendens	n= 48	31/ 1/ 15/ 1	28/ 2/ 17/ 1	3/ 33/ 2/ 6/ 4
Transversum*	n= 21	16/ 0/ 4/ 1	17/ 1/ 2/ 1	6/ 12/ 0/ 2/ 1
Sigma/Descendens	n= 63	45/ 3/ 11/ 4	44/ 1/ 14/ 4	7/ 50/ 0/ 5/ 1
Rectum	n= 69	47/ 3/ 15/ 4	43/ 2/ 17/ 7	7/ 57/ 1/ 4/ 0
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
pT	p	0.428	0.722	0.316
1	n= 14	8/ 2/ 3/ 1	9/ 0/ 3/ 2	1/ 10/ 1/ 2/ 0
2	n= 34	24/ 0/ 7/ 3	24/ 0/ 7/ 3	5/ 29/ 0/ 0/ 0
3	n=138	95/ 5/ 32/ 6	88/ 6/ 36/ 8	6/ 102/ 2/ 14/ 5
4	n= 15	12/ 0/ 3/ 0	11/ 0/ 4/ 0	2/ 11/ 0/ 1/ 1
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
pN	p	0.230	0.479	0.322
0	n=130	87/ 3/ 34/ 6	81/ 4/ 37/ 8	13/ 98/ 3/ 14/ 2
1	n= 48	32/ 3/ 9/ 4	32/ 2/ 11/ 3	9/ 34/ 0/ 2/ 3
2	n= 23	20/ 1/ 2/ 0	19/ 0/ 2/ 2	1 /20/ 0/ 1/ 1
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6 / 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
pM	p	n.s.	n.s.	n.s.
1	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	2/ 0/ 0/ 0	23/ 2/ 0/ 0/ 0
UICC	p	0.746	0.299	0.352
1	n= 40	26/ 1/ 10/ 3	27/ 0/ 8/ 5	4/ 33/ 1/ 2/ 0
2	n= 90	61/ 2/ 24/ 3	54/ 4/ 29/ 3	9/ 65/ 2/ 12/ 2
3	n= 69	50/ 4/ 11/ 4	49/ 2/ 13/ 5	10/ 52/ 0/ 3/ 4
4	n= 2	2/ 0/ 0/ 0	2/ 0/ 0/ 0	0/ 2/ 0/ 0/ 0
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
Grading	p	0.187	0.078	0.845
1	n=155	102/ 6/ 38/ 9	95/ 5/ 45/ 10	17/ 118/ 2/14/ 4
2	n= 46	38/ 1 / 6/ 1	37/ 1/ 5/ 3	6/ 34/ 1/ 3/ 2
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
LVI	p	0.991	0.385	0.688
negativ	n=148	103/ 5/ 33/ 7	99/ 5/ 37/ 7	17/ 111/ 3 /12/5
positiv	n= 53	36/ 2/ 12/ 3	33/ 1/ 13/ 6	6/ 41/ 0/ 5/ 1
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6
BVI	p	0.228	0.195	0.913
negativ	n=186	131/ 7/ 39/ 9	122/ 5/ 48/ 11	22/ 139/ 3/ 16/ 6
intramural/extramural	n= 15	8 /0 / 6/ 1	10/ 1/ 2/ 2	1 / 13/ 1/ 0/ 0
alle	n=201	139/ 7/ 45/ 10	132/ 6/ 50/ 13	23/ 152/ 3/ 17/ 6

* (inklusive beider Flexuren)

3.5.3 Überlebensanalyse Hif-1 α

Die statistische Analyse der Überlebenszeit wurde bei einem Cut-off-point von \leq 10% untersucht. Es wurde weder für den Score der Hif-1 α -Expression noch für die Stärke der Hif-1 α -Expression ein signifikanter Zusammenhang zur Überlebenszeit gefunden.

Tabelle 20: Überlebensanalyse

	Univariate	Hazard-Ratio	P	Multivariate	p-value
	5-Jahres-ÜLR			Hazard-Ratio	
HIF-1α IF			n.s.		n.s.
<10%	65%				
>10%	59%				
HIF-1α TZ			n.s.		n.s.
<10%	64%				
>10%	64%				
HIF-1α NG			n.s.		n.s.
<10%	64%				
>10%	59%				
HIF-1α Stärke IF			n.s.		n.s.
0	62%				
1-3	64%				
HIF-1α Stärke TZ			n.s.		n.s.
0	63%				
1-3	66%				
HIF-1α Stärke NG			n.s.		n.s.
0	64%				
1-3	62%				

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der Identifizierung von unabhängigen Prognosefaktoren bei dem kolorektalen Karzinom

Das Dickdarmkarzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen der Gegenwart. Neben dem Differenzierungsgrad und dem histopathologischen Subtyp stellt das pathologische Tumorstadium bis heute den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Dennoch können bei Patienten mit gleichem TNM-Stadium, gleichem Differenzierungsgrad und gleichem histopathologischen Subtyp des Tumors sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe/Überlebensraten beobachtet werden. Obwohl große Fortschritte bei der Untersuchung von neuen potentiellen Prognosefaktoren gemacht wurden, konnten bisher für keinen der beim kolorektalen Karzinom untersuchten Marker eine Überlegenheit gegenüber den klassischen klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren gesichert werden. Bei der Suche nach klinisch bedeutsamen unabhängigen Prognosefaktoren spielt die Immunhistochemie eine bedeutende Rolle. Mit Hilfe von Antikörpern können diagnostisch und/oder prognostisch wertvolle Antigene detektiert werden. Gelingt es unabhängige Faktoren zu identifizieren, können Patienten mit hohem Risiko von Patienten mit niedrigem Risiko unterschieden werden und so individuellen Therapieschemata zugeführt werden. Zudem können bestimmte molekulare Veränderungen zum Angriffspunkt spezifischer Chemotherapeutika werden. So könnte das bisherige therapeutische Vorgehen maßgeblich hinsichtlich lebensverlängernder Aspekte und der Erhaltung von Lebensqualität verbessert werden.

4.2 Zusammensetzung des Patientenkollektives

Bei der Untersuchung von molekularen Markern auf ihre allgemeingültige prognostische Aussagekraft hin ist ein klinisch repräsentatives Patientenkollektiv als Untersuchungsgrundlage notwendig. Der Faktor Fernmetastasen konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund einer zu geringen Fallzeit, von im Maximalfall 10 Jahren und im Schnitt ca. 4-5 Jahren, statistisch nicht ausgewertet werden. Jedoch konnte mittels Univariateanalyse zwischen den klassischen Prognosefaktoren Tumorstadium, Lymphknotenstatus und UICC eine Korrelation mit der Überlebenszeit festgestellt werden. Bei der Korrelation zwischen Lymphknotenstatus und Überlebenszeit wurde ein signifikanter Zusammenhang sowohl mittels Univariateanalyse als auch mittels

Multivariatanalyse festgestellt. Somit kann das in dieser Arbeit verwendete Patientenkollektiv als repräsentativ angesehen werden.

4.3 EGFR-Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

In den letzten 20 Jahren wurden in verschiedenen Tumoren erhöhte Levels von EGFR und seinen Liganden nachgewiesen. In der hier vorliegenden Studie wurden sowohl Level/Score als auch die Intensität der Anfärbung im Tumorzentrum und der Invasionsfront beim kolorektalen Adenokarzinom ausgewertet.

Eine EGFR-Expression wurde in der Mehrzahl der Tumoren gefunden. 70% der Tumoren exprimierten EGFR unabhängig von der Lokalisation an der Invasionsfront oder dem Tumorzentrum. Überwiegend wurde Score 1 und 2 gefunden. Auch Spano et al., 2005 fanden in 97% der Tumoren eine EGFR-Expression. Allerdings wies er wesentlich höhere Expressionraten nach. Zu abweichenden Ergebnissen kamen Khorana et al., 2003 und All et al., 2007. Sie ermittelten wesentlich geringere Expressionsraten von EGFR in kolorektalen Karzinomen. Insgesamt lassen sich in der Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Reaktivität von EGFR in kolorektalen Adenokarzinomen finden (Radinsky et al., 1995; Messa et al., 1998, Goldstein et al., 2001). Diese Heterogenität der EGFR-Expressionsraten kann sicherlich zu einem Teil den verschiedenen Detektionsmethoden zugeschrieben werden. Jedoch beruhen die meisten Untersuchungen auf der quantitativen immunhistochemischen Markierung mit monoklonalen Antikörpern. Hier beruhen die divergierenden Ergebnisse möglicherweise auf unterschiedlichen Antikörpern, unterschiedlichen Fixationstechniken der untersuchten Gewebe und uneinheitlichen Score-Einteilungen (Goldstein et al., 2001; Spano et al., 2005; Khorana et al., 2003; All et al., 2007). Werden nun andere Detektionssysteme als die quantitative immunhistochemische Markierung mit monoklonalen Antikörpern, wie etwa die Bindung von Liganden, Blotting-Methoden oder Molekulartechniken verwendet, lässt sich in der überwiegenden Zahl der Studien ebenfalls eine EGFR-Expression in den kolorektalen Adenokarzinomen nachweisen (Messa et al., 1998; Komuta et al., 1995; Borlinghaus et al., 1993; Di Leo et al., 1992; Ito et al., 1990; Moorghen et al., 1990). Neben der Auswertung der EGFR-Expressionsraten wurden alle bekannten klinisch-pathologischen Parameter (Geschlecht, Lokalisation, pT, pN, pM, UICC, Grading, LVI, BVI und 5-Jahres-Überlebensrate) mit der EGFR-Expression sowohl an der

Invasionsfront als auch im Tumorzentrum korreliert. Ein signifikanter Zusammenhang konnte lediglich zwischen EGFR-Expression im Tumorzentrum sowie der Lokalisation und dem UICC-Stadium gefunden werden. Auch zwischen Stärke der EGFR-Expression und dem Grading wurde eine Korrelation gefunden. Bei der Lokalisation zeichnet sich eine Tendenz dahin gehend ab, dass im proximalen Kolon im Vergleich zum distalen Kolon mehr Tumorzellen im Tumorzentrum EGFR exprimieren. In der Mehrzahl der Fälle wird ein niedriges Score exprimiert. In der bisher veröffentlichten Literatur wird meist keine Differenz der EGFR-Expression in Bezug auf die Lokalisation beschrieben (Koenders et al., 1992; Spano et al., 2005; Goldstein et al., 2001). Eine Ausnahme stellt hier Koretz et al., 1990 dar, der im Sigmoideum eine höhere Expressionsrate von EGFR als im Rectum nachwies. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen niedrigem UICC-Stadium und geringer EGFR-Expression gefunden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch All et al., 2007, der eine vermehrte EGFR-Expression in hohen UICC-Stadien nachwies.

Es lassen sich zahlreiche Studien finden, die sich mit dem Zusammenhang zwischen EGFR- Expression und Prognose beschäftigt haben. Die Ergebnisse sind allerdings sehr heterogen (Nicholson et al., 2001). So wiesen einige Studien eine Korrelation zwischen EGFR-Expression und einer schlechteren Prognose nach (Khorana et al., 2003; Goldstein et al., 2001). Übereinstimmend mit anderen früheren Studien, welche keinen Einfluss der EGFR-Expression auf das Überleben der Patienten fanden, (Saeki et al., 1995; McKay et al., 2002; Doger et al., 2006; Cunningham et al., 2006) ist auch in dieser Arbeit weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und einer kürzeren Überlebenszeit nachgewiesen worden.

4.4 VEGF-Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

Sowohl an der Invasionsfront als auch im Tumorzentrum wurde eine große Anzahl positiver Tumorzellen, 71 % an der Invasionsfront und 78,1 % im Tumorzentrum, mit dem Score 3-4 gefunden. Die Intensität der Färbung war überwiegend schwach ausgeprägt. Es ließen sich keine Unterschiede, weder in der Reaktivität noch in der Färbeintensität, zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum erkennen. In anderen Studien wurde eine geringere Expression von VEGF gefunden (Doger et al., 2006;

Khorana et al., 2003). Auch Kaio et al, 2003 beschrieben eine geringere VEGF-Expression, wobei sie ebenfalls zwischen tiefster Invasionsstelle und oberflächlicher Lokalisation unterschieden.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle bekannten klinisch-pathologischen Parameter (Geschlecht, Lokalisation, pT, pN, pM, UICC, Grading, LVI, BVI und 5-Jahres-Überlebensrate) mit der VEGF-Expression korreliert. Gefunden wurde lediglich eine Korrelation zwischen VEGF-Expression an der Invasionsfront und der Lokalisation und dem UICC-Stadium. Übereinstimmend mit Bendardaf et al., 2008 zeichnet sich bei der Lokalisation eine Tendenz dahin gehend ab, dass in distalen Tumoren höhere VEGF-Expressionsraten zu finden sind. Die Ergebnisse lassen einen Unterschied in der molekularen Biologie zwischen rechter und linker Kolonseite vermuten. Die seitendifferenten Expressionsraten von VEGF könnten daraufhin deuten, dass der Tumorentstehung auf der linken Kolonseite andere Signalwege als auf der rechten Kolonseite zugrunde liegen (Bufill et al., 1990; Bleeker et al., 2000; Elsaleh et al., 2000; Gervaz et al., 2001). Bei der Korrelation der UICC-Stadien mit der VEGF-Expression an der Invasionsfront wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang sowohl zum Score als auch zur Färbeintensität gefunden. Da im untersuchten Patientenkollektiv lediglich zwei Patienten mit dem UICC-Stadium 4 vorhanden waren, ist die Interpretation dieses Ergebnisses mit Vorsicht vorzunehmen. In der Studie von Bendardaf et al., 2008 wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen der VEGF-Expression und dem UICC-Stadium ermittelt. Er beschränkte sich allerdings auf die Untersuchung der Invasionsfront. Weitere signifikante Zusammenhänge zwischen VEGF-Expression und klinisch-pathologischen Parameter wurden nicht nachgewiesen. Wie bereits in anderen Arbeiten publiziert, wurde auch in dieser Studie keine Korrelation zwischen der VEGF-Expression und der Überlebenszeit bzw. Prognose ermittelt (Zheng et al., 2003; Doger et al., 2006; Lee et al., 2000). Zusätzlich wurde in dieser Studie zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum unterschieden. Ähnlich unserer Untersuchung differenzierten Kaio et al, 2003 zwischen tiefster Invasionsstelle und der oberflächlichsten Stelle des Tumors. Er wiederum stellte einen signifikanten Zusammenhang zwischen VEGF-Expression in der tiefsten Tumorstelle und Lebermetastasen bzw. einer schlechteren Prognose fest. In Bezug auf die VEGF-Expression an der Tumoroberfläche ermittelte er ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang in Hinblick auf die Prognose. Die Diskrepanz dieser beiden Arbeiten

resultiert möglicherweise aus einer unterschiedlichen mikroskopischen und statistischen Auswertung. Auch wurden unterschiedliche Antikörper für die Färbung benutzt. Das Patientenkollektiv weicht ebenfalls deutlich voneinander ab. Im vorliegenden Kollektiv sind wesentlich weniger Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und Lebermetastasen enthalten. Auch Bendardaf et al., 2008 suchte nach einem Zusammenhang zwischen VEGF-Expression an der Invasionsfront und der Überlebenszeit. Anders als die vorliegende Arbeit und Kaio et al., 2003 untersuchte er die 10-Jahres-Überlebensrate. In seinem Kollektiv exprimierten Patienten, die an ihrem Tumorleiden verstarben, signifikant häufiger VEGF als Patienten, die die nächsten 10 Jahre überlebten.

4.5 Hif-1 α -Expression, Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose

Die Hif-1 α -Expression liegt an der Invasionsfront und im Tumorzentrum zwischen 30,9% bis 34,4%. Insgesamt lässt sich also eine geringe Hif-1 α -Expression und kein signifikanter Unterschied zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum erkennen. Auch Yoshimura et al., 2004 fand eine niedrig ausgeprägte Expressionsrate von Hif-1 α in kolorektalen Karzinomen, wobei er nicht zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum unterschied. Zu einem anderen Ergebnis wiederum kam Furlan et al., 2007. Er wies eine signifikante Überexpression (77%) in seinem Kollektiv nach. Der Ursprung dieser abweichenden Ergebnisse ist möglicherweise in einem ungleichen Patientenkollektiv zu finden. Welches in Bezug auf die eingeschlossenen Tumorentitäten unterschiedlich ist. So sind in der vorliegenden Studie lediglich Adenokarzinome untersucht worden, Furlan et al., 2007 jedoch schlossen unter anderem auch neuroendokrine Tumore mit ein. Bis heute sind die meisten Studien zur Hif-1 α -Expression immunhistochemische Analysen, welche zeigen, dass das Hif-1 α Protein in vielen primären Tumoren, wie unter anderem dem Ovar-, Cervix-, Endometriumkarzinom, dem Oligodendrogliom, dem NSCLC und in Tumormetastasen überexprimiert wird, mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist und ein Prädiktor für den Erfolg einer adjuvanten Therapie sein kann. (Semenza et al., 2003; Zhong et al., 1999; Sivridis et al., 2002; Birner et al., 2000; Birner et al., 2001a; Birner et al., 2001b; Giatromanolaki et al., 2001 Koukourakis et al., 2001). In der Literatur lässt sich eine geringe Anzahl an Studien finden, die sich mit der Hif-1 α -Expression beim kolorektalen Karzinom beschäftigen. Die bisher veröffentlichten

Ergebnisse sind widersprüchlich, was die Assoziation der Hif-1 α -Expression mit klinisch-pathologischen Parametern oder der Bedeutung der Hif-1 α -Expression in Bezug auf die Prognose des kolorektalen Karzinoms angeht (Kuwai et al., 2003; Krishnamachary et al., 2003; Yoshimura et al., 2004; Furlan et al., 2007, Furlan et al., 2008). Eine Unterscheidung zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum wurde nicht vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden alle bekannten klinisch-pathologischen Parameter (Geschlecht, Lokalisation, pT, pN, pM, UICC, Grading, LVI, BVI und 5-Jahres-Überlebensrate) mit der Hif-1 α -Expression korreliert. Es konnte weder zu den bedeutenden klinisch-pathologischen Parametern noch zu der Überlebenszeit ein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Auch Furlan et al, 2007 und Yoshimura et al., 2004 wiesen beim kolorektalen Karzinom keine signifikante Korrelation zwischen Hif-1 α -Expression und der Überlebenszeit nach. Beim Endometriumkarzinom hingegen wurde von Sivridis et al., 2002 für die Hif-1 α -Expression eine prognostische Aussagekraft ermittelt. Interessanterweise zeigt beim Lungenkarzinom die Hif-2 α -Expression eine bessere Aussagekraft als die Hif-1 α -Expression (Giatromanolaki et al., 2001). Beim Ovarialkarzinom hingegen zeigt die alleinige Hif-1 α -Überexpression keine prognostische Aussagekraft. In Kombination mit einem mutierten funktionslosen p53-Protein wurde die Hif-1 α Expression dann doch zu einem prognostischen Marker (Birner et al., 2001b). Wie oben beschrieben kann in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern oder zu der Überlebenszeit gefunden werden.

Dass in dieser Studie keine prognostische Bedeutung von Hif-1 α gefunden wurde, kann unterschiedliche Ursachen haben. Möglicherweise gibt es auch beim kolorektalen Karzinom wie beim Ovarialkarzinom eine bisher noch unbekannte Beziehung zwischen Hif-1 α und der Mutation in einem bestimmten Tumorsuppressorgen. Beim Ovarialkarzinom wird die Hif-1 α -Überexpression erst in Kombination mit einem mutierten p53-Protein zu einem prognostischen Marker. Oder es findet sich eine ähnliche Beziehung, allerdings zwischen Hif-2 α und der Prognose, wie beim Lungenkarzinom. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen der prognostischen Aussagekraft von Hif-1 α möglicherweise auf einen komplexen Zusammenhang zwischen dem Überlebensprogramm der Tumorzelle, übermittelt durch Hif-1 α , und dem genetischen Hintergrund von Tumorzellen, in dem die Hif-1 α -Aktivierung stattfindet, gefunden werden kann.

5. Zusammenfassung

Das Dickdarmkarzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen der Gegenwart. Somit kommt der Suche nach unabhängigen Prognosefaktoren eine bedeutende Rolle zu. Gelingt es, unabhängige Faktoren zu identifizieren, können Patienten mit hohem Risiko von Patienten mit niedrigem Risiko unterschieden werden und so individuellen Therapieschemata zugeführt werden. Zudem können bestimmte molekulare Veränderungen zum Angriffspunkt spezifischer Chemotherapeutika werden. Bei der Suche nach diesen klinisch bedeutsamen unabhängigen Prognosefaktoren spielt die Immunhistochemie eine bedeutende Rolle. In der hier vorliegenden Arbeit wurden bei 201 Patienten mit potentiell kurativer Resektion eines kolorektalen Adenokarzinoms die Expressionsraten von EGFR, VEGF und Hif-1 α untersucht und mit klinisch-pathologischen Parametern und der 5-Jahres-Überlebensrate korreliert. Dazu wurden Tissue microarrays angefertigt und immunhistochemisch mit Hilfe von Antikörpern verschiedene Faktoren dargestellt. Der EGFR wurde mit Hilfe des EGFR pharmDX™ Kit (DakoCytomation, Hamburg) dargestellt. VEGF mittels eines polyklonalen Kaninchen-Anti-VEGF (Zymed Laboratories Inc., USA), und Hif-1 α mit dem Maus-Anti-Hif-1 α (Chemicon International, Deutschland, USA, Kanada, Australien), einem monoklonalen Antikörper. Als Sekundärantikörper dienten EnVision™+ System-HRP, Rabbit, bzw. Mouse der Firma Dakocytomation. Erstmals wurde in dieser Studie bei allen drei Faktoren zwischen der Expression an der Invasionsfront und im Tumorzentrum unterschieden. Eine EGFR-Expression wurde unabhängig von Invasionsfront oder Tumorzentrum in der Mehrzahl der Tumoren gefunden. Bei der Lokalisation zeichnete sich eine Tendenz dahin gehend ab, dass im proximalen Kolon im Vergleich zum distalen Kolon eine größere Anzahl der Tumorzellen im Tumorzentrum EGFR exprimieren. Weiterhin zeigte sich eine Korrelation zwischen niedrigem UICC-Stadium und geringer EGFR-Expression. Für VEGF konnte ebenfalls in der Mehrzahl der Tumoren eine Expression gefunden werden, auch hier unabhängig von Invasionsfront und Tumorzentrum. In distalen Tumoren ließen sich höhere VEGF-Expressionsraten als in proximalen Tumoren nachweisen. Die Hif-1 α -Expression war gering ausgeprägt und zeigte wie EGFR und VEGF keinen signifikanten Unterschied zwischen Invasionsfront und Tumorzentrum. Zu den klinisch-pathologischen Parametern wurde kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen. Weder für

EGFR noch für VEGF oder Hif-1 α konnte ein signifikanter Zusammenhang zur 5-Jahres-Überlebensrate ermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Rahman WM, Mecklin JP, Peltomäki P (2006) The genetics of HNPCC: Application to diagnosis and screening *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 58: 208–220.
2. All HS Abd El, Mishriky AM, Mohamed FA (2007) Epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma: correlation with clinico-pathological prognostic factors. *Colorectal Dis* 10(2):170-8.
3. Alroy I, Yarden Y (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interaction. *FEBS Letters* 410:83-86.
4. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26(10):1626-34.
5. Atalay G, Cardoso F, Awada A, Piccart MJ (2003) Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Ann Oncol* 14(9):1346-63.
6. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62(14):4123-31.
7. Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Collan Y, Pyrhönen S (2008) VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res* 28(6B):3865-70.

8. Berlau J, Gleis M, Pool-Zobel BL (2004) Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal Bioanal Chem* 378:737–743.
9. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6):401-10.
10. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G (2000) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 60(17):4693-6.
11. Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rössler K, Prodingner A, Budka H, Hainfellner JA (2001a) Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 92(1):165-71.
12. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G (2001b) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7(6):1661-8.
13. Black WC, Ackerman LV (1965) Carcinoma of the large intestine as a late complication of pelvic radiotherapy. *Clin Radiol.* 16:278-81.
14. Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, Hofstra RM, Hermans J, Buys CC, Plukker JT (2000) Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol* 95(10):2953-7.
15. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, Lindor NM, McDonnell SK, Burgart LJ, Ahlquist DA, Podratz KC, Pittelkow M, Hartmann LC (1998) Increased Risk for Cancer in Patients with the Peutz-Jeghers Syndrome. *Annals of internal medicine* 128(11):896-899.

16. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328(6131):614-6.
17. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann J (2008) 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.
18. Borlinghaus P, Wieser S, Lamerz R (1993) Epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and epidermal growth factor receptor content in normal and carcinomatous gastric and colonic tissue. *Clin Investig* 71(11):903-7.
19. Böcker W, Denk H, Heitz U (2004) Pathology. Aufl.3, München, 744-746.
20. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 143(5):1255-62.
21. Bufill JA (1990) Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med* 113(10):779-88.
22. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V (2004) Intussusceptive Angiogenesis: Its Emergence, Its Characteristics, and Its Significance. *Developmental Dynamics* 231:474–488.
23. Cappuzzo F, Varella-Garcia 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 (2008) Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer*.99(1):83-9.

24. Carmeliet P (2005) VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* 69(3):4–10.
25. Ciardiello F, Caputo R, Troiani T, Borriello G, Kandimalla ER, Agrawal S, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G (2001) Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 93(2):172-8.
26. Ciardiello F, Tortora G (2001) A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7:2958-70.
27. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271(2):736-41.
28. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 264(33):20017-24.
29. Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, Marks C, Modjtahedi H(2006) Coexpression of the IGF-IR, EGFR and HER-2 is common in colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 28: 329-335.
30. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-45.
31. De Roock W, Piessevaux 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 (2008) 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.

32. Di Leo A, Linsalata M, Cavallini A, Messa C, Russo F (1992) Sex steroid hormone receptors, epidermal growth factor receptor, and polyamines in human colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 35(4):305-9.
33. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26(35):5705-12.
34. Doger FK, Meteoglu I, Tuncyurek P, Okyay P, Cevikel H (2006) Does the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 38(6):540-544.
35. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B (2000) Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 355(9217):1745-50.
36. Esplen MJ, Stuckless N, Berk T, Butler K, Gallinger S (2008) The FAP self-concept scale (adult form). *Familial Cancer.*
37. Fearon EF, Vogelstein B (1990) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
38. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2):851-8.
39. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4(3):336-40.

40. Finkenzeller G, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G (1997) Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene* 15:669 – 676.
41. Flood A, Rastogi T, Wirfält E, Mitrou PN, Reedy J, Subar AF, Kipnis V, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann M, Schatzkin A (2008) Dietary patterns as identified by factor analysis and colorectal cancer among middle-aged Americans. *Am J Clin Nutr* 88:176–84.
42. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
43. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor. *Mol Cell Biol* 16(9):4604-13.
44. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh D, Werner S (1995) Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes. *J Biol Chem* 270: 12607-12613.
45. Freeman HJ (2008) Colorectal cancer risk in Crohn's disease *World J Gastroenterol* 14(12): 1810-1811.
46. Fuchs CS, Giovannucci EDL, Colditz G, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer F, Willett WC (1999) Dietary Fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women *N Engl J Med* 340:169-76.
47. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 277(41):38205-11.

48. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C (2007) Up-regulation and stabilization of HIF-1 α in colorectal carcinomas. *Surgical Oncology* 16:25–27.
49. Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, Cerutti R, Bertoni F, Kwee I, Uccella S, Bertolini V, Chiaravalli AM, Capella C (2008) Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 39(10):1483-94.
50. Galiatsatos P, Foulkes WD (2006) Familial Adenomatous Polyposis *Am J Gastroenterol* 101:385–398.
51. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, Imperatore V, Ciardiello F (2007) Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene* 26: 3654-3660.
52. Gatalica Z, Torlakovic E (2008) Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Familial Cancer* 7:15–26.
53. Garcia JA (2006) HIFing the brakes: therapeutic opportunities for treatment of human malignancies. *Sci STKE* 337:25.
54. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B (2001) Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 44(3):364-73.
55. Giacomelli L, Gianni W, Belfiore C, Gandini O, Repetto L, Filippini A, Frati L, Aglianò AM, Gazzaniga P (2003) Persistence of epidermal growth factor receptor and interleukin 10 in blood of colorectal cancer patients after surgery identifies patients with high risk to relapse. *Clin Cancer Res* 9(7):2678-82.

56. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL (2001) Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *The British Journal of Cancer* 85(6):881 -890.
57. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN (1994) Ulcerative colitis and Crohn's disease: a extensive colitis. comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35:1590-1592.
58. Goldman E (1907) Growth of malignant disease in man and the lower animals with spezial reference to vascular system. *Proc R Soc Med* 1:1
59. Goldstein NS, Armin M (2001) 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.
60. Greene FL, Sobin LH (2008) The Staging of Cancer: A Retrospective and Prospective Appraisal *CA Cancer J Clin* 58:180-190
61. Grizzle WE, Manne U, Jhala NC, Weiss HL, Molecular Characterization of Colorectal Neoplasia in Translational Research (2001) *Arch Pathol Lab Med.* 125:91–98
62. Groen EJ, Annemieke Roos A, Muntinghe FL, Enting RH, de Vries J, Kleibeuker JH, Witjes MJH, Links TP, van Beek AP (2008) Extra-Intestinal Manifestations of Familial Adenomatous Polyposis. *Annals of Surgical Oncology* 15(9):2439–2450.
63. Gruber M, Simon MC (2006) Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 13:169–174.
64. Grünwald V, Hidalgo M (2003) Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer* 95:851-67.

65. Guetz GD, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere J-F, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY (2006) Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *British Journal of Cancer* 94:1823 – 1832.
66. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF (1996) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. *Cancer* 78(3):454-60.
67. Hamilton SR, Aaltonen LA (2000), Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. Lyon, 104-110.
68. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and Emerging Mechanisms Review of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86(3):353-64.
69. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1):57-70.
70. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M (2008) The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of Hif-1 α protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem* 284 (8): 5332-5342.
71. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB (2003) Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma *Nat Rev Cancer* 3(6):411-21.
72. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J (2002) Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What It Does and Doesn't Tell Us *J Natl Cancer Inst* 94(12):883-93.
73. Homey B (2008) Akute Nebenwirkung unter Therapie mit Biologics: Wie und Warum? *Hautarzt* 59:438-438.

74. Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417(6892):975-8.
75. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 5(12):1806-14.
76. Howard RA, Freedman DM, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A, Leitzmann MF (2008) Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study *Cancer Causes Control.* 19(9):939-53
77. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(14):7987-92.
78. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol.* 22 (20): 7004-14.
79. Hu Q, Dey AL, Yang Y, Shen Y, Jilani IB, Estey EH, Kantarjian HM, Giles FJ, Albitar M (2004) Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *American Cancer Society* 100:1884-1891.
80. Ito M, Yoshida K, Kyo E, Ayhan A, Nakayama H, Yasui W, Ito H, Tahara E (1990) Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 59(3):173-8.

81. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271(30):17771-8.
82. Jingjing L, Xue Y, Agarwal N, Roque RS (1999) Human Müller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(3):752-9.
83. Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K (2003) Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 64(1):61-73.
84. Karapetis CS, Khambata-Ford 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 (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 359(17):1757-65.
85. Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*. 4(1):2-5.
86. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, Poyraz BM, Celik G, Sen E, Savas H, Savas I (2004) The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 98(7):632-6.
87. Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(22):10705–10709.
88. Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM (2003) 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.

89. Koenders PG, Peters WH, Wobbes T, Beex LV, Nagengast FM, Benraad TJ (1992) Epidermal growth factor receptor levels are lower in carcinomatous than in normal colorectal tissue. *Br J Cancer* 65(2):189-92.
90. Komuta K, Koji T, Izumi S, Matsumoto T, Kohara N, Motojima K, Kanematsu T, Nakane PK (1995) Expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA in human colorectal carcinomas assessed by non-radioactive in-situ hybridization. *Eur J Surg Oncol* 21(3):269-75.
91. Koretz K, Schlag P, Möller P (1990) Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416(4):343-9.
92. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL (2001) Hypoxia Inducible Factor (HIF-1a and HIF-2a) Expression in Early Esophageal Cancer and Response to Photodynamic Therapy and Radiotherapy. *Cancer Res* 61: 1830-1832.
93. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor. *Cancer Research* 63:1138–1143.
94. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K (2003) Expression of hypoxia-inducible factor-1 α is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 105:176–181.
95. Labow SB, Hoexter B, Walrath DC (1979) Colonic adenocarcinomas in patients with ureterosigmoidostomies. *Dis Colon Rectum* 22(3):157-8.
96. Land SC, Tee AR (2007) Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signalling Motif. *J Biol Chem* 282 (28): 20534-43.

97. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2007) Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* 120(8): 1803-10.
98. Lange T, Guttman-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G (2003) VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem* 278(19):17164-9.
99. Langlois N, Walker LG, Smith I (1997) Expression of growth factor receptors is not a prognostic indicator in young patients with colorectal cancer. *J R Coll Surg Edinb* 42:98 –101.
100. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001) HER2 (neu) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1a (HIF-1a) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Molecular And Cellular Biology* 21(12):3995-4004.
101. Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc P-H (1999) Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 8:39-47.
102. Lee JC, Chow NH, Wang ST, Huang SM (2000) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *European Journal of Cancer* 36:748-753.
103. Lièvre A, Bachet JB, 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 (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 26(3):374-9.

104. Lipkin M., Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA (1999) Dietary Factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr* 19:545–86.
105. Lo HW, Hsu SC, Hung MC (2006) EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocation. *Breast Cancer Research and Treatment* 95:211–218.
106. Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, Berger R, Xue Q, McMahon LM, Manola J, Brugarolas J, McDonnell TJ, Golub TR, Loda M, Lane HA, Sellers WR (2004) mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and Hif-1-dependent pathways. *Nat. Med.* 10: 594-601.
107. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Peer J, Trent JM, Paul Meltzer S, Hendrix MJC (1999) Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells *in Vivo* and *in Vitro*: Vasculogenic Mimicry *Am J Pathol* 155:739–752.
108. Mathew A., Peters U , Chatterjee N, Kulldorff M, Sinah R (2004) Fat, Fiber, Fruits, Vegetables, and Risk of colorectal adenomas. *Int J Cancer* 108:287–292.
109. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733):271-5.
110. Mendelsohn J, Baselga J (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 1:2787-99.
111. McKay J.A., Murray L.J., Curran S., Ross V.G., Clark C., Murray G.I., Cassidy J., McLeod H.L (2002) Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer* 38:2258-2264.

112. McLeod HL, Murray GI (1999) Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 79(2):191–203.
113. Messa C, Russo F, Caruso MG, Di Leo A (1998) EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 37(3):285-9.
114. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Meller NPH, Risau W, Ullrich A (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846.
115. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP (2002) Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signalling. *Science* 296(5574):1886-9.
116. Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Watson AJ, Harris AL (1990) Epidermal growth factor receptors in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 10(3):605-11.
117. Musallam L, Ethier C, Haddad PS, Bilodeau M (2001) Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(6):1360-9.
118. Nakayama Y, Sako T, Shibao K, Okazaki K, Rempo N, Onitsuka K, Minagawa N, Akahane K, Nagashima N, Nagata N, Itoh H (2002) Prognostic value of plasma vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 22(4):2437-42.
119. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37(4):9-15.
120. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS (2003). Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10:1-21.

121. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K (1992) FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 52(20):5738-43.
122. Papetti M, Herman IM (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:947–970.
123. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European Journal of Cancer* 37:4–66.
124. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002 *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
125. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M (2003) Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort Study *Gut* 52:861–867.
126. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48:2422–2427.
127. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F (1997) Non-Small-Cell Lung Carcinoma Tumor Growth without Morphological Evidence of Neo-Angiogenesis. *American Journal of Pathology* 151: 5.
128. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G. (1997) VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272(11):7151-8.

129. Poon RTP , Ho JWY, Tong CSW, Lau C, Fan ST (2004) Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *British Journal of Surgery* 91:1354–1360.
130. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O' Rourke DM, Maity A (2003) PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res* 63(1):236-41.
131. Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiat J, Pages G, O' Rourke DM, Bernhard E, Maity A (2004) Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 15(11):4841-53.
132. Radinsky R, Risin S, Fan D, Dong Z, Bielenberg D, Bucana CD, Fidler IJ (1995) Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1(1):19-31.
133. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2(11):826-35.
134. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL (2004) Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 14(5):815-23.
135. Ribatti D, Vaccab A, Dammaccob F (2003) New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. *European Journal of Cancer* 39:1835–1841
136. Rivard JY, Bedard A, Dionne L (1975) Colonic neoplasms following ureterosigmoidostomy *J Urol* 113(6):781-6.

137. Rober-Koch-Institut (2008), In: Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends 6. überarbeitete Auflage. Berlin
138. Ruf G, Hopt H, Otto F, Deschler B, Werner M, Barke A, Langer M, Schäfer O, Moser E, Brink I, Henß H (2005) Kolorektales Karzinom. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Aufl. 4, Uni Freiburg, 10-11.
139. Rüschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F (1995) Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Archiv* 426:215-222.
140. Rüschoff J, Dietmaier W, Bocker T, S.Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstädter F (1998) Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispieldes kolorektalen Karzinoms. Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten? *Pathologe* 19:269–278.
141. Saeki T, Salomon DS, Johnson GR, Gullick WJ, Mandai K, Yamagami K, Moriwaki S, Tanada M, Takashima S, Tahara E (1995) 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.
142. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-8.
143. Safran Michal, Kaelin WG, Jr. (2003) HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J. Clin Invest* 111:779–783.
144. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3):183-232.

145. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269(38):23757-63.
146. Semenza GL (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 7(8):345-50.
147. Semenza GL (2002) Signal transduction to hypoxia inducible factor. *Biochemical Pharmacology* 64: 993-998.
148. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10):721-32.
149. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219(4587):983-5.
150. Seno H, Oshima M, Ishikawa T, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo M (2002) Cyclooxygenase 2- and Prostaglandin E2 Receptor EP2-dependent Angiogenesis in *Apc 716* Mouse Intestinal Polyps. *Cancer Research* 62:506–511.
151. Schulmann K, Stemmler S (2008) Hereditäres Kolonkarzinom. *Gastroenterologie* 3:112–118.
152. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 4:519-24.
153. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB (1998) Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83(4):1342-7.

154. Sinha R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB, and Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Project Team (2005) Meat, Meat Cooking Methods and Preservation, and Risk for Colorectal Adenoma. *Cancer Res* 65(17): 8034-41.
155. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2002) Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 95(5):1055-1063.
156. Sobin LH, Wittekind C (2002), UICC, TNM Classification of Malignant Tumours. Aufl.6, New York, 72-75
157. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY (1996) Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 120(6):944-7.
158. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, Attar A, Benichou J, Martin A, Morere JF, Raphael M, Penault-Llorca F, Breau JL, Fagard R, Khayat D, Wind P (2005) Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol* 16(1):102-8.
159. Staton CA, Chetwood ASA, Cameron IC, Cross SS, Brown NJ, Reed MWR (2007) The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma–carcinoma sequence in colorectal cancer. *Gut* 56:1426–1432.
160. Stintzing S, Heinemann V, Jung A, Moosmann N, Hiddemann W, Kirchner T (2009) Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern. *Dtsch Arztebl.* 106(12):262-6.
161. Thiersch C. (1865) Der Epithelialkrebs namentlich der Haut mit Atlas. *Surg Clin North* 47:1473.

162. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266(18):11947-54.
163. Toriola AT, Kurl S, Laukanenn JA, Mazengo C, Kauhanen J (2008) Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study *Eur J Epidemiol* 23:395–401.
164. Tsunoda A, Shibusawa M, Kawamura M, Marumori T, Kusano M, Ohta H (1997) Colorectal cancer after pelvic irradiation: case reports. *Anticancer Res* 17(1B):729-32.
165. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309(5967):418-25.
166. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G (2008). 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.
167. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico MG (1996) Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3 *Circulation* 93:1493-1495.
168. Volm M, Koomägi R, Mattern J (1997) Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J Cancer* 74(1):64-8.

169. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269(43):26988-95.
170. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5510-4.
171. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB (1996) Induction of Vascular Endothelial Growth Factor by Insulin-like Growth Factor-1 in Colorectal Carcinoma. *J Biol Chem* 271: 29483-29488.
172. Wells A (1999) EGF receptor. *Internat J of Biochemistry & Cell Biology* (1999) 31:637-643.
173. Woods MO, Williams P, Careen A, Edwards L, Bartlett S, McLaughlin JR, Banfield Younghusband H (2007) A New Variant Database for Mismatch Repair Genes Associated With Lynch Syndrome. *Hum Mutat* 28(7):669–673.
174. Wouters BG, Koritzinsky M (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Natural Reviews Cancer* 8: 851-864.
175. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 56(9):2013-6.
176. Yarden Y (2001a) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37(4):3-8.
177. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001b) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-37.
178. Yarden Y (2005) Grundlagen der Signaltransduktion. *Onkologie* 28(4):14–17.

179. Yoshimura H, Dhar DK, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, Kinugasa S, Tachibana M, Nagasue N (2004) Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α in colorectal cancer patients: Correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clinical Cancer Research* 10:8554–8560.
180. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61(16):6050-4.
181. Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q (2003) Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 9(6):1227-30.
182. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59(22):5830-5.
183. Zisman TL, Rubin DT (2008) Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14(17): 2662-2669.
184. Zlobec I, Vuong T, Hayashi S, Haegert D, Tornillo L, Terracciano L, Lugli A, Jass J (2007) 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.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation in vielfältigster Weise unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Herrn Prof. Dr. med. S.E. Baldus für die Überlassung des Themas und die stets zuverlässige und freundliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Frau Schneeloch und Frau S. Schreckenbergr für die freundliche und kompetente Hilfe während des praktischen Teils der Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. E. Bollschweiler für ihre kompetente Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung.

Christin Luczak für die großartige Zusammenarbeit. Gerne werde ich mich an die gemeinsame Zeit in der Pathologie, der Uni und die vielen Stunden am Telefon zurückerinnern.

Meinen Eltern und Großeltern, meinem Bruder, Tantchen Renate und natürlich meinem Andreas für die Unterstützung.