

Aus der  
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

# **Expression von Molekülen des Wnt-Signalweges in der hepatischen und lymphatischen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Kraus

2012

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

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

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Stoecklein

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Wesselborg

## Expression von Molekülen des Wnt-Signalweges in der hepatischen und lymphatischen Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

**Einleitung:** Nukleäres  $\beta$ -Catenin weist auf eine Aktivierung des Wnt-Signalweges, einem der wichtigsten intestinalen Stammzellsignalwege, hin. Durch den Wnt-Signalweg werden nicht nur eine Reihe wichtiger Zielgene für Differenzierung und Proliferation aktiviert, sondern auch die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Diese ist eine wichtige Voraussetzung für die Disseminierung und Metastasierung epithelialer Tumorzellen. Das Tumor-Suppressor-Protein APC ist an einem Proteinkomplex beteiligt, der für den Abbau von  $\beta$ -Catenin verantwortlich ist. Im Falle einer Mutation des Tumor-Suppressor-Genes, einer der frühesten genetischen Läsionen bei der Entstehung kolorektaler Karzinome, kann  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden, was zu einer nukleären Akkumulation führt. Wnt-Faktoren sind Proteine, die an dem transmembran Rezeptor Frizzled binden und dadurch eine Signalkaskade aktivieren, die letztendlich ebenfalls zu einer nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führt. **Material und Methode:** Insgesamt wurden 24 Primärtumore (PT) und deren autologe Lebermetastasen (HEP) sowie 20 dazugehörige Lymphknotenmetastasen (LK) mittels immunhistochemischer Analysen an Paraffinschnitten bezüglich der  $\beta$ -Catenin, APC und Wnt-1 Expression untersucht. Als Negativ-Kontrollen dienten irrelevante Isotyp-Antikörper. Die Visualisierung spezifisch gebundener Antikörper erfolgte mit der ABC-Methode (Vectastain-Kit<sup>®</sup>, Vector Laboratories) und Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen. Bei den Primärtumoren wurden die Zentralen Areale und die Invasionsfront getrennt ausgewertet. Für die Bestimmung der Anzahl positiver Tumorzellen diente eine Skala von 0-100% in 10% Schritten. Die Färbeintensität wurde von 0-3+ kategorisiert. Zusätzlich wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele (0-12 Punkte) verwendet. **Ergebnisse:** Nukleäres  $\beta$ -Catenin war im Bereich der Invasionsfront der Primärtumoren signifikant hochreguliert ( $p < 0,001$ ). In Bezug auf die zentralen Tumoranteile zeigte sich in den hepatischen und lymphatischen Metastasen ein homogenes Expressionsmuster. Im Vergleich zu den Normalmukosen war die Expression von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma signifikant hochreguliert (PT  $p < 0,001$ , HEP  $p = 0,001$ , LK  $p = 0,017$ ). Das membranäre Expressionsmuster zeigte sich in allen Geweben homogen. Die Expression von Wnt-1 war in den Lebermetastasen signifikant vermindert ( $p = 0,003$ ). APC war in den Primärtumoren ( $p = 0,022$ ), Leber- ( $p = 0,006$ ) und Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,012$ ) signifikant vermindert exprimiert. **Diskussion:** Eine Charakterisierung der Proteinexpression aller drei Moleküle zusammen an demselben Patientenkollektiv wurde bis jetzt nicht beschrieben. Mit Hilfe dieser Studie war es möglich, das Expressionsmuster dieser drei Moleküle kontextabhängig zueinander näher darzustellen. Die Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass sich disseminierte Tumorzellen während der Ausbildung zu Metastasen an ihre jeweilige spezifische Tumorumgebung (Microenvironment) anpassen und somit ein paralleles Tumor-Progressionsmodell unterstützen.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.2 Das kolorektale Karzinom .....	2
1.2.1 Epidemiologie .....	2
1.2.2 Inzidenz, Ätiologie und Prädisposition .....	2
1.2.3 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms .....	6
1.2.4 Lokalisation .....	6
1.2.5 Histopathologische Klassifikation und Grading .....	6
1.2.6 Tumorstaging (TNM-Klassifikation) .....	7
1.2.7 Diagnostik und Therapie .....	8
1.2.8 Prognose .....	11
1.3 Der Wnt-Signalweg .....	12
1.3.1 Grundlagen .....	12
1.3.2 Überblick .....	13
1.3.3 Der Wnt-Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese .....	15
1.4. Ziel der Studie .....	17
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Patienten .....	18
2.2 Gewebeaufbereitung .....	18
2.3 Immunhistochemie .....	18
2.3.1 Primärantikörper und Sekundärantikörper .....	21
2.3.2 Durchführung der Immunhistochemie .....	22
2.4 Auswertung .....	23
2.4.1 Statistische Analysen .....	23

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1 $\beta$ -Catenin.....	25
3.2 Wnt-1.....	31
3.3 APC.....	33
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>35</b>
4.1 $\beta$ -Catenin.....	35
4.2 Wnt-1.....	37
4.3 APC.....	38
4.4 Schlussfolgerung .....	39
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>44</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>56</b>
<b>7. Lebenslauf</b> .....	<b>57</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung

In den westlichen Industrieländern sind die Mehrzahl aller Krebsneuerkrankungen und krebsbezogenen Todesfälle auf maligne Tumoren epithelialen Ursprungs zurückzuführen. Bei frühzeitiger Diagnose können Karzinome heute durch eine vollständige operative Entfernung des Primärtumors kurativ behandelt werden. Dennoch kann es immer wieder zu einer Erkrankung des Gesamtorganismus kommen, wobei nach der systemischen Ausbreitung von bösartigen Tumorzellen Metastasen entstehen, die in der Mehrheit der Fälle zum letalen Ausgang der Tumorerkrankung führen [1].

Tumorstadium und systemische Ausbreitung sind morphogenetische Prozesse, welche sich durch fortschreitende Veränderungen in der Struktur des Tumors und der Differenzierung auszeichnen. Zelluläre Veränderungen, die solchen Prozessen zu Grunde liegen, weisen Ähnlichkeiten mit zellulären Veränderungen in der Embryonalentwicklung auf [2], [3]. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass wichtige Signalwege, welche die Morphogenese der frühen Embryogenese regulieren, bei vielen Karzinomen aktiviert sind [4]. In den kolorektalen Adenokarzinomen konnten solche morphogenetischen Veränderungen klar identifiziert werden. So führt eine entscheidende Alteration in den meisten kolorektalen Karzinomen zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens APC (*adenomatous polyposis coli*), was in der Folge eine nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin bewirkt.  $\beta$ -Catenin ist der Haupteffektor des Wnt-Signalweges und leitet als Transkriptionsfaktor genetische Programme ein, welche bei epithelialen Zellen den Wechsel zu einem dedifferenzierten, mesenchymalen Phänotyp bewirken können. Dieser Prozess, der in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt, scheint auch bei der Metastasierung ein entscheidender Schritt zu sein [5].

In der vorliegenden Studie sollen wichtige Effektorproteine des Wnt-Signalweges in der synchronen hepatischen und lymphatischen Metastasierung kolorektaler Karzinome bestimmt werden. Insgesamt wurden 24 Primärtumore (PT) und deren autologe Lebermetastasen (HEP) sowie 20 dazugehörige Lymphknotenmetastasen (LK) mittels immunhistochemischer Analysen an Paraffinschnitten bezüglich der  $\beta$ -Catenin-, APC- und Wnt-1-Expression untersucht.

## **1.2 Das kolorektale Karzinom**

Das kolorektale Karzinom entwickelt sich sporadisch, in Zusammenhang mit hereditären Karzinom-Syndromen oder auf dem Boden chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Als Grundlage für die Entwicklung der kolorektalen Karzinome steht die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Morson [6]; auch konnten in den letzten Jahren verschiedenste molekulare Veränderungen nachgewiesen werden. Die Prognose wird durch individuelle Faktoren beeinflusst: Durch die Art der Behandlung, durch das Tumorstadium sowie von der Expertise der behandelnden Ärzte [7].

### **1.2.1 Epidemiologie**

Das kolorektale Karzinom ist der dritthäufigste Tumor weltweit und die vierthäufigste krebserkrankte Todesursache. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erkranken weltweit jährlich 945.000 Menschen, 492.000 sterben an den Folgen der Erkrankung [8]. Es zeigt sich, dass das kolorektale Karzinom häufiger in westlichen Industriestaaten vorkommt als in Entwicklungsstaaten. Hier ist es die zweithäufigste Tumorerkrankung; das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms für die Allgemeinbevölkerung beträgt 5%. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in den USA bei über 60%, in den Entwicklungsstaaten unter 40% [8]. Nach dem Mamma-Karzinom ist es das zweithäufigste Karzinom der Frau, nach dem Prostata- und Bronchialkarzinom ist es das dritthäufigste Karzinom des Mannes.

Selten wird die Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert, weniger als 10% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre [9]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 67 Jahren für Männer und 72 Jahren für Frauen. Männer sind insgesamt etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Mortalitätsrate beträgt für Männer 32 und für Frauen 21 auf 100.000 Einwohner. Insgesamt starben 2005 etwa 29.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom in Deutschland [10]. Die epidemiologischen Basiszahlen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

### **1.2.2 Inzidenz, Ätiologie und Prädisposition**

In den meisten Fällen ist die Ätiologie der kolorektalen Karzinome nicht geklärt [7]. Tabelle 2 gibt eine Übersicht der Risikofaktoren und familiären Syndrome des kolorektalen Karzinoms.

Tabelle 1. Epidemiologische Basiszahlen zum kolorektalen Karzinom [9].

	Kollektiv	Frauen	Männer
<b>Neuerkrankungen</b>			
Jährl. Neuerkrankungen Deutschland 2000 (ICD 10: C18–21) <sup>a</sup>		34 175	32 602
Anteil an allen Krebsneuerkrankungen 2000 (ICD 10: C18–21) <sup>a</sup>		17,6%	16,3%
Inzidenz Weltstandard (ASR; Saarland, ICD 9: 153–154) <sup>b</sup>	2000	30,3 je 100000	44,2 je 100000
Inzidenz Weltstandard (ASR; TRM ICD 10: C18–21) <sup>c</sup>	2000	23,9 je 100000	40,0 je 100000
<b>Alter</b>			
Medianes Erkrankungsalter <sup>c</sup>	1998-2003	73,1 Jahre	68,0 Jahre
Erkrankungsalter (10% jünger als/ 10% älter als) <sup>c</sup>	1998-2003	54,7/86,5 Jahre	54,2/81,9 Jahre
Medianes Sterbealter (tumorbedingt verstorben) <sup>c</sup>	2000	78,5 Jahre	72,4 Jahre
<b>Überleben</b>			
5- / 10-Jahres-Überlebensrate (relatives Überleben, SEER) <sup>d</sup>	1990	61,7% / 56,5%	62,2% / 57,5%
5- / 10-Jahres-Überlebensrate (relatives Überleben, TRM) <sup>e</sup>	1988-2004	61,5% / 52,3%	62,4% / 51,7%
5- / 10-Jahres-Überlebensrate (Gesamtüberleben, TRM) <sup>e</sup>	1988-2004	52,1% / 37,2%	51,8% / 35,1%
<b>Prävalenz</b>			
5-Jahres-Prävalenz Deutschland <sup>c</sup>	1988-2004	3,4fache d. jährl. Neuerkrankungen	3,4fache d. jährl. Neuerkrankungen
Neuerkrankungen		→116 000	→110 000
<b>Sterbefälle</b>			
Jährliche Sterbefälle in Deutschland (ICD 10: C18–21) <sup>f</sup>	2003	14 598	13 991
Anteil an krebserkrankten Sterbefällen in Deutschland (ICD 10: C18–21) <sup>f</sup>	2003	14,8%	12,6%
Mortalität Weltstandard (ASR; Saarland, ICD 9: 153–154) <sup>b</sup>	2000	13,9 je 100000	20,7 je 100000
Mortalität Weltstandard (ASR; TRM ICD 10: C18–21) <sup>c</sup>	2000	10,9 je 100000	19,9 je 100000

<sup>a</sup> Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (2004) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends (4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe)

<sup>b</sup> Krebsregister Saarland, www.krebsregister.saarland.de

<sup>c</sup> Tumorregister München (TRM), epidemiologische Auswertung im Internet (Typ E bzw. Typ A zu epidemiologische Daten). Der DCO-Anteil beträgt 8,6%.

<sup>d</sup> Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK (eds) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2001/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2001/), 2004

<sup>e</sup> Tumorregister München (TRM), Survivalanalyse (Typ S) im Internet (nur für kooperierende Kliniken)

<sup>f</sup> Statistisches Bundesamt, Fachserie 12, Reihe 4, 2005: Todesursachen in Deutschland 2003

ASR steht für „Age Standardised Rate“

Weltweit finden sich große Unterschiede in der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms. Die höchsten Inzidenzraten werden in Europa und Nordamerika, die niedrigsten in afrikanischen und asiatischen Ländern beobachtet. Als Hinweis auf das Vorliegen von lebensstil- und ernährungsbedingten Ursachen wird gewertet, dass die erste Generation von Einwanderern aus einem Niedriginzidenzgebiet in ein Hochinzidenzgebiet bereits das gleiche Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms aufweisen, wie die Bevölkerung des Einwanderungslandes [8], [9]. Eine Ernährung reich an Ballaststoffen, Gemüse und Obst führt zu einem ernährungsbedingt erniedrigten Risiko. Hoher Fleisch- und Alkoholkonsum erhöhen hingegen das Risiko. Auch konnte gezeigt werden, dass eine an Folsäure und Kalzium reiche Nahrung mit einem erniedrigten Risiko einhergeht [7-9].

Ungefähr 20% der Patienten mit einem kolorektalem Karzinom weisen in der Anamnese eine familiäre Belastung auf, jedoch ohne die Kriterien eines hereditären kolorektalen Karzinoms zu erfüllen [7], [8]. Ist ein erstgradiger Verwandter an einem kolorektalen Karzinom erkrankt, ist das Risiko etwa 1,7fach erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung; andere Autoren geben sogar ein 2,3fach erhöhtes Risiko an [9]. Das Risiko steigt weiter mit der Zahl betroffener erstgradiger Verwandter und jüngerem Erkrankungsalter. Das mit Abstand höchste Erkrankungsrisiko haben Patienten mit hereditären Syndromen. Etwa 90% aller Fälle sind als sporadische Erkrankungen anzusehen, ungefähr 5-10% entstehen auf dem Boden hereditärer Syndrome und 1-2% liegen chronisch entzündliche Darmerkrankungen zugrunde [7-9].

Zu den hereditären Syndromen zählen eine Vielzahl von Erkrankungen, wie die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma*, HNPCC). Zusätzlich bestehen noch hamartöse Polyposis-Syndrome, die ebenfalls mit einem erhöhten Risiko der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms einhergehen, welches jedoch deutlich geringer ist [7-9], [11], [12]. Hierzu zählen das Peutz-Jeghers-Syndrom, die juvenile Polyposis und das Cowden-Syndrom. Hiervon abzugrenzen sind die nicht-erblichen Polyposis-Syndrome wie das Cronkhite-Canada-Syndrom, die entzündlichen bzw. lymphoiden Polyposis-Erkrankungen und die Pneumatosis cystoides intestinalis. Diese gehen nicht mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome einher [9].

Der Begriff der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ wurde 1975 von Morson und Mitarbeitern eingeführt und schlägt eine schrittweise morphologische Entwicklung von kolorektalen Karzinomen vor, in Zusammenhang mit der Akkumulation von genetischen Veränderungen [6], [13], [14].

Tabelle 2. Risikofaktoren und Entstehungsursachen des kolorektalen Karzinoms [9].

**Sporadische kolorektale Karzinome (88-94%)**

Alter, männliches Geschlecht, Cholezystektomie, hormonelle Faktoren (Nullipara, späte Erstschwangerschaft, frühe Menopause), fett- und fleischreiche Ernährung, Adipositas, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Alkoholabusus, Strahlentherapie, Asbestose

Kolorektale Polypen, bekanntes kolorektales Karzinom (1,5-3fach erhöhtes Risiko für Rezidiv in den ersten 5 Jahren), Dünndarm-, Endometrium-, Mamma- oder Ovarialkarzinom

Positive Familienanamnese (20%):

- Verwandte 1. Grades 2,3 fach erhöhtes Risiko
- Zwei oder mehr Verwandte 1. Grades 4,25fach erhöhtes Risiko
- Erkrankungsalter <45 Jahre 3,9fach erhöhtes Risiko
- Kolorektale Adenome 2fach erhöhtes Risiko

**Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (1-2%)**

Colitis ulcerosa

Morbus Crohn

**Hereditäre kolorektale Karzinome (5-10%)**

Polyposis-Syndrome: Familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP), Gardner-Syndrom, Turcot-Syndrom, attenuierte FAP, Flat-Adenom-Syndrom

Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Hamartöse Polyposis-Syndrome: Peutz-Jeghers-Syndrom, juvenile Polyposis, Cowden-Syndrom

Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt die bei kolorektalen Karzinomen beobachtete Entwicklung des invasiven Karzinoms über verschiedene adenomatöse Zwischenstadien über einen Zeitraum von 10-15 Jahren. 1990 ordneten dann Fearon und Vogelstein erstmals Mutationen verschiedener Gene einzelnen histologischen Entwicklungsstufen der kolorektalen Karzinogenese zu [15]. In der Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms wird die chromosomale Instabilität (CIN) von der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) unterschieden.

CIN findet sich bei etwa 85% aller kolorektalen Karzinome. Diesen Tumoren liegt wie der FAP als erster Schritt der molekularen Karzinogenese meist eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC (*adenomatous polyposis coli*) zu Grunde. Die Hauptfunktion des APC liegt in der Regulation des Proto-Onkogens  $\beta$ -Catenin. Mikrosatelliteninstabile Tumoren weisen einen Defekt im DNA-Reparatursystem auf [13]. Des Weiteren fand sich in diesen Tumoren wegen eines defekten *Mismatch-Repairs* eine Vielzahl von Genmutationen, die durch Nukleotidverluste bestimmter kodierter Genabschnitte (Exon) zu Leserahmenverschiebungen (*Frameshift*-Mutationen) führen. Entsprechende Mutationen wurden in Wachstum- und Apoptose-regulierenden Genen nachgewiesen [9].

### 1.2.3 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Die Einteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach der Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation [16] und den Kriterien der *International Union Against Cancer (Union Internationale Contre Cancer, UICC)* [17]. Zur Beurteilung werden die Lokalisation des Tumors, dessen histomorphologischer Typ und sein Differenzierungsgrad, die anatomische Ausbreitung des Tumors sowie das potentielle Vorhandensein von Tumorgewebe nach chirurgischer Therapie herangezogen.

### 1.2.4 Lokalisation

Kolorektale Karzinome treten im Dickdarm gehäuft im Rektosigmoid (mindestens 55%) auf, dabei befinden sich 40% im Rektum. Anatomisch haben Rektum und Colon sigmoideum keine exakte Grenze. Man definiert die Rektumlänge gemessen mit einem starren Rektoskop ab der Linea dentata mit 12 cm, ab der Anokutanlinie mit 16 cm. Für die Definition Rektumkarzinom entscheidend ist der mit dem starren Rektoskop ab Linea dentata gemessene untere Tumorrand. Ein Karzinom wird auch dann noch als Rektumkarzinom bezeichnet, wenn die Tumormasse zwar im Sigma lokalisiert ist, der Unterrand aber in das Rektum hineinreicht [18]. An zweiter Stelle sind proximale Kolonkarzinome zu nennen mit 13% im Bereich des Zökums und 9% im Colon ascendens. Selten sind die Tumoren im Colon transversum (11%) und im Colon descendens (6%) zu beobachten. Mehrfachkarzinome liegen nur in 2-3% der Fälle vor. In den letzten Jahrzehnten ist eine Umverteilung der Adenome und Kolonkarzinome über den gesamten Dickdarm aufgefallen. Altersabhängig (>70 Jahre) und geschlechtsbezogen (häufiger Frauen) findet sich eine Inzidenzzunahme rechtsseitiger Kolonkarzinome bei gleichzeitiger Inzidenzabnahme rektosigmoidaler Neoplasien [9].

### 1.2.5 Histopathologische Klassifikation und Grading

Die Adenokarzinome stellen mit etwa 90% den histologischen Haupttyp des kolorektalen Karzinoms dar. An zweiter Stelle folgen die muzinösen Adenokarzinome mit einer Häufigkeit von 5-10%. Alle anderen histologischen Typen sind selten (Tabelle 3) [9].

Nach ihrem Differenzierungsgrad werden gut (G1), mäßig (G2), schlecht differenzierte (G3) und undifferenzierte Karzinome (G4) unterschieden (siehe Tabelle 4). Ausschlaggebend ist der prozentuale Anteil der vorhandenen Drüsenstrukturen. Gut differenzierte Karzinome (G1) lassen in >95% der Fälle ein glanduläres Baumuster erkennen.

Tabelle 3. Histopathologische Klassifikation der kolorektalen Karzinome [9].

Adenokarzinome	85-90%
Muzinöse Adenokarzinome	5-10%
Siegelringzellkarzinome	1%
Plattenepithelkarzinome	
Adenosquamöse Karzinome	
Medulläre Karzinome	
Undifferenzierte Karzinome	
Sehr seltene Tumoren sind: Karzinoide, Lymphome, maligne und benigne Bindegewbstumoren	

Mäßig differenzierte Karzinome (G2) zeigen in 50-95% der Fälle eine Drüsenstruktur, gering differenzierte Karzinome (G3) in nur noch 5-50% der Fälle und bei undifferenzierten Karzinomen (G4) liegt der glanduläre Anteil <5%. Hier finden sich meist hochgradig pleomorphe, solide Tumoren mit Polaritätsverlust der Zellkerne und irregulär angeordneten Tumorzellnestern. Muzinöse Adenokarzinome und Siegelringzellkarzinome stuft man als gering differenzierte Karzinome (G3) ein [16], [17].

Im Dokumentationssystem der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Tumorzentren (ADT) ist in Übereinstimmung mit der Internationalen Histologischen Klassifikation der WHO zusätzlich die Zusammenfassung von G1 und G2 zu einem niedrigen Malignitätsgrad („*low grade*“) und von G3 und G4 zu einem hohen Malignitätsgrad („*high grade*“) vorgesehen [19].

Tabelle 4. Histopathologisches Grading.

#### **Histopathologisches Grading (G)**

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

### **1.2.6 Tumorstaging (TNM-Klassifikation)**

Die Therapie sowie die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist entscheidend davon abhängig, in wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist [7]. Deswegen wurden Systeme für die Stadieneinteilung entwickelt. Früher wurde die Einteilung nach Dukes verwendet [20]. Diese Einteilung wurde zu Gunsten der wesentlich differenzierten Systeme der TNM-Klassifikation und der UICC aufgegeben (siehe Tabelle 5 und 6) [9]. Die klinische Klassifikation beruht auf den vor der Therapie erhobenen Befunden, insbesondere Endoskopie, Ultraschall und CT (cTNM). Die pathologische Klassifikation pTNM erfolgt nach Resektion und histologischer Aufarbeitung. Ein nach neoadjuvanter Therapie erhobenes

Tumorstadium wird durch das Präfix y gekennzeichnet (yTNM); endosonographische Befunde werden mit dem Präfix u gekennzeichnet (uTN) [16].

Nach der lokalen Tiefeninfiltration des Primärtumors in die kolorektalen Wandschichten erfolgt die Einteilung des Primärtumorstadiums (T) (siehe Tabellen 5 und 6). Außerdem gibt es eine Reihe von weiteren morphologischen Kriterien, die eine prognostische Aussage zulassen, hierzu zählen zum Beispiel eine Invasion lymphatischer (L) und venöser Gefäße (V). Diese führen zu einer Verschlechterung der Prognose [9].

Kolonkarzinome metastasieren lymphogen und hämatogen. Die Lymphabflusswege des Kolons verlaufen entlang der großen Arterien. Die Inzidenz einer lymphatischen Tumorinvasion ist variabel und steigt mit dem Tumorstadium und Tumorgrad an [21], [22].

Um eine pathologische Diagnostik erreichen zu können, müssen 12 oder mehr Lymphknoten aus dem perikolischen bzw. perirektalen Fettbindegewebe untersucht werden. Metastasen, die außerhalb der regionären Lymphknoten gefunden werden, werden als Fernmetastasen dokumentiert (pM1 LYM) [23], [24].

Das am häufigsten betroffene Zielorgan der hämatogenen Metastasierung ist die Leber (70-80%) entsprechend dem venösen Abfluss über das Pfortadersystem. Zweithäufigster Metastasierungsort ist die Lunge (10-35%), gefolgt von Skelettmetastasen, Befall der Nebennieren und des Gehirns. In 17-32% der Fälle beobachtet man eine peritoneale Aussaat. Die Wahrscheinlichkeit einer syn- bzw. metachronen Metastasierung wird durch verschiedene Faktoren des Primärtumors beeinflusst. Die Inzidenz steigt dabei mit zunehmender T- und N-Kategorie und abnehmender Tumorzellendifferenzierung [9].

Das Fehlen oder Vorhandensein eines Residualtumors nach chirurgischer Intervention wird durch die R-Klassifikation beschrieben (siehe Tabelle 7).

### **1.2.7 Diagnostik und Therapie**

Kolorektale Karzinome zeigen überwiegend erst im fortgeschrittenen Tumorstadium klinische Symptome. Insbesondere proximal gelegene Tumoren sind auf Grund der weichen Stuhlkonsistenz lange Zeit asymptomatisch. Änderungen der Stuhlgewohnheiten, rektale Blutungen, Tenesmen und Gewichtsverlust können auf ein Kolonkarzinom hinweisen. Ein Subileus, eine Blutungsanämie oder lokale Schmerzen sind Spätsymptome im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf.

Tabelle 5. TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms [17].

**T Primärtumor**


---

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0 Kein Anhalt für Primärtumor
Tis Carcinoma in situ
T1 Tumor infiltriert Submukosa
T2 Tumor infiltriert Muscularis propria
T3 Tumor infiltriert die Muscularis propria hindurch in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4 Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

---

**N Regionäre Lymphknoten**


---

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1 Metastasen in ein bis drei regionären Lymphknoten
N2 Metastasen in vier oder mehr regionären Lymphknoten
pN0 Regionäre Lymphadenektomie und histologische Untersuchung üblicherweise von zwölf oder mehr Lymphknoten.

---

**M Fernmetastasen**


---

MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0 Keine Fernmetastasen
M1 Fernmetastasen

---

Tabelle 6. Stadiengruppierung nach UICC, TNM-Klassifikation und Dukes im Vergleich [9].

UICC	TNM	Dukes
Stadium 0	Tis N0 M0	
Stadium I	T1, T2 N0 M0	Dukes A
Stadium II	T3, T4 N0 M0	Dukes B
Stadium III	jedes TN1, N2 M0	Dukes C
Stadium IV	jedes TN1, N2 M1	Dukes D

Tabelle 7. R-Klassifikation.

**Residualtumor (R)**


---

RX	Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor am Resektionsrand
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

---

Die Koloskopie stellt den Goldstandard in der Diagnose des kolorektalen Karzinoms dar [7]. Zusätzlich soll eine gründliche körperliche Untersuchung, eine Sonographie des Abdomens sowie ein Röntgen-Thorax durchgeführt werden. Die Notwendigkeit einer routinemäßigen präoperativen Computertomographie (CT) steht zur Diskussion, da sie die chirurgische Therapie nur in wenigen Fällen beeinflusst und für den Patienten eine doch nicht unerhebliche Strahlenexposition zur Folge hat [25].

Die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) hat Empfehlungen für die präoperative Ausbreitungsdiagnostik bei Kolonkarzinomen formuliert. Folgende Untersuchungen wurden dabei als obligater Bestandteil der präoperativen Diagnostik zusätzlich zur rektal-digitalen Untersuchung und kompletten Koloskopie mit Biopsie angesehen: Die Sonographie des Abdomens, die Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen und die CEA-Bestimmung [18].

Bei einem Karzinom des Kolons ohne Fernmetastasen besteht die Möglichkeit, einen kurativen Therapieansatz bestehend aus der operativen Beseitigung des Primärtumors *en bloc* mit dem Lymphabflussgewebe durchzuführen. Lokal eingeschränkte Therapieverfahren wie endoskopische Polypektomien können in Ausnahmefällen nur beim *Low-risk*-Karzinom (pT1, G1-2, keine Lymphgefäßinfiltration) empfohlen werden [26], [27]. Im Allgemeinen wird jedoch bei lokal begrenztem, nicht metastasiertem Tumor primär eine R0-Resektion des Tumors angestrebt. Je nach Stadium ist anschließend über eine adjuvante Chemotherapie zu entscheiden [9].

Bei gefährdeten Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand kann eine Diskontinuitätsresektion nach Hartmann durchgeführt werden [18].

Bei vollständiger Entfernung sowohl synchroner als auch metachroner hepatischer und/oder pulmonaler Metastasen stellt dies für einen Teil der Patienten eine Heilungschance dar [28]. Die Entscheidung über das therapeutische Vorgehen beginnt daher mit der Beurteilung der Resektabilität vorliegender Metastasen. Bei R0-resektablen Metastasen sollte eine primäre Operation angestrebt werden. Ist dies nicht der Fall, sollte primär eine systemische Chemotherapie erfolgen [18].

In bis zu 15% der Fälle ist wegen ausgedehnter Metastasierung bzw. schlechtem Allgemeinzustand und in etwa 5% der Fälle wegen lokaler Inoperabilität eine kurative Operation nicht möglich. Wenn bei peritonealer Aussaat bzw. nicht kurativ resektablen Fernmetastasen eine radikale Resektion des Primärtumors nicht möglich ist, sollte dennoch versucht werden, den Tumor so vollständig wie möglich zu reseziieren, um weiteren Tumorkomplikationen wie Blutung, Tumorzerfall, Perforation oder Ileus vorzubeugen [9].

In ausgewählten Fällen kann bei einer peritonealen Aussaat eine hypertherme intraperitoneale Chemotherapie durchgeführt werden [11], [12]. Nur wenn der Allgemeinzustand eine größere Operation nicht zulässt oder die lokale Tumorausdehnung als inoperabel einzustufen ist, bleibt als letzte Möglichkeit die Anlage einer inneren Umgehungsanastomose oder eines vorgeschalteten Anus praeter.

T1/T2-Kolonkarzinome haben bei negativen Lymphknotenstatus und Fehlen von Fernmetastasen (UICC-Stadium I) eine ausgezeichnete Prognose, weshalb in diesen Stadien eine adjuvante Nachbehandlung nicht indiziert ist [18]. Bei Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im Stadium II ist eine adjuvante Chemotherapie in der Regel nicht indiziert, da mit 5-Jahres-Überlebensraten um 80% gerechnet werden darf und sich kein signifikanter Überlebensvorteil durch eine postoperative adjuvante Chemotherapie zeigt [29], [30]. Eine adjuvante Therapie ist bei Patienten mit Lymphknotenbefall (T1-T4, N1-2, M0) und fehlenden Kontraindikationen grundsätzlich indiziert [31].

Die Radiotherapie hat in der Primärtherapie des Kolonkarzinoms praktisch keine Bedeutung. Nur sehr selten ergibt sich bei T4-Tumoren die Indikation zu einer Radiotherapie. In späten fortgeschritten metastasierten Krankheitsstadien hat die Radiotherapie aber einen großen Stellenwert. Hier sind besonders Skelett- und Hirnmetastasen zu nennen [9].

Bei Patienten mit Rektumkarzinom soll die Radiotherapie die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidives verringern und das Überleben verlängern [7]. Standardmäßig ist die Indikation zur adjuvanten Radiochemotherapie bei Patienten mit rektalem Karzinom UICC-Stadium II und III (T1-T4, N1-N2) gegeben, nach neoadjuvanter Radiochemotherapie ist eine adjuvante Chemotherapie unabhängig vom postoperativen Tumorstadium indiziert [18]. Eine neoadjuvante Radiochemotherapie wird bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen durchgeführt (uT3/4 und/oder uN+), da sich in Metaanalysen eine verbesserte Wirksamkeit der präoperativen im Vergleich zur postoperativen Bestrahlung gezeigt hat [32], [33].

### **1.2.8 Prognose**

Es sind eine Reihe von klinischen, histologischen und molekulargenetischen Prognosefaktoren beschrieben worden. Der mit Abstand wichtigste Prognosefaktor ist jedoch das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Therapie. Im Stadium UICC I beträgt die tumorbedingte Mortalität innerhalb fünf Jahren nahezu Null, während im Tumorstadium III über 40% der Patienten innerhalb von fünf Jahren versterben. [9].

Des Weiteren hängt die Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom von der Behandlung ab. Viele Studien konnten zeigen, dass eine hohe Fallzahl und eine Spezialisierung erheblich zu einer Verbesserung der Prognose beitragen [34]. Es wurde geschätzt, dass 43.318 Lebensjahre in den USA gerettet werden könnten, wenn alle Patienten mit einem kolorektalen Karzinom an hochspezialisierten Zentren behandelt werden würden [35]. Die Qualität der chirurgischen Therapie kann anhand der Anzahl der gewonnenen Lymphknoten beurteilt werden. Patienten, bei denen mehr Lymphknoten aufbereitet werden

können, haben eine bessere Prognose, da es ein präziseres Staging ermöglicht. Dies zeigt, welchen hohen Stellenwert die gründliche Lymphadenektomie einnimmt [36]. Die R-Situation nach chirurgischer Intervention stellt einen der wichtigsten Prognosefaktoren dar [17], [37].

### 1.3 Der Wnt-Signalweg

Mitglieder der Wnt-Familie stellen extrazelluläre Glykoproteine dar, die eine Vielzahl von wichtigen Funktionen während der Embryogenese besitzen. Der Name Wnt setzt sich als Chimäre aus den Bezeichnungen für die Gene *Wingless* (Drosophila) und *Int-1* (Maus) zusammen [38]. Die Bezeichnung *Wingless* stammt aus Beobachtungen bei der Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, bei der Mutationen im *Wingless*-Gen zu flügellosen Organismen führen [39]. Das *Int*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die Integration des *Mouse Mammary Tumorvirus* (MMTV) in der Nähe des *Int1*-Gens (heute Wnt-1) aktiviert wird [40].

#### 1.3.1 Grundlagen

Von entscheidender Bedeutung für die maligne Transformation von Zellen sind die Fähigkeiten der Invasion und Metastasierung. Dazu müssen sich Tumorzellen vom Primärtumor lösen und sich nach Erreichen von Blut- oder lymphatischen Gefäßen im gesamten Körper verteilen (disseminierte Tumorzellen) [41]. Letztendlich müssen die disseminierten Tumorzellen erneut proliferieren um Metastasen zu bilden.

Diese Dynamik ist für epitheliale Zellen eigentlich sehr ungewöhnlich. Gut differenzierte Adenokarzinome behalten ihren epithelialen Phänotyp bei und wachsen weiterhin in tubulären Strukturen und besitzen dennoch die Fähigkeit zu metastasieren [5]. Es wird angenommen, dass die Dedifferenzierung (epitheliale-mesenchymale Transformation, EMT) von Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront, welche durch einen Verlust der epithelialen Strukturen der Tumorzellen gekennzeichnet ist, den kolorektalen Karzinomen ein invasives und metastatisches Wachstum erlaubt [42], [43]. Fast alle Metastasen kolorektaler Karzinome weisen die Differenzierung und Morphologie der Primärtumore im Sinne einer epithelialen und tubulären Struktur auf, trotz des offensichtlichen Wechsels im Bereich der Invasionsfront, so dass von einer erfolgten Redifferenzierung (mesenchymale-epitheliale Transformation, MET) auszugehen ist. So ist anzunehmen, dass dieser Prozess, bestehend aus Dedifferenzierung und Redifferenzierung, nicht alleine auf genetischen Alterationen beruht, sondern auch durch Interaktionen der Tumorzellen und des *Microenvironments* des

Tumors reguliert wird [5]. Die Ausläufer der epithelialen Tumoren bilden mit dem *Microenvironment* ein Mikroökosystem, in dem Myofibroblasten mit Parenchymzellen interagieren und die extrazelluläre Matrix bilden [44].

Unter dem Gesichtspunkt, dass die Tumorprogression nicht allein auf einen unidirektionalen Mechanismus von genetischen Alterationen beruht, sondern es sich um einen dynamischen Vorgang handelt, einen regulierten Prozess mit Veränderungen der Struktur und Differenzierung des Tumors, lässt die komplexe Tumorprogression in einem anderen Licht erscheinen. Der wichtigste Aspekt hierbei ist die Veränderung der Gewebestruktur, die während der Tumorprogression durchlaufen wird, ähnlich der Histogenese während der embryonalen Entwicklung. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die wichtigsten Signalwege, die die Morphogenese in der Embryogenese regulieren, wie der Wnt-Signalweg, in den meisten Karzinomen alteriert sind [4].

### 1.3.2 Überblick

Die wichtigsten Bestandteile eines epithelialen Phänotyps sind homophile Zellkontakte und eine zelluläre Polarität, bestehend aus einer basalen und apikalen Anordnung. Beides wird wesentlich durch das Adhäsionsmolekül E-Cadherin reguliert, welches an der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert wird. Ein Verlust dieser epithelialen Charakteristiken kann durch eine Störung der Funktion des E-Cadherin verursacht werden, was zu einem dedifferenzierten mesenchymal-ähnlichen Phänotyp führt [1], [45].  $\beta$ -Catenin bindet intrazellulär an die Domäne von E-Cadherin und verbindet es auf diese Weise mit dem Zytoskelett.

Eine andere Funktion des  $\beta$ -Catenin besteht darin, dass bei nukleärem Transfer  $\beta$ -Catenin mit DNA-bindenden-Proteinen der *T-cell-factor* (TCF)/*lymphoid enhancer factor*- (LEF)-Familie interagiert und so als Transkriptions-Aktivator fungiert [46], [47].

Das Signalprotein Wnt ist ein von Krebszellen sezerniertes Glykoprotein, welches an den Transmembranrezeptor *Frizzled* und LRP-5 und -6 (*low-density lipoprotein-receptor-related proteins*) bindet (siehe Abb. 1). Insgesamt wurden 19 Wnt-Proteine identifiziert, jedoch nur einige (Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-8) aktivieren den Wnt-Signalweg [48]. In Abwesenheit von Wnt wird  $\beta$ -Catenin mit Hilfe der Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert. Daran beteiligt ist APC, Axin/Conductin sowie die Casein-Kinase I (CKI). Dieser Vorgang ist wesentlich effizienter in der Anwesenheit von Axin. Eine Überexpression von Axin/Conductin führt zu einer schnelleren Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin. Axin und Conductin besitzen eine Übereinstimmung von 45% der gleichen Aminosäuren und scheinen die gleichen

biochemischen Funktionen auszuüben, werden jedoch unterschiedlich reguliert. Während Axin während der embryonalen Entwicklung exprimiert wird, scheint Conductin spezifisch in Geweben exprimiert zu werden, die durch einen aktivierten Wnt-Signalweg charakterisiert sind [48]. Letztendlich wird phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin durch die Ubiquitin-E3-Ligase  $\beta$ -TrCP ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut.

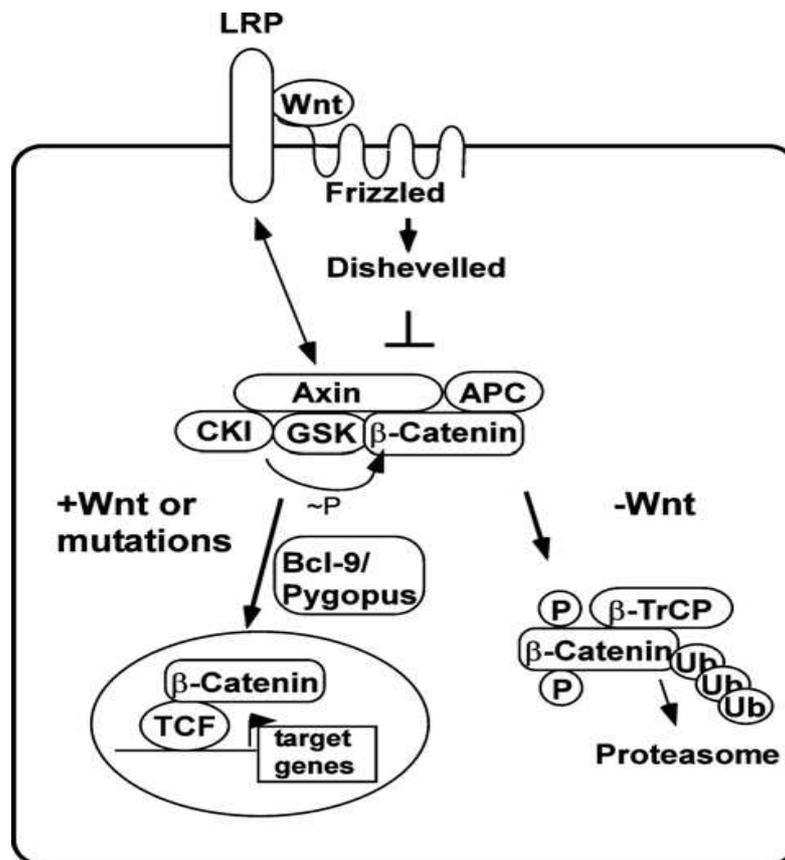


Abb. 1. Der Wnt-Signalweg [48].

Werden Wnt-Proteine sezerniert, kommt es zu einer Blockierung des Abbaus von  $\beta$ -Catenin durch Aktivierung des zytosmatischen Phosphoproteins *Dishevelled*, welches die GSK3 $\beta$  inhibiert. Es erfolgt der nukleäre Transport von  $\beta$ -Catenin, der abhängig ist von der Bindung an Bcl-9 und Pygopus-Co-Faktoren. Im Zellkern bilden  $\beta$ -Catenin und TCF/LEF einen Komplex, welcher an DNA bindet und spezifische Zielgene aktiviert (siehe Abb. 2). TCF/LEF-Moleküle sind DNA-bindende Proteine, die die gleiche Promotor-Sequenz erkennen [49]. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiviert, sind die TCF/LEF-Moleküle an Transkriptions-Repressoren wie Groucho gebunden, welche den Gen-Promotor inaktivieren [5]. Eine nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin löst Groucho von der TCF/LEF Bindung. Die DNA-bindenden Proteine spielen eine Rolle in der Chromatin-Umgestaltung und führen zu einer

Veränderung der Promotor-Architektur, welche den Promotor zugänglich für verschiedenste Transkriptionsfaktoren macht [46], [48].

### 1.3.3 Der Wnt-Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese

Es ist zu differenzieren, dass  $\beta$ -Catenin zwei voneinander getrennte Rollen ausfüllt: 1. In Verbindung mit E-Cadherin trägt es zur Erhaltung eines epithelialen Phänotyps bei. 2. Es agiert als Transkriptionsfaktor und Haupteffektor des Wnt-Signalweges und ist damit für die Aufrechterhaltung der Stammzellen des Kolons und der Krypten von essentieller Bedeutung. Ein aktivierter Wnt-Signalweg hat offenbar eine entscheidende Bedeutung für die kolorektale Karzinogenese. Bereits in der adenomatösen Zwischenstufe ist nukleäres  $\beta$ -Catenin zu detektieren mit zunehmender Expression bis hin zum Adenokarzinom [50].

Da nukleäres  $\beta$ -Catenin als ein Transkriptionsfaktor klassifiziert wurde, ist die Identifizierung der Zielgene von immenser Bedeutung, um die Rolle von  $\beta$ -Catenin und des Wnt-Signalweges in der Tumorprogression zu verstehen.

Die ersten Gene dieser Art, die identifiziert werden konnten, sind die Onkogene c-myc und Cyclin D1 [51-53]. Diese führen zu einer dysregulierten Proliferation. Auch das Gastrin-Gen, welches ein trophischer Faktor für intestinales Tumorwachstum zu sein scheint, wird durch nukleäres  $\beta$ -Catenin aktiviert [54]. Ebenso PPAR $\delta$  (*peroxisome proliferator-activated receptor*), ein Mitglied der nukleären Rezeptor Familie, der ein potenter Aktivator für das Tumorwachstum ist, wird durch  $\beta$ -Catenin/TCF aktiviert [55]. Andere Zielgene sind MDR1 (*multidrug resistance*) und Survivin, welche Zelltod-Signalwege supprimieren [56], [57].

Es konnte gezeigt werden, dass nukleäres  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle in der Dedifferenzierung von epithelialen Zellen im Bereich der Invasionsfront spielt [58], [59]. Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass eine zunehmende Anzahl von Zielgenen des Wnt-Signalweges identifiziert werden konnten, welche Regulatoren der Zelldifferenzierung und Effektoren der Invasion und Disseminierung darstellen. Zu nennen sind Cdx-1, Id2 (*inhibitor of differentiation*) und ENC1 (*ectodermal-neural cortex*) [60-62]. Alle drei Proteine inhibieren die epitheliale Differenzierung und halten die Zellen in einem weniger differenzierten, stammzell-ähnlichen Zustand. Eine Aktivierung solcher Gene durch nukleäres  $\beta$ -Catenin könnte den dedifferenzierten Phänotyp von Kolonkrebszellen im Bereich der Invasionsfront erklären [5].

Andere Gene, die durch nukleäres  $\beta$ -Catenin reguliert werden, und Effektoren der Tumorprogression in kolorektalen Karzinomen darstellen, sind uPAR (*urokinase receptor*) [63], MMP-7/Matrilysin (*matrix metalloproteinase*) [64], [65], c-jun [63], ets2 [66], VEGF

(*vascular endothelial growth factor*) [67], bFGF (*basic fibroblast growth factor*) [5], Fibronectin [68], Laminin-5 [69] und CD44 [70]. uPAR und Matrilysin werden von Tumorzellen exprimiert und ermöglichen der extrazellulären Matrix die Proteolyse. Dadurch können sich die Tumorzellen vom Primärtumor lösen und erhöhen deren Beweglichkeit. Laminin-5 wird in den dedifferenzierten Tumorzellen der Invasionsfront überexprimiert und ist einer der potentesten Aktivatoren der epithelialen Zellmigration [71], [72]. Das Onkoprotein c-jun, ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, ist seinerseits ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der die Invasionsfaktoren uPAR, Matrilysin und Laminin-5, ebenso wie ets2 aktiviert [73].

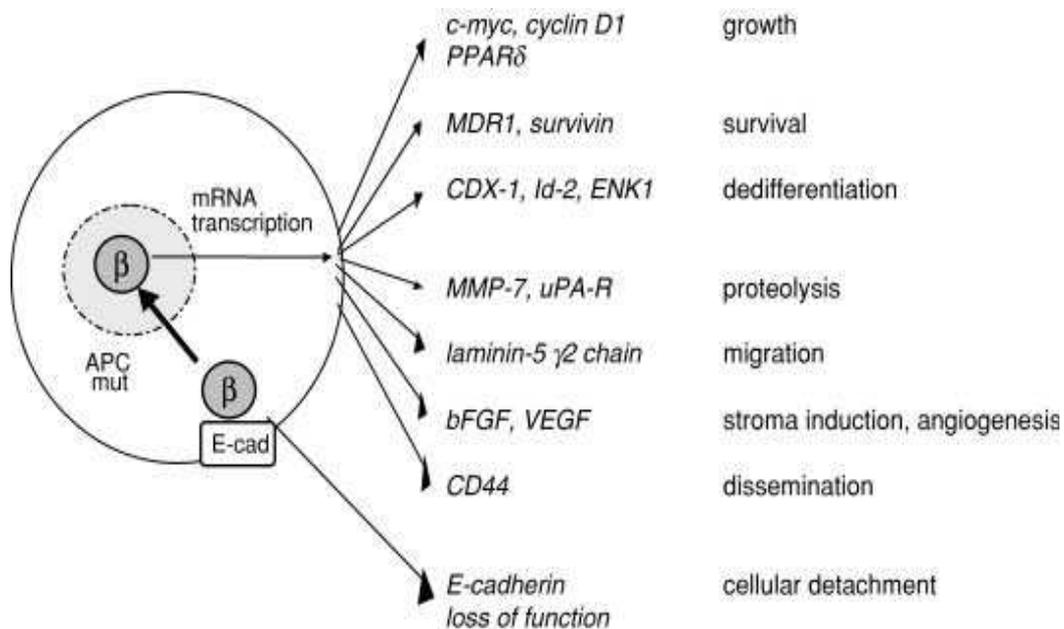


Abb. 2. Zielgene des Wnt-Signalweges [5].

APC besitzt unabhängige  $\beta$ -Catenin-Effekte auf die kolorektale Karzinogenese. Das APC-Bindungsprotein Asef-1 bindet an der N-terminalen APC-Region, welche in den meisten kolorektalen Karzinomen erhalten ist und agiert so als GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) und aktiviert die GTPasen Rho und Rac, die weitere Effektorproteine stimulieren, welche letztendlich für die Organisation des Zytoskeletts und damit die Ausprägung der Zellgestalt in disseminierten Tumorzellen verantwortlich sind [74]. Des Weiteren spielt APC eine wichtige Rolle in der Chromosomentrennung während der Mitose, indem es an Mikrotubuli und die Kontrollproteine Bub 1 und 3 bindet [75], [76]. Diese APC-Region existiert in den meisten kolorektalen Karzinomen mit APC-Mutationen nicht und könnte die hohe Rate an CIN in diesen Tumoren erklären.

Die meisten kolorektalen Karzinome weisen als erste genetische Alteration APC-Mutationen auf. Es gibt jedoch auch mikrosatelliteninstabile Karzinome, darunter fallen die HNPPC und etwa 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome. In mehr als der Hälfte dieser Karzinome können keine APC-Mutationen nachgewiesen werden [77]. Mutationen in andere Effektoren des Wnt-Signalweges, die zu einer erhöhten  $\beta$ -Catenin Aktivität führen, konnten in einer hohen Anzahl in MSI-Tumoren gefunden werden. Zu nennen wären da Mutationen der GSK3 $\beta$  und auch  $\beta$ -Catenin. Diese Mutationen konnten in 27% der MSI-Tumoren identifiziert werden und führen ebenfalls zu einer nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin [78]. Mutationen im Conductin/Axin-2-Gen wurden in 25% dieser Tumoren gefunden und führen ebenfalls zu einer nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin [79]. In 39% der MSI-Tumoren wurden *Frameshift*-Mutationen im TCF-4-Gen gefunden [80]. Ebenso konnte in Colitis-ulcerosa-assoziierten kolorektalen Karzinomen APC-Mutationen mit nukleärer  $\beta$ -Catenin Akkumulation nachgewiesen werden [81]. Somit konnten in fast allen kolorektalen Karzinomen ein aktivierter Wnt-Signalweg durch Mutationen von APC,  $\beta$ -Catenin oder anderen Effektoren festgestellt werden.

#### **1.4 Ziel der Studie**

Ein aktivierter Wnt-Signalweg in der kolorektalen Karzinogenese wurde in vielen Studien belegt. Dem Studiendesign entsprechend ist es das Ziel, erstmalig die Proteinexpression der drei wichtigsten Signalproteine des Wnt-Signalweges gemeinsam im kolorektalen Karzinom sowie synchronen Leber- und Lymphknotenmetastasen zu charakterisieren. Es soll die Dynamik der Proteinexpressionen kontextabhängig herausgearbeitet werden, um ein besseres Verständnis der Metastasierung der kolorektalen Karzinome zu erlangen. Dies ist für eine frühzeitige molekulare individualisierte Therapiestrategie („*Targeted Therapy*“) unerlässlich.

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

In der vorliegenden Studie wurde von 24 Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren, Paraffin eingebettetes Gewebe aus dem Zeitraum von 1996 bis 2005 aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. H. E. Gabbert) verwendet. Die Präparate wurden gemäß der Richtlinien der 7. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC hinsichtlich des Tumorstadiums (TNM), des Differenzierungsgrades (G) sowie des Resektionsstatus (R) histopathologisch beurteilt [82].

Das Patientenkollektiv (siehe Tabelle 8) bestand aus 13 Männern (54,16%) und 11 Frauen (45,83%) (siehe Tabelle 10). Der Altersmedian betrug 62 Jahre (41-85 Jahre), das mittlere Lebensalter  $62,9 \pm 10,3$  Jahre. In 7 Fällen (29,16%) war der Primärtumor im Colon ascendens, jeweils in 6 Fällen (25%) im Sigma und Rektum, in 4 Fällen (16,6%) im Caecum und in einem Fall (4,16%) im Colon descendens lokalisiert (siehe Tabelle 8).

### 2.2 Gewebeaufbereitung

Die aus dem Operationsresektat repräsentativen Tumorgewebeproben wurden in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (SM2000R Mikrotom, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden aus den Tumorproben konsekutive Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4  $\mu\text{m}$  (Mikrometer) hergestellt und auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Diese wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei +4 °C gelagert.

### 2.3 Immunhistochemie

Ziel der immunhistochemischen Untersuchung ist es, eine definierte Gewebe- bzw. Zelldeterminante mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen. Dazu bedarf es spezifischer Primärantikörper.

Zur Detektion des sog. Primärantikörpers wurde eine indirekte enzymatische Methode angewandt. Im Gegensatz zur direkten Methode, bei der der Primärantikörper selbst mit einem Enzym gekoppelt ist und so direkt nachgewiesen werden kann, greift bei der indirekten Technik ein zweiter sog. Sekundär- oder Brückenantikörper den Ersten am Fc-Teil an. Dieser Sekundärantikörper verbindet den Primärantikörper mit einem Enzymkomplex.

Tabelle 8. Patientenkollektiv.

<b>Klinisch-pathologische Parameter</b>	<b>n Patienten (%)</b>	
<b>Patienten (n=24)</b>		
Männlich	13	(54,16%)
Weiblich	11	(45,83%)
<b>Altersmedian:</b> 62 Jahre (41-85 Jahre)		
<b>Mittleres Alter:</b> 62,9 ± 10,3 Jahre		
<b>Lokalisation</b>		
Colon ascendens	7	(29,16%)
Sigma	6	(25%)
Rektum	6	(25%)
Caecum	4	(16,6%)
Colon descendens	1	(4,16%)
<b>Differenzierungsgrad</b>		
G1	0	
G2	17	(70,83%)
G3	6	(25%)
G4	1	(4,16%)
<b>Primärtumorstadium/T-Klassifikation</b>		
pT1	2	(8,3%)
pT2	1	(4,16%)
pT3	13	(54,16%)
pT4	8	(33,3%)
<b>Lymphknotenstadium/N-Klassifikation</b>		
pN0	4	(16,6%)
pN1	1	(4,16%)
pN2	19	(79,16%)
<b>Fernmetastasierung/M-Klassifikation</b>		
pM0	10	(41,6%)
pM1 (HEP)	14	(58,3%)
<b>Residualtumor/R-Klassifikation</b>		
R0	19	(79,16%)
R1	5	(20,83%)
<b>UICC-Stadiengruppierung</b>		
Stadium I	3	(12,5%)
Stadium II	1	(4,16%)
Stadium III	6	(25%)
Stadium IV	14	(58,3%)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) verwendet (siehe Abb. 3). Diese Technik nutzt die starke Affinität von Avidin/Streptavidin für Biotin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Jedoch binden aufgrund der molekularen Konfiguration in der Regel weniger als vier Biotinmoleküle. Dieses Verfahren benötigt einen biotinylierten Zweitantikörper. Die Biotinylierung ist ein schonender Vorgang, wobei Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird. Freie Bindungsstellen am Avidin des Avidin-Biotin-Komplexes binden an das Biotin des Brückenantikörpers. Die überaus starke Affinität von Avidin gegenüber Biotin sowie der chemisch milde Biotinylierungsprozess verschafft der ABC-Methode eine höhere Sensitivität im Vergleich zu anderen Färbemethoden.

Es werden drei Reagenzien verwendet: erster und zweiter biotinylierter Antikörper sowie der Strept-Avidin-Biotin-Komplex. Der erste Antikörper ist spezifisch für das Antigen und lokalisiert es. Der zweite Antikörper bindet an den ersten und ist dabei an Biotin gekoppelt. Das dritte Reagenz ist ein Komplex von an Avidin und Biotin konjugierter Meerrettichperoxidase (ABC-Reagenz). Die unbesetzten Stellen des Avidin-Moleküls gestatten das Binden an das Biotin des zweiten Antikörpers. Die Peroxidase und somit auch das Antigen werden mit Hilfe eines Chromogens sichtbar gemacht.

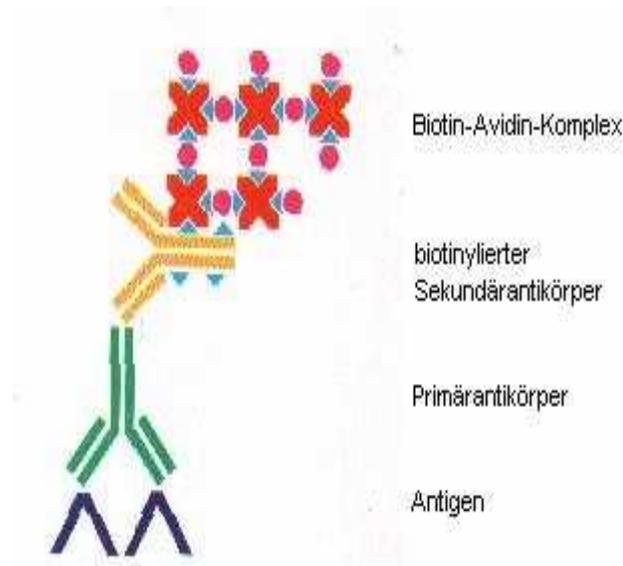


Abb. 3. ABC-Methode.

(aus Boenisch „Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden“, 2003)

### 2.3.1 Primärantikörper und Sekundärantikörper

Zur Darstellung von  $\beta$ -Catenin wurde ein monoklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet. Dieser reagiert mit einem Peptid nahe des C-terminalen Endes des  $\beta$ -Catenin-Proteins je nach Lokalisation membranständig, im Zytoplasma oder im Zellkern. Die Detektion von APC erfolgte durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper, der mit einem Peptid in der Nähe des c-terminalen Endes des APC-Proteins im Zytoplasma reagiert. Für die immunhistochemische Färbung des Wnt-1 Proteins wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet. Dieser reagiert im Zytoplasma mit einem Peptid nahe des N-terminalen Endes des Wnt-Proteins. Weitere Einzelheiten sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9. Primärantikörper\*.

Klon	Spezifität	Spezies	Verdünnung	Konzentration
E247	$\beta$ -Catenin	Kaninchen	1:250	4 $\mu$ g/ml
Polyklonal	APC	Kaninchen	1:50	4 $\mu$ g/ml
Polyklonal	Wnt-1	Kaninchen	1:50	4 $\mu$ g/ml

\*Die Primärantikörper wurden von Thermo Scientific, Fremont, Kalifornien, USA, bezogen.

Alle Primärantikörper wurden in 10%igem AB-Serum (Biotest, Dreieich) und Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) auf die erwünschte Konzentration verdünnt. AB-Serum ist ein antikörperfreies, humanes Serum der Blutgruppe AB. Anhand von Schnittpräparaten von normaler Kolonmukosa, deren Epithelien die gesuchten Moleküle regelhaft exprimieren, wurden die einzelnen Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein optimales Färbeergebnis hin titriert. Dabei zeigte die Verdünnung aller verwendeten Antikörper bei einer Konzentration von 4 $\mu$ g/ml eine kräftige, spezifische Anfärbung bei Ausbleiben einer unspezifischen Hintergrundfärbung.

Zum Ausschluss falsch negativer Resultate dienten als Positivkontrolle Gewebeschnitte von normaler Kolonmukosa, die stets mitgefärbt wurden. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde zu jedem Präparat ein konsekutiver Schnitt im Verdünnungsansatz mitgefärbt (irrelevante Isotyp-Kontrolle).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der immunhistochemischen Analysen ein Vectastain<sup>®</sup> ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) verwendet, welches einen biotinylierten Sekundärantikörper enthält, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und an diesen bindet.

### 2.3.2 Durchführung der Immunhistochemie

Die bis zum Zeitpunkt der Färbung bei +4°C gelagerten Gewebeschnittpräparate wurden zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnittpräparate 3x10 Minuten in Xylol und danach jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (99,5-70% vol.) inkubiert.

Nun erfolgte die Demaskierung der Proteine des formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebes. Die Gewebeschnittpräparate wurden hierfür in einer *Target Retrieval Solution* (DakoCytomation GmbH, Hamburg) für 30 Minuten inkubiert, welche zuvor in einem Wasserbad auf 95°C erhitzt worden war. Anschließend erfolgte die Abkühlung bei Raumtemperatur für 20 Minuten.

Zur weiteren Vorbereitung wurde das Gewebe auf den Objektträgern mit einem Fettstift (DakoCytomation GmbH, Hamburg) umrundet, um einen möglichst geringen Verlust der verwendeten Reagenzien während der Immunhistochemie zu erlangen. In den nun folgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Schnittpräparate für die gesamte Dauer der Immunhistochemie nicht austrocknen. Sämtliche Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst erfolgte nun die Blockierung der endogenen Peroxidase zur Reduzierung unspezifischer Reaktionen und damit verbundenen Hintergrundfärbungen. Hierzu wurden die Schnittpräparate für 30 Minuten mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) versetzt.

Zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungen wurden im folgenden Schritt die Schnittpräparate für 30 Minuten mit Normalserum versetzt.

Nach Verdünnung des Primärantikörpers in AB-Serum/PBS auf die gewünschte Konzentration, wurden die Gewebeschnitte mit diesem für 30 Minuten inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation für 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und abschließend für 30 Minuten mit dem ABC-Reagenz.

Zur Entwicklung der Farbreaktion wurde Diaminobenzidin (DAB+) als Chromogen (DakoCytomation GmbH, Hamburg) eingesetzt. Vorbereitend wurde DAB+ mit einem Substratpuffer versetzt. Darauf wurden die Gewebeschnitte mit DAB+ für 10 Minuten inkubiert.

Nun erfolgte die Anfärbung in Hämalaun nach P. Mayer. Hierfür wurden die Gewebeschnitte kurz in einer Hämalaun-Lösung inkubiert und dann für 15 Minuten bei langsam fließendem Leitungswasser gewaschen. Hämalaun bindet u. a. an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, was in einer bläulichen Anfärbung der Kernstruktur resultiert. Zuletzt wurden die Schnittpräparate mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex<sup>®</sup>,

Merck KGaA, Darmstadt) überschichtet, welches die abschließend aufgelegten Deckgläser nach Lufttrocknung über Nacht dauerhaft fest mit dem Objektträger verband.

## 2.4 Auswertung

Bei den Primärtumoren wurden die zentralen Areale und die Invasionsfront getrennt analysiert. Für die Bestimmung der Anzahl positiver Tumorzellen diente eine Skala von 0-100% in 10%-Schritten. Die Färbeintensität wurde von 0 bis +3 kategorisiert. Ferner wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner verwendet [83]. Die Auswertungskriterien dieses semiquantitativen Verfahrens sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10. Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner.

<b>Anzahl positiver Tumorzellen</b>		<b>Färbeintensität</b>	
Keine positiven Zellen	0 Punkte	keine Färbung	0 Punkte
< 10%	1 Punkt	schwach	1 Punkt
10-50%	2 Punkte	mäßig	2 Punkte
51-80%	3 Punkte	stark	3 Punkte
> 80%	4 Punkte		

<b>Anzahl positiver Tumorzellen</b>	<b>x</b>	<b>Färbeintensität</b>	<b>=</b>	<b>IRS</b>	<b>(0-12 Punkte)</b>
-------------------------------------	----------	------------------------	----------	------------	----------------------

### 2.4.1 Statistische Analysen

Sämtliche Parameter wurden mit dem Programm SPSS 16.0 statistisch ausgewertet. Ferner wurde Microsoft Excel 2003 verwendet. Für die statistische Analyse wurden nicht parametrische Variablen mit Hilfe von Rangsummentests (Mann-Whitney-Test) ausgewertet. Darüber hinaus wurden der Chi-Quadrat-Test sowie der Fisher's-Exact-Test für die multifaktorielle Analyse entsprechender Parameter verwandt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. P-Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als Tendenz bewertet.

Der Mann-Whitney-Test ist den nichtparametrischen Tests zuzuordnen [84]. Nichtparametrische Tests zeichnen sich insgesamt dadurch aus, dass die Werte keiner normalverteilten Grundgesamtheit angehören müssen. Der Mann-Whitney-Test zeigt, ob zwei unabhängige Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen. In der vorliegenden Arbeit wurden hierdurch vergleichende Analysen der Proteinexpressionen in den unterschiedlichen Geweben durchgeführt. Letztendlich wird eine Signifikanz für die

Nullhypothese berechnet. Die Nullhypothese, die davon ausgeht, dass die untersuchten Werte einer gleichen Grundgesamtheit angehören, kann somit bestätigt oder zurückgewiesen werden.

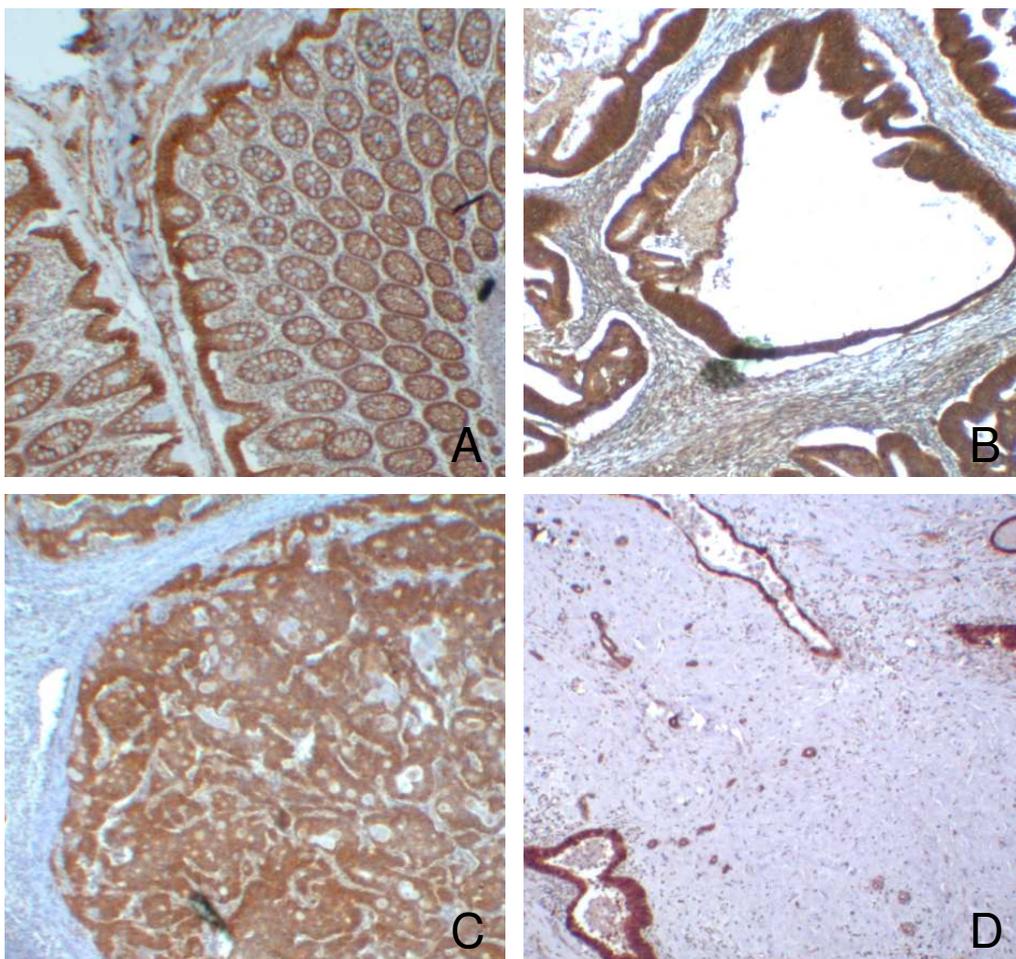
Für die statistische Berechnung einer möglichen Signifikanz zwischen den Proteinexpressionen und den histopathologischen Parametern wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt [85]. Die Nullhypothese geht davon aus, dass kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen besteht. Bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  kann dies zurückgewiesen werden und man kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass ein Zusammenhang zwischen den Variablen, also der untersuchten Proteinexpressionen und histopathologischen Parametern, in dem untersuchten Kollektiv besteht.

Der Fisher-Exact-Test kalkuliert anhand einer Vierfeldertafel einen Wahrscheinlichkeitswert für die Beziehung zwischen zwei dichotomisierten Variablen. Hierbei entspricht der Fisher`s-Exact-Test dem Chi-Quadrat-Test. Der Chi-Quadrat-Test gibt jedoch nur eine Schätzung des wahren Wahrscheinlichkeitswertes, die bei einer Anzahl von weniger als fünf in einem Feld unsicherer wird. Sodann erhält der Fisher-Exact-Test den Vorzug.

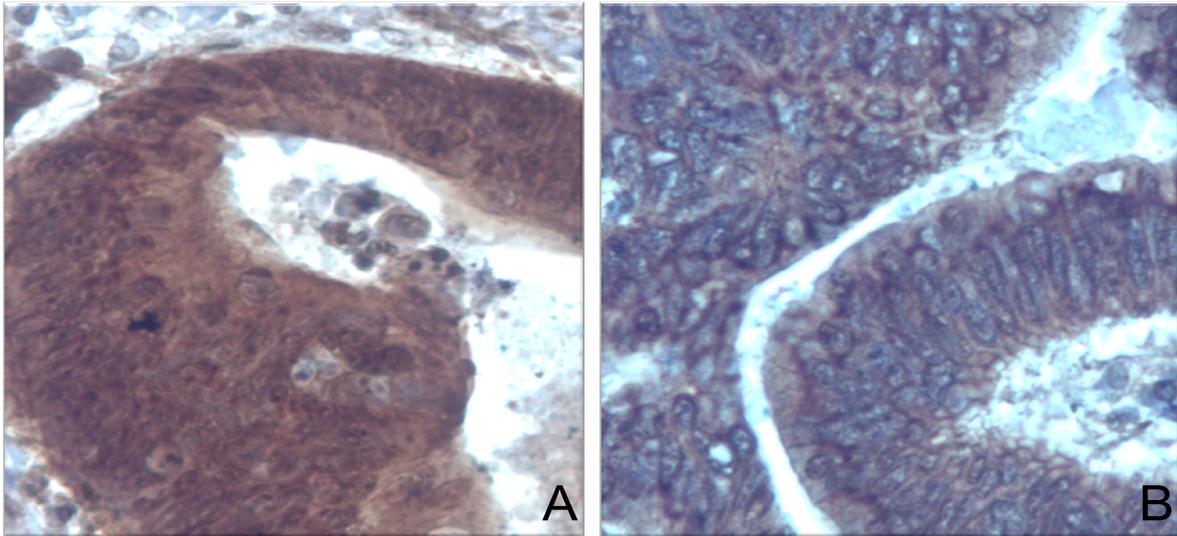
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin stellt die Endstrecke der Wnt-Signalkette dar. Eine nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expression ist als Hinweis auf einen aktivierten Wnt-Signalweg zu werten (siehe Abb. 4 bis 6). Die Auswertung der nukleären Expression erfolgte nach positiver und negativer Kernfärbung der epithelialen Zellen beziehungsweise der Tumorzellen. Insbesondere war in den Primärtumoren der Unterschied der nukleären Expression von  $\beta$ -Catenin in den zentralen Bereichen sowie deren peripheren Ausläufern von Interesse, da nukleäres  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle in der Dedifferenzierung von epithelialen Krebszellen im Bereich der Invasionsfront zu spielen scheint [57], [58]. Deshalb wurde in den kolorektalen Karzinomen die nukleäre Expression in den zentralen Tumoranteilen und den peripheren Tumorausläufern (Invasionsfront) getrennt ausgewertet (siehe Abb. 5 ,7 und 8).

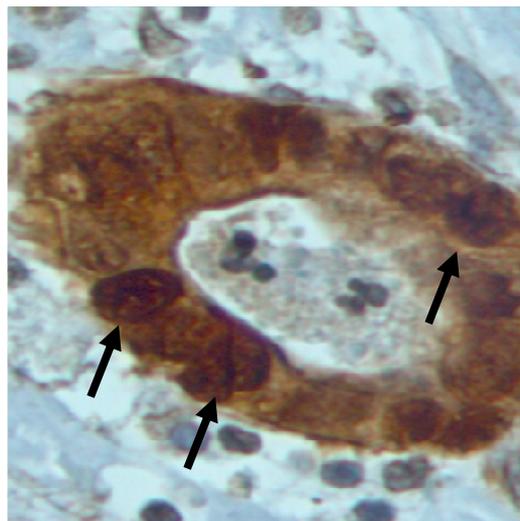


**Abb. 4.  $\beta$ -Catenin-Expression** in Normalmukosa (A), Primärtumor (B), Lymphknoten- (C) und Lebermetastase (D), 100fache Vergrößerung.

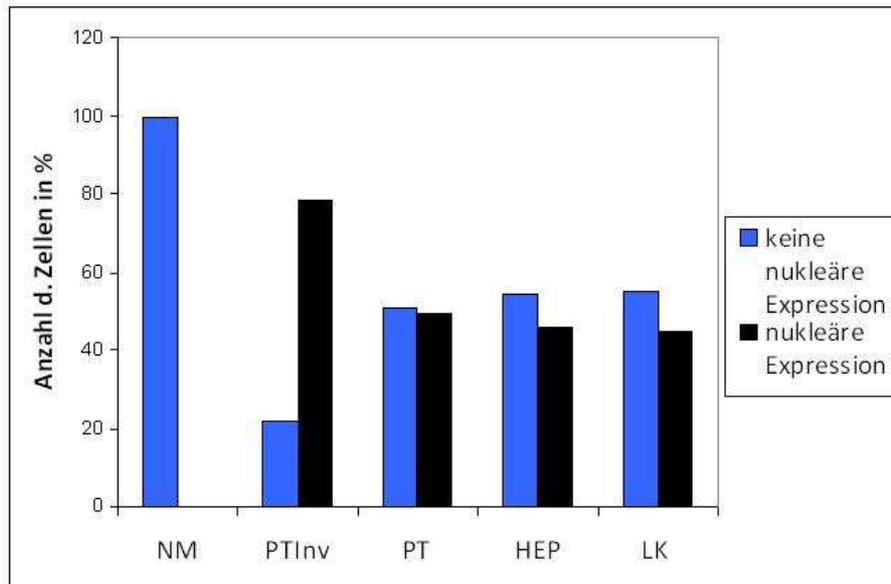


**Abb. 5. Expression von  $\beta$ -Catenin im Bereich der Invasionsfront (A) und zentralen Tumoranteilen (B) eines Primärtumors, 200fache Vergrößerung.**

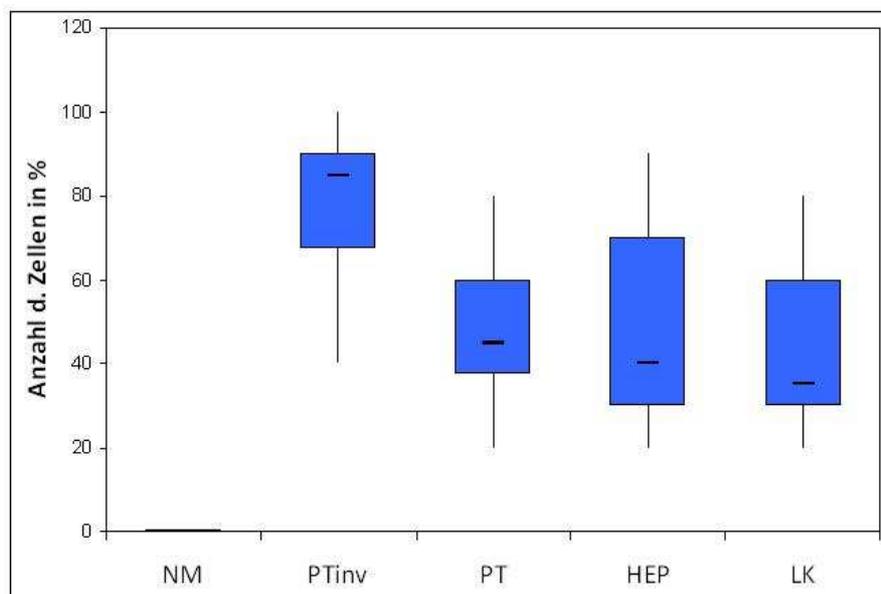
Im Normalgewebe zeigte sich keine nukleäre Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin. In den zentralen Tumoranteilen zeigten 49,17% eine starke nukleäre Expression (3+), im Bereich der Invasionsfront waren es 78,34% der Tumorzellen. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ). In den Leber- (45,84%) und Lymphknotenmetastasen (45%) zeigte sich ein homogenes nukleäres Expressionsmuster in Bezug auf die zentralen Tumoranteile der Primärtumoren (siehe Abb. 7 und 8). Hier ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen den Primärtumoren sowie den Leber- und Lymphknotenmetastasen.



**Abb. 6. Expression von nukleärem  $\beta$ -Catenin (siehe Pfeile). Perinukleäre zytoplasmatische Färbung. 400fache Vergrößerung, Aufnahme aus einem Primärtumor.**



**Abb. 7. Nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin** in Normalmukosa (NM), Invasionsfront Primärtumor (PTInv), Primärtumor (PT), Leber (HEP) und Lymphknoten (LK). Keine nukleäre Expression zeigte sich in der Normalmukosa. Statistisch signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) war die nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin in den Tumorzellen im Bereich der Invasionsfront in Gegenüberstellung der zentralen Tumoranteile der Primärtumoren.



**Abb. 8. Verteilungsmuster der nukleären  $\beta$ -Catenin-Expression.** Deutlich zu erkennen ist das signifikant erhöhte Expressionsniveau im Bereich der Invasionsfront der Primärtumoren ( $p < 0,001$ ). In den zentralen Anteilen der Primärtumoren zeigte sich das Verteilungsmuster in Bezug auf die Leber- und Lymphknotenmetastasen homogen.

Im Verlauf eines nukleären Transfers von  $\beta$ -Catenin liegt dieses in einem „freien“ Zustand im Zytoplasma vor. Insofern ist die zytoplasmatische Expression von  $\beta$ -Catenin als Teil der Endstrecke der Wnt-Signalkette von Bedeutung.

Die Tumorzellen der Primärtumoren wiesen im Zytoplasma eine Expressionsrate (3+) von durchschnittlich 74,58% auf. In den Leber- (71,67%) und Lymphknotenmetastasen (62%) zeigte sich ebenfalls eine hohe zytoplasmatische Proteinexpression. Im Vergleich zu der zytoplasmatischen Expression von  $\beta$ -Catenin im Normalgewebe der epithelialen Zellen, (41,67%) war die Expression in den Tumorzellen der Primärtumoren ( $p < 0,001$ ), den Leber- ( $p = 0,001$ ) und Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,017$ ) statistisch signifikant erhöht (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11. Zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Expression.

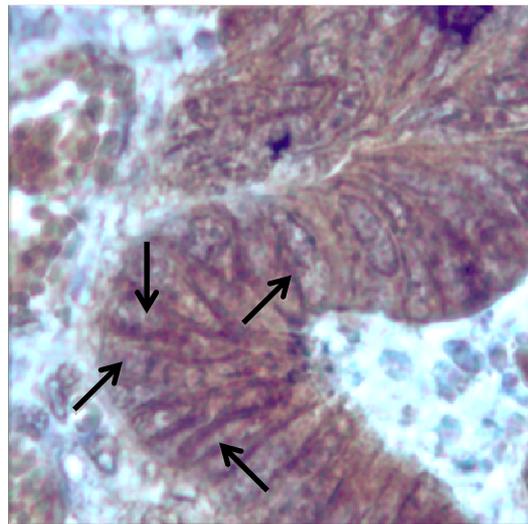
<b>Anzahl d. Zellen in %</b>	<b>0</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Normalmukosa</b>	0%	8,75%	49,58%	41,67%	
<b>Primärtumor</b>	0,42%	3,75%	21,25%	74,58%	$p < 0,001$
<b>Leber</b>	0%	2,92%	25,42%	71,67%	$p = 0,001$
<b>Lymphknoten</b>	0%	4,5%	33,5%	62%	$p = 0,017$

$\beta$ -Catenin ist in Verbindung mit E-Cadherin für die Aufrechterhaltung eines epithelialen Phänotyps verantwortlich [5]. Diese Funktion entspricht der membranären Expression von  $\beta$ -Catenin (siehe Abb. 9 und 10). Hierbei war in der vorliegenden Arbeit von Interesse die membranäre Expression von  $\beta$ -Catenin in den Primärtumoren sowie Leber- und Lymphknotenmetastasen in Bezug auf das Normalgewebe zu charakterisieren.

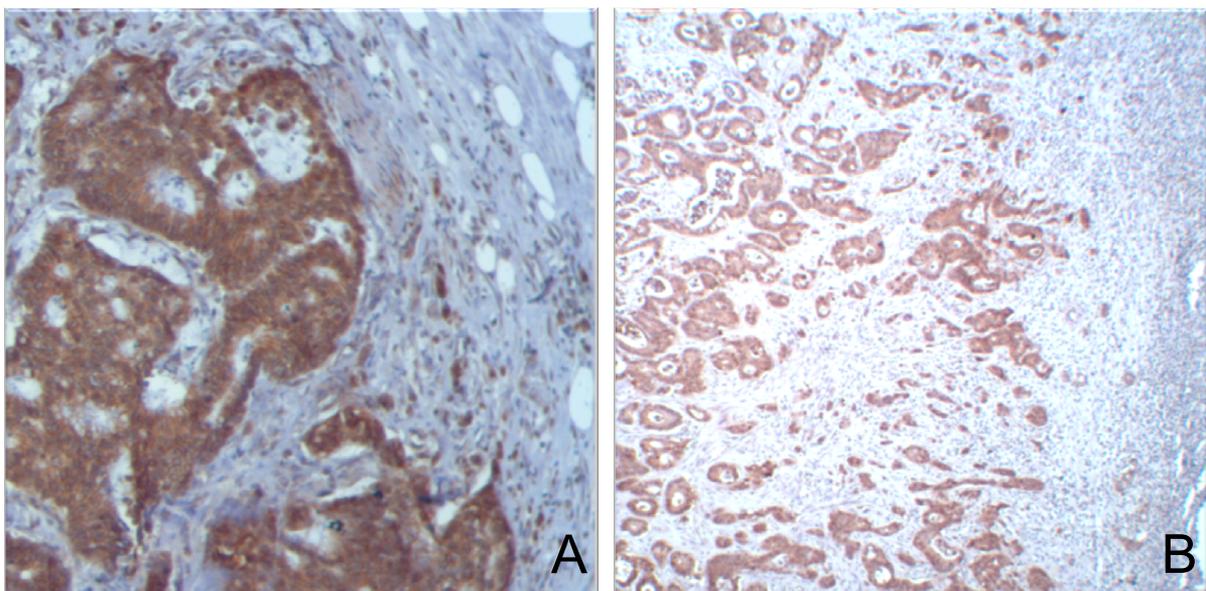
Legt man den prozentualen Mittelwert der membranären Expression der stärksten Kategorie 3+ der epithelialen Zellen des Normalgewebes (76,67%) als Ausgangswert fest, findet sich in den anderen untersuchten Geweben ein homogenes Expressionsmuster: in den Primärtumoren wiesen 72,92% der Tumorzellen eine starke membranäre Expression auf; in den Lebermetastasen 81,25% und in den Lymphknotenmetastasen 83,5% der Tumorzellen (siehe Tabelle 12). Statistisch signifikant war die membranäre Expression in den tumorösen Geweben im Vergleich zum Normalgewebe nicht.

Tabelle 12. Membranäre  $\beta$ -Catenin-Expression.

<b>Anzahl der Zellen in %</b>	<b>0</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>
<b>Normalmukosa</b>	0%	1,25%	22,08%	76,67%
<b>Primärtumor</b>	0,83%	2,08%	24,17%	72,92%
<b>Leber</b>	0%	0%	18,75%	81,25%
<b>Lymphknoten</b>	0%	0%	16,5%	83,5%



**Abb. 9. Membranäre  $\beta$ -Catenin-Expression** (siehe Pfeile) in einem Primärtumor, 200fache Vergrößerung.



**Abb. 10. Vergleich der  $\beta$ -Catenin-Expression in einer Lymphknoten- (A) und Lebermetastase (B), 100fache Vergrößerung.**

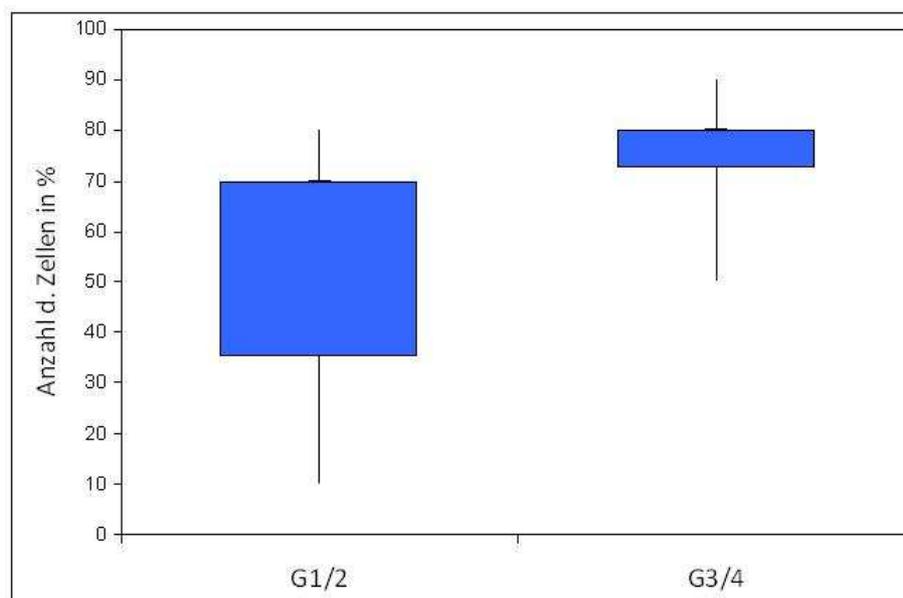
Zusätzlich war es eines der Ziele der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin in Korrelation zu TNM-Status und G-Kategorie zu stellen, um möglicherweise Aussagen anhand des Tumorstadiums über den zu erwartenden Krankheitsverlauf zu ermöglichen. Hierfür wurden Gruppen nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten

gebildet, die miteinander verglichen wurden (T1/2 versus T3/4 usw.). Einzelheiten sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13. Ergebnisse der  $\beta$ -Catenin-Expression in Korrelation mit dem TNM-Status und histopathologischem Grading (G).

<b>Anzahl positiver Zellen in %</b>	<b>NM</b>	<b>PT</b>	<b>HEP</b>	<b>LK</b>
<b>Nukleäres <math>\beta</math>-Catenin</b>				
T 1/2	0%	46,67%	30%	50%
T 3/4	0%	49,52%	48,1%	44,73%
N0	0%	40%	27,5%	
N1/2	0%	51%	49%	
M0	0%	47%	39%	50%
M1	0%	50,7%	50,7%	42,3%
G 1/2	0%	47,64%	49,4%	40,71%
G 3/4	0%	52,85%	37,41%	55%
<b>Anzahl positiver Zellen in % der Kategorie 3+</b>				
<b>Zytoplasmatisches <math>\beta</math>-Catenin</b>				
T 1/2	50%	80%	60%	70%
T 3/4	40,48%	73,81%	73,33%	61,58%
N0	50%	60%	60%	
N1/2	40%	77,5%	74%	
M0	46%	77%	63%	68,58%
M1	38,58%	72,86%	77,86%	58,46%
G 1/2	41,18%	77,65%	75,88%	56,43%
G 3/4	42,86%	76,14%	61,43%	75%
<b>Membranäres <math>\beta</math>-Catenin</b>				
T 1/2	90%	76,67%	80%	70%
T 3/4	74,76%	72,38%	81,43%	84,21%
N0	87,5%	60%	80%	
N1/2	90%	80%	80%	
M0	84%	75%	81%	82,86%
M1	71,43%	71%	81,43%	83,85%
G 1/2	76,47%	74,7%	81,76%	81,42%
G 3/4	77,15%	68,57%	80%	88,33%

Ein Trend entsprechend einer erhöhten nukleären  $\beta$ -Catenin Aktivität in Korrelation mit einem zunehmenden TNM-Status konnten nicht gezeigt werden. Im G1/2-Stadium zeigten 56,43% der Tumorzellen in den Lymphknotenmetastasen eine starke zytoplasmatische Färbeintensität (3+); im Stadium G3/4 lag diese bei 75% ( $p=0,062$ ). Dies ist als statistischer Trend zu werten (siehe Abb. 11).



**Abb. 11. Verteilungsmuster der zytoplasmatischen Expression von  $\beta$ -Catenin in Lymphknotenmetastasen von „low-grade“(G1/2)- und „high-grade“(G3/4)-Tumoren.** Erkennbar ist das erhöhte Expressionsniveau in Lymphknotenmetastasen von G3/4-Tumoren ( $p=0,062$ ).

### 3.2 Wnt-1

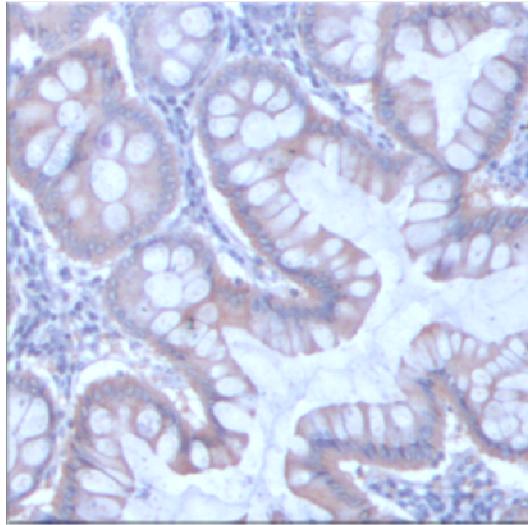
Wnt-1 ist ein Glykoprotein, welches für die Signalübertragung an der Plasmamembran essentiell und auf diese Weise für die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin mitverantwortlich ist [5] [48]. Anhand der Proteinexpression soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Wnt-1 in der Metastasierung innerhalb des Wnt-Signalweges untersucht werden. Die Proteinexpression von Wnt-1 wird im Zytoplasma detektiert, wobei innerhalb der Zellen eine verstärkte Anfärbung in den basalen Abschnitten zu verzeichnen war.

Tabelle 14. Expression von Wnt-1.

	Anzahl d. Zellen in % 0	1+	2+	3+	p-Wert
<b>Normalmukosa</b>	5,2%	28,04%	37,68%	25,72%	
<b>Primärtumor</b>	5,6%	29,64%	40,48%	20,52%	
<b>Leber</b>	20,8%	55,64%	16,48%	3,32%	$p=0,003$
<b>Lymphknoten</b>	4,23%	33,86%	46,77%	11,09%	

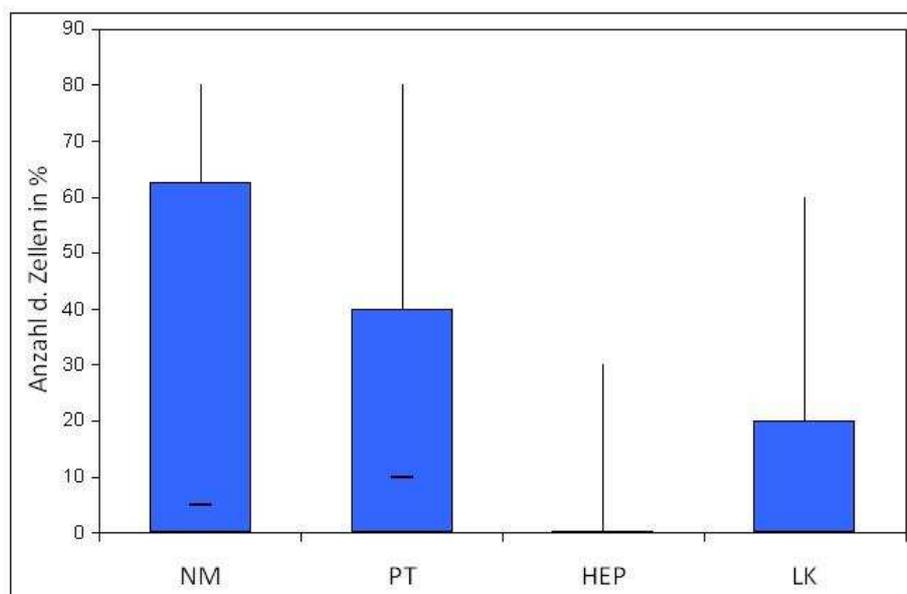
In allen Geweben zeigte sich ein hoher Anteil aller Expressionsstärken und somit ein heterogenes Verteilungsmuster (siehe Tabelle 14 und Abb. 12 und 13). Legt man den höchsten Expressionsgrad (3+) zu Grunde, wiesen in der Normalmukosa im Zytoplasma

25,72% aller epithelialer Zellen eine entsprechende Färbung auf, in den Primärtumoren 20,52% aller Tumorzellen.



**Abb. 12. Wnt-1-Expression** in einem Primärtumor, 100fache Vergrößerung.

In den Leber- und Lymphknotenmetastasen war die Anzahl der Tumorzellen entsprechend eines zytoplasmatischen Expressionsgrades von 3+ niedriger: In den Lebermetastasen 3,32% ( $p=0,003$ ) und in den Lymphknotenmetastasen 11,09% aller Tumorzellen.



**Abb.13. Verteilungsmuster der Wnt-1-Expression.** Insgesamt imponiert ein sehr heterogenes Expressionsmuster mit der höchsten Verteilungsbreite im Normalgewebe (NM). Im Median zeigt sich die höchste Expression in den Primärtumoren. In der Leber (HEP) zeigt sich eine signifikant reduzierte Expression ( $p=0,003$ ).

In Korrelation nach dem TNM-Status sowie dem histopathologischen Grading fand sich in allen gebildeten Gruppen kein Ergebnis, welches weiterführende Rückschlüsse anhand der genannten Parameter zulässt (siehe Tabelle 15). Die Proteinexpression von Wnt-1 zeigte entsprechend den zugeordneten Parametern keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 15 Ergebnisse der Wnt-1-Expression in Korrelation mit dem TNM-Status und histopathologischem Grading (G).

<b>Anzahl positiver Zellen in % der Kategorie 3+</b>	<b>NM</b>	<b>PT</b>	<b>HEP</b>	<b>LK</b>
T 1/2	30%	20%	0%	0%
T 3/4	26,19%	21,43%	3,81%	12,11%
N0	22,5%	17,5%	0%	
N1/2	27,5%	22%	4%	
M0	19%	28%	2%	11,43%
M1	32,14%	16,43%	4,29%	11,54%
G 1/2	25,88%	22,35%	1,76%	10,71%
G 3/4	28,57%	18,57%	7,14%	13,33%

### 3.3 APC

Da die meisten kolorektalen Karzinome als genetische Alteration eine APC-Mutation aufweisen, war es einer der Ziele dieser Arbeit, die Proteinexpression von APC in den Primärtumoren sowie den synchronen Metastasen zu untersuchen. Die Detektion von APC erfolgte im Zytoplasma. In den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich eine Betonung der Proteinexpression der basalen Abschnitte innerhalb der einzelnen Tumorzellen (siehe Abb. 14).

Eine starke, kräftige Anfärbung im Sinne einer starken Proteinexpression von APC (3+) war nicht zu verzeichnen (siehe Tabelle 16). Die Expression in allen untersuchten Geweben waren der Kategorie 1+ und 2+ zuzuordnen, so dass das Expressionsmuster sehr heterogen imponierte. Die höchste Proteinexpression war in der Normalmukosa zu werten, in der 35,42% aller epithelialen Zellen der Kategorie 2+ zugeordnet werden konnten. In Bezug hierauf war in den Primärtumoren sowie Leber- und Lymphknotenmetastasen eine signifikant reduzierte Expression zu sehen. In den Primärtumoren waren 10,42% ( $p=0,002$ ) der Tumorzellen entsprechend der Kategorie 2+ positiv, in den Lebermetastasen 1,67% ( $p=0,006$ ) und den Lymphknotenmetastasen 5,5% ( $p=0,012$ ) aller Tumorzellen.

Tabelle 16. Expression von APC.

<b>Anzahl d. Zellen in % 0</b>	<b>1+</b>	<b>2+</b>	<b>3+</b>	<b>p-Wert</b>	
<b>Normalmukosa</b>	19,17%	44,58%	35,42%	0,83%	
<b>Primärtumor</b>	24,17%	65,42%	10,42%	0%	p=0,022
<b>Leber</b>	59,17%	39,17%	1,67%	0%	p=0,006
<b>Lymphknoten</b>	35%	59,5%	5,5%	0%	p=0,012

Analog zu der Expression von Wnt-1 fanden sich nach klinisch-histopathologischen Parametern keine weiterführenden Ergebnisse. Die Proteinexpression in den untersuchten Geweben zeigte keine Ergebnisse, die weiterführende Aussagen zuließ (siehe Tabelle 17).

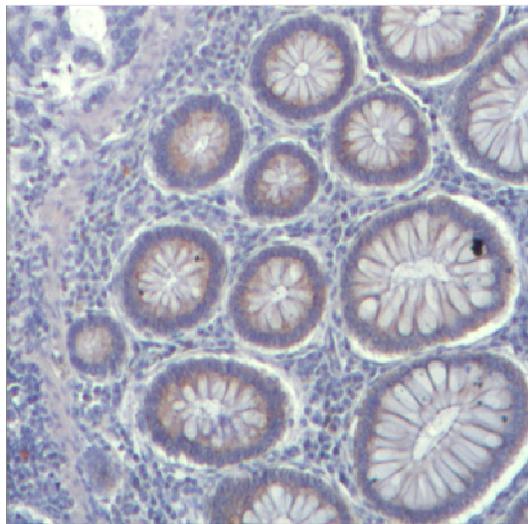


Abb. 14. APC-Expression, 100fache Vergrößerung.

Tabelle 17. Ergebnisse der APC-Proteinexpression in Korrelation mit dem TNM-Status und histopathologischem Grading (G).

<b>Anzahl positiver Zellen in % der Kategorie 2+</b>	<b>NM</b>	<b>PT</b>	<b>HEP</b>	<b>LK</b>
T 1/2	33,33%	13,33%	6,66%	0%
T 3/4	35,71%	10%	0,96%	5,79%
N0	25%	15%	5%	
N1/2	37,5%	9,5%	1%	
M0	31%	11%	2%	5,71%
M1	38,57%	10%	1,43%	5,38%
G 1/2	33,53%	12,35%	1,18%	5%
G 3/4	40%	5,72%	2,86%	6,66%

## 4. Diskussion

### 4.1 $\beta$ -Catenin

$\beta$ -Catenin ist der Haupteffektor des Wnt-Signalweges und im Darm am Erhalt eines epithelialen Phänotyps (membranäre Lokalisation) beteiligt. In nukleärer Lokalisation agiert es als Transkriptions-Aktivator [5]. In der vorliegenden Untersuchung konnte eine nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin im Normalgewebe nicht beobachtet werden. Hingegen war in den kolorektalen Karzinomen eine starke nukleäre Proteinexpression zu detektieren. In den Primärtumoren zeigte die Auswertung der invasiven Tumorausläufer (Invasionsfront) in Bezug auf die zentralen Tumoranteile einen statistisch signifikanten Anstieg der nukleären Expression im Bereich der Invasionsfront. Die nukleäre Proteinexpression der zentralen Tumoranteile der Primärtumoren im Vergleich zu den synchronen Leber- und Lymphknotenmetastasen zeigte sich homogen (siehe Abb. 7 und 8).

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Brabletz et al. [86]. Es wird vermutet, dass durch die nukleäre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin der funktionelle Wechsel zu einem Aktivator für die Transkription verschiedenster Zielgene erfolgt (siehe 1.3.3). Durch die starke Aktivierung des Wnt-Signalweges kann es dann zu einer epithelialen-mesenchymalen Transformation (EMT) der Tumorzellen kommen, so dass diese dann in ihrem invasiven und metastatischen Wachstum bestärkt werden [42], [43].

In den Tumorzellen der Leber- und Lymphknotenmetastasen zeigte sich im Verhältnis zu der Invasionsfront der Primärtumoren wieder eine reduzierte nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin. Dies könnte für die These sprechen, dass im Rahmen der Metastasierung die Tumorzellen eine mesenchymalen-epithelialen Transformation (MET) durchlaufen [5], [87]. Einige Studien haben diese Überlegung untersucht und analog zu den Primärtumoren die Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin in den Metastasen entsprechend den zentralen Anteile und Invasionsfront getrennt ausgewertet [5], [87]. Diese Auswertungen zeigten ebenfalls in den zentralen Anteilen der Metastasen eine verminderte Proteinexpression. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass es sich bei der Metastasierung um einen dynamischen Prozess handelt. Dieser Eindruck wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Es hat den Anschein, dass kolorektale Tumorzellen entsprechend ihrer „Wnt-Aktivität“ in verschiedenen Aktivierungsstufen miteinander interagieren können [87], [88].

Brabletz et al. konnten nachweisen, dass die Proliferationsaktivität in disseminierten Tumorzellen erniedrigt ist, trotz einer starken nukleären  $\beta$ -Catenin-Expression. Zwar exprimierten diese Tumorzellen Cyclin D1, ein Zielgen des Wnt-Signalweges und zugleich ein starker Aktivator der Proliferation, jedoch fand sich gleichzeitig auch eine starke

Expression von p16, einem Inhibitor des Zellzyklus. Somit erklärt sich die niedrige Proliferationsrate in diesen Zellen. Möglich wäre, dass p16 durch Tumorzellen mit nukleärer  $\beta$ -Catenin Expression aktiviert wird. Ein Verlust des epithelialen Phänotyps der Tumorzellen im Rahmen einer EMT geht mit einer Reduktion der Proliferationsrate einher. Um das Wachstum der Metastasen zu fördern, müssen disseminierte, dedifferenzierte Tumorzellen ihre epithelialen Funktionen wiedererlangen (MET) [87].

Untersuchungen des *Microenvironment* kolorektaler Tumorzellen anhand von *in vivo* Genexpressionsanalysen mittels *Microarrays* konnten im Bereich der Invasionsfront Gene identifizieren, welche für entzündliche Prozesse sowie für die Wundheilung von Bedeutung sind. Diese scheinen eine Stabilisierung von nukleärem  $\beta$ -Catenin zu bewirken und somit auf den Prozess der Metastasierung Einfluss zu nehmen [88].

In einer weiteren Arbeit wurde der Promotor von  $\beta$ -Catenin im Bereich der Invasionsfront von kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Hierbei führte ein verstärktes Ablesen des Promoters zu einer erhöhten Proteinkonzentration von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und konsekutiv im Nukleus. Der Promoter wird über Zytokine und Chemokine des umliegenden Bindegewebes aktiviert. Des Weiteren scheint die eigene transkriptionelle Aktivität des Promoters über einen positiven *Feedback*-Mechanismus autoreguliert zu werden [89].

Zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin in den Primärtumoren war in der vorliegenden Arbeit im Verhältnis zum Normalgewebe signifikant höher exprimiert, ebenso in den synchronen Leber- und Lymphknotenmetastasen. Möglicherweise ist dies durch eine höhere Konzentration von „freiem“ zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin im Verlauf des nukleären Transfers bedingt. Hugh et al. konnten eine verstärkte zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Expression bei ihren immunhistochemischen Analysen in kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen ebenfalls beobachten [90]. Auffällig – wenn auch nicht statistisch signifikant – war die positive Korrelation zwischen der Expression von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin und steigendem G-Status in den Lymphknotenmetastasen. Hierbei könnte es sich um ein Zeichen der Dedifferenzierung handeln.

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein homogenes Expressionsmuster von membranärem  $\beta$ -Catenin. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass es im Bereich der Invasionsfront sowohl in kolorektalen Karzinomen als auch in metastatischen Läsionen zu einer signifikanten Reduzierung der membranären Expression von  $\beta$ -Catenin als Zeichen der EMT und somit der Tumorprogression und Metastasierung kam [87].

## 4.2 Wnt-1

Wnt-1 ist ein von Krebszellen sezerniertes Glykoprotein, welches für die Signalübertragung an der Plasmamembran essentiell und für die nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin mitverantwortlich ist [48]. Entgegen der Vorstellung, dass sich in Tumorgewebe eine erhöhte Proteinexpression im Sinne eines aktivierten Wnt-Signalweges zeigt, fand sich ein homogenes Expressionsverhalten. In den Lebermetastasen war die Expression sogar signifikant erniedrigt.

Bei Durchsicht anderer wissenschaftlicher Publikationen finden sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Expression von Wnt-1. Stanczak et al. fanden in ihrer immunhistochemischen Studie an kolorektalen Primärtumoren sowie Normalmukosa gegensätzliches Expressionsverhalten von Wnt-1: eine stärkere Proteinexpression in der Normalmukosa und Abnahme der Expression in den Primärtumoren [91]. Zu einem gegenläufigen Ergebnis kamen Khor et al. Diese untersuchten an 47 kolorektalen Karzinomen die Wnt-1 Expression mittels immunhistochemischer Färbungen mit dem Ergebnis, dass die Expression signifikant höher in den Primärtumoren ausfiel, als im Vergleich zum Normalgewebe. Zugleich fanden sich jedoch auch vereinzelt Fälle, in denen die Expression in den Normalmukosen höher war, als in den Primärtumoren [92]. Eine weitere Studie zeigte ein homogenes Expressionsmuster [93]. Studien zu dem Expressionsverhalten von Wnt-1 in autologen Metastasen liegen nicht vor.

Die gegensätzlichen Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass weitere Wnt-1-unabhängige Mechanismen bestehen, welche zu einer nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führen und somit an Tumorprogression und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms beteiligt sind. Aufzuführen sind hier in erster Linie APC-Mutationen [9]. Jedoch scheint auch das den Tumor umliegende Gewebe (*Microenvironment*) mit den Tumorzellen zu interagieren und hierdurch auf Zellproliferation und Invasion miteinzuwirken [44].

Zum anderem ist bekannt, dass außer dem „klassischen“ (kanonischen) Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg sogenannte nicht-kanonische Wnt-Signalwege bestehen, welche ebenfalls in Bereichen wie Zelladhäsion, Zellmigration und Gestaltung des Zytoskeletts eine Rolle spielen. Nicht-kanonische Wnt-Signalwege sind  $\beta$ -Catenin-unabhängig. Möglich ist die Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges über die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Proteinkinase C (PKC) sowie CamKII (Wnt/  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg) oder über GTPasen wie Rho, Rac oder Cdc42 (PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg) [94]. Hierbei übernimmt nicht Wnt-1, sondern vor allem Wnt-4 und Wnt-5a die Signalübertragung an der Zellmembran [95].

### 4.3 APC

Die meisten kolorektalen Karzinome weisen als erste genetische Alteration eine APC-Mutation auf [9]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die höchste Proteinexpression von APC im Normalgewebe. In den Primärtumoren und insbesondere in den Metastasen war die Expression signifikant erniedrigt.

Eine erniedrigte Proteinexpression von APC in kolorektalen Karzinomen in Bezug auf tumorfreies Gewebe konnte durch Lugli et al. bestätigt werden [96]. Chen et al. konnten dieses Ergebnis in ihrer Studie ebenfalls belegen. Interessanterweise zeigte sich hier jedoch in den Lebermetastasen eine ähnlich hohe Proteinexpression von APC wie im Normalgewebe; teilweise war die Proteinexpression sogar höher [97].

Die verminderte Proteinexpression von APC in den kolorektalen Tumoren ist bedingt durch die Inaktivierung des APC-Genes durch Mutation und konsekutiver verminderter Proteinexpression. Dies trägt zu einer Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern bei. Eine weitere Möglichkeit ist die Hypermethylierung des Promotors von APC. Hierdurch kann ebenfalls eine Inaktivierung des APC-Genes erfolgen und somit zu einer nukleären Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führen [98], [99]. Es konnte gezeigt werden, dass in kolorektalen Metastasen eine Zunahme der Methylierung von APC zu verzeichnen ist, möglicherweise als Zeichen eines Tumorprogresses [97].

Gründe für eine wiederum erstarkte Proteinexpression in kolorektalen Metastasen könnte in dem heterogenen epigenetischen und genetischen Hintergrund der metastasierten Zellen liegen [97]. Es besteht die Möglichkeit, dass die Tumorzellen während der Tumorprogression ihre optimale „Wnt-Aktivität“ verlieren. Dies kann zum einen durch das veränderte Microenvironment bedingt sein, zum anderen durch die im Gegensatz zur normalen Zelle vorhandene Polyploidie. Knudsons „*Two-Hit*“-Hypothese basiert auf der Grundlage diploider Zellen. Diesem Modell zufolge ist ein Tumorsuppressorgen auf einem Allel durch eine *Frameshift*-Mutation inaktiviert und auf dem anderen Allel ebenfalls durch eine Mutation, oder durch *Loss of Heterozygosity* (LOH) [100].

Aufgrund des polyploiden Charakters der metastasierten Tumorzellen bestünde jedoch die Möglichkeit, dass zwei „*Hits*“ für eine Inaktivierung eines bestimmten Gens nicht mehr ausreichend sind. Somit wären ein „*3rd Hit*“ oder sogar weitere „*Hits*“ notwendig. Da es sich bei der Tumorprogression um einen dynamischen Prozess handelt, könnten verschiedene Aktivierungsstufen des APC-Genes vorliegen, welche unterschiedliche Expressionsmuster in kolorektalen Metastasen erklären könnten. Dies wäre als Reaktion der metastasierten Tumorzellen auf das veränderte *Microenvironment* zu werten, um sich wieder einer optimalen „Wnt -Aktivität“ anzunähern [101].

Hanahan und Weinberg stellten die These auf, dass Tumorprogression mit schrittweise entstehenden Akkumulationen von Mutationen in verschiedenen Signalwegen einhergehen [102]. Denkbar wäre jedoch auch, dass die Befähigung von Tumorzellen sich an veränderte Gegebenheiten anzupassen dem zu Grunde liegt, dass wiederholt der gleiche Signalweg Ziel von Mutationen ist. Hierdurch wären die Tumorzellen in die Lage versetzt, sich veränderten genetischen und zellulären Gegebenheiten anzupassen [101].

#### 4.4 Schlussfolgerung

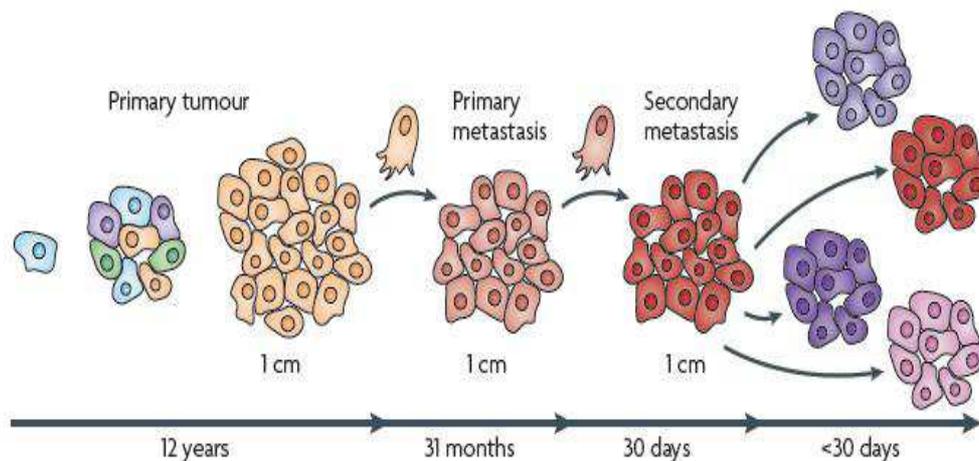
In vergleichbaren immunhistochemischen Studien zum Wnt-Signalweg wurde in erster Linie das Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin untersucht. Immunhistochemische Analysen zu APC oder Wnt-1 existieren ungleich weniger. Eine Charakterisierung aller drei Moleküle zusammen an demselben Patientenkollektiv und insbesondere in Zusammenhang mit synchroner lymphatischer und hepatischer Metastasierung wurde bis jetzt nicht beschrieben. Mit Hilfe dieser Studie war es möglich, das Expressionsmuster dieser drei Moleküle zueinander im Rahmen der synchronen Metastasierung von kolorektalen Karzinomen näher darzustellen.

Es konnte dargelegt werden, dass Mitglieder des Wnt-Signalweges kontextabhängig unterschiedlich exprimiert sind. Es ist möglich, dass der Wnt-Signalweg durch unterschiedliche Regulatoren aus der direkten Umgebung der Tumorzellen (*tumor microenvironment*) justiert wird, da die Expression von nukleärem  $\beta$ -Catenin von der unterschiedlichen Lokalisation der Tumorzellen (Invasionsfront versus zentrale Tumoranteile) abhängig zu sein scheint. Eine anfängliche APC- oder  $\beta$ -Catenin-Mutation ist für eine Aktivierung des Wnt-Signalweges notwendig, jedoch nicht ausreichend [103]. Zusätzlich könnten weitere somatische Mutationen in anderen Tumorsuppressor- und Onkogenen synergistisch die Aktivität des Wnt-Signalweges bestimmen. Intrinsische (Tumorzellen) und extrinsische Faktoren (*Microenvironment*) spielen somit wahrscheinlich wichtige Rollen in der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung, indem sie den aktivierten Wnt-Signalweg fein justieren [104].

Zusätzlich bestehen Hinweise, dass der Wnt-Signalweg mit anderen Signalwegen vernetzt ist. Im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg agiert Wnt-5a als Signalübermittler an der Zellmembran. Über die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Proteinkinase C (PKC) kann auf diese Weise die GSK 3 $\beta$  beeinflusst werden und hierdurch indirekt die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin [95]. Auch scheint der Wnt-Signalweg autoregulatorischen Gegebenheiten zu unterliegen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit herausgearbeitet werden, dass auf Proteinebene wichtige Mitglieder des Wnt-Signalweges in Primärtumoren und synchronen Metastasen heterogen exprimiert werden. Dies ist ein Ergebnis, welches in einer Studie zum Mamma-Karzinom von Wu und Mitarbeitern ebenfalls gezeigt werden konnte [105]. Dort konnte zum Beispiel belegt werden, dass EGFR (*epidermal growth factor receptor*) in den Metastasen signifikant hochreguliert ist gegenüber den Primärtumoren. Interessant könnte dies für mögliche Therapiestrategien sein, die gegen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gerichtet sind: Metastatische Läsionen wären sensitiver gegenüber einer solchen Therapie als die Primärtumore [105].

Diese beobachtete heterogene Expression ist ein wichtiger Aspekt der Metastasierung, denn bis vor einiger Zeit ging man davon aus, dass keine genetischen Unterschiede oder eine veränderte Proteinexpression von Mitgliedern wichtiger Signalwege innerhalb der Tumorzellen zwischen Metastasen und Primärtumoren vorliegen. Diese Ansicht war konform dem gängigen Modell der Tumorprogression, welches die Karzinogenese von der frühen Läsion zum invasiven Karzinom und letztendlich der soliden Metastase als mehrstufigen Prozess beschrieb (siehe Abb. 15) [15], [106].

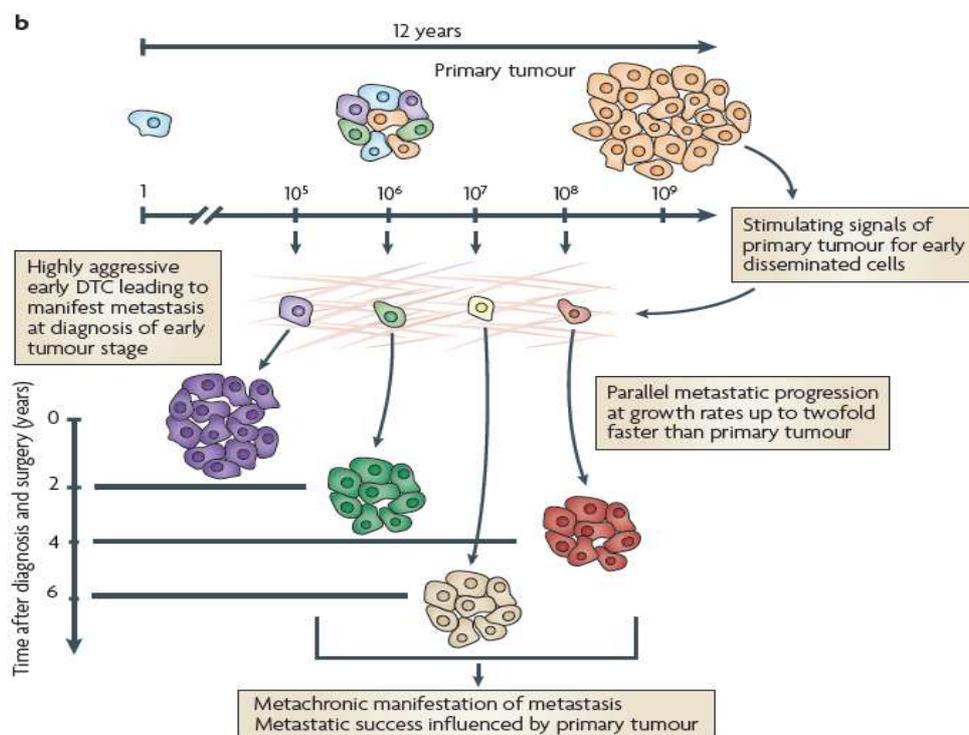


**Abb. 15.** Lineares Tumor-Progressionsmodell [107].

Im Rahmen dieser Entwicklung akkumulieren die Tumorzellen im Primärtumor genetische und epigenetische Veränderungen, die zu einem invasiven Tumor führen. Einige Tumorzellen erlangen dann durch weitere Mutationen die Fähigkeit zur Metastasierung, so dass die Disseminierung von Tumorzellen als ein spätes Ereignis zu werten ist.

Gegen dieses lineare Progressionsmodell sprechen jedoch neuere Studien, die eine molekulare Charakterisierung disseminierter Tumorzellen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) durchgeführt haben (siehe Abb. 16). Unterschiedliche genomische Aberrationen - wie genomische strukturelle

Veränderungen, Punkt-Mutationen oder subchromosomale DNA-Veränderungen - konnten zwischen Primärtumor, disseminierten Tumorzellen sowie soliden Metastasen an kolorektalen, Ösophagus- und Mamma-Karzinomen und anderen Tumor-Entitäten nachgewiesen werden [108]. Aufgrund dieser Tatsache ist von einer Disseminierung von Tumorzellen auszugehen, deren Ursache nicht in einer Selektion einzelner Zellklone oder genetischen Alterationen zu sehen ist. Die Disseminierung von einzelnen Tumorzellen kann zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Tumorprogression stattfinden und so zu einer allopatrischen Selektion einer Vielzahl variabler Zellen führen, welche an ihr jeweilig spezifisches *Microenvironment* angepasst sind [107].



**Abb. 16.** Paralleles Tumor-Progressionsmodell [107].

Bedingt durch diesen Selektionsdruck sowie der genetischen Instabilität der Tumorzellen kann dies zu unterschiedlichen genomischen Aberrationen zwischen Primärtumoren, disseminierten Zellen und soliden Metastasen führen [107], [108].

Hierdurch wären Tumoren zum Beispiel in der Lage, auf einen bestimmten Selektionsdruck selektiv zu reagieren und sich einer neuen bestehenden Situation anzupassen [109].

Baldus und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie zu KRAS-Mutationen an kolorektalen Primärtumoren sowie lymphatischen und soliden Metastasen eine genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen nachweisen. Es zeigte sich interessanterweise

zusätzlich eine intratumorale Heterogenität in den Primärtumoren im Sinne eines vermehrten Auftretens von KRAS-Mutationen in den zentralen Tumoranteilen [110].

Trotz unterschiedlicher genomischer Aberrationen konnten zwischen Primärtumoren, disseminierten Tumorzellen sowie soliden Metastasen auch gemeinsame genomische Aberrationen festgestellt werden. Dies könnte Ausdruck einer konvergenten Evolution bestimmter Zellklone eines Tumors sein. Hierbei könnten Tumorzellen im Rahmen der Tumorprogression von gemeinsamen genomischen Aberrationen profitieren [108].

Die Hälfte aller Tumorpatienten entwickeln postoperativ Metastasen oder Rezidive - häufig sogar Jahre nach Resektion des Primärtumors. Diese Patienten haben eine schlechte Überlebensprognose. Die Behandlungsoptionen für dieses Stadium der Erkrankung sind sehr limitiert und haben meist palliativen Charakter [111]. Eine adjuvante Chemotherapie kann das Risiko einer Fernmetastasierung reduzieren, ist aber aufgrund der hohen Nebenwirkungen nicht für alle Patienten indiziert. Neuere Therapien verfolgen deshalb den Ansatz einer angepassten, individuellen molekularen Interventionsstrategie („*Targeted Therapy*“). Dies ist mittlerweile durch das verbesserte Verständnis der Signalwege im Rahmen der Metastasierung möglich. Stellvertretend für die individualisierte Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist Cetuximab zu nennen, ein monoklonaler Antikörper gegen EGFR [112], [113]. Es konnte in zahlreichen Studien eine verbessertes Ansprechen der Therapie in Patienten mit nachgewiesenem Wildtyp-KRAS Status gezeigt werden (im Durchschnitt ca. 50%) [114-116]. Die genetische Heterogenität von KRAS-Mutationen und anderen abhängigen EGFR-Signalmolekülen (BRAF, PIK3CA) scheint das verminderte Ansprechen auch bei Patienten mit nachgewiesenem Wildtyp-KRAS Status zu erklären [109], [110]. In Zukunft könnte es möglich sein, dass aufgrund der bestehenden genomischen Aberrationen zwischen Primärtumoren und Metastasen zur Indikationsstellung einer entsprechenden individuellen molekularen Intervention anstelle aus Primärtumoren, Biopsien aus Metastasen zur pathologischen Begutachtung zu Rate gezogen werden [109].

Signifikante klinisch-pathologische Aussagen konnten in dieser Studie nicht getätigt werden, was jedoch auch nicht das primäre Ziel dieser Studie war. Hierfür war das Patientenkollektiv auch zu klein. Auffallend war dennoch die positive Korrelation zwischen der Expression von zytoplasmatischem  $\beta$ -Catenin und einer schlechten Differenzierung in den Lymphknotenmetastasen. In einer Studie zum Mamma-Karzinom konnte gezeigt werden, dass eine hohe zytoplasmatische Expression von  $\beta$ -Catenin mit einer schlechten Prognose einhergeht [117].

Weitere Studien konnten belegen, dass eine hohe nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin mit einem erhöhten Risiko von Lymphknoten- und Lebermetastasen sowie einer schlechten

Prognose korrelieren. Ebenso konnte gezeigt werden, dass höhere nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expressionen in adenomatösen Zwischenstufen das Risiko der Entwicklung eines Karzinoms signifikant erhöhen [118], [119]. Vielleicht ist es in Zukunft möglich,  $\beta$ -Catenin als klinischen Marker einzusetzen, um Hoch- von Niedrig-Risikopatienten zu unterscheiden und diese somit frühzeitig einer individualisierten Therapie zuführen zu können.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Perlet et al.: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392: 190–193, 1998.
- [2] D. Gottschalk et al.: Matrix gene expression analysis and cellular phenotyping in chordoma reveals focal differentiation pattern of neoplastic cells mimicking nucleus pulposus development. *The American journal of pathology*, 158: 1571–1578, 2001.
- [3] T. Kirchner et al.: Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 439: 512–522, 2001.
- [4] H. Tiedemann et al.: Pluripotent cells (stem cells) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis. *Development, growth & differentiation*, 43: 469–502, 2001.
- [5] T. Brabletz et al.: Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 441: 1–11, 2002.
- [6] T. Muto et al.: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36: 2251–2270, 1975.
- [7] J. Weitz et al.: Colorectal cancer. *Lancet*, 365: 153–165, 2005.
- [8] B. W. Stewart et al.: *World Cancer Report*. IARC Press, 2003.
- [9] A. Schalhorn et al.: *Manual Gastrointestinale Tumoren*. Zuckschwerdt Verlag, München, 2006.
- [10] Statistisches Bundesamt (Hrsg.): *Statistisches Jahrbuch 2008*. Für die Bundesrepublik Deutschland. Wiesbaden, 2008.

- [11] V. Verwaal et al.: Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, 21: 3737-3743, 2003.
- [12] O. Glehen et al.: Intraperitoneal chemohyperthermia and attempted cytoreductive surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *The British journal of surgery*, 91: 747–754, 2004.
- [13] J. P. Lynch et al.: The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 16: 775–810, 2002.
- [14] Y. Kondo et al.: Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer metastasis reviews*, 23: 29–39, 2004.
- [15] E. R. Fearon et al.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759–767, 1990.
- [16] S. Hamilton: *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics*, IARC Press, 2000.
- [17] L. Sobin: *UICC (2002) TNM classification of malignant tumors*. New York: Wiley&Sons, 2002.
- [18] W. Schmiegel et al.: S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 48: 65–136, 2010.
- [19] G. Wagner et al.: *Organspezifische Tumordokumentation: Prinzipien und Verschlüsselungsanweisungen für Klinik und Praxis (Tumordokumentation in Klinik und Praxis)*. Springer, 1995.
- [20] C. G. Lindstrom: Letter: Dukes classification of carcinoma of the rectum. *British medical journal*, 1: 461, 1976.

- [21] N. Scott et al.: Total mesorectal excision and local recurrence: a study of tumour spread in the mesorectum distal to rectal cancer. *The British journal of surgery*, 82: 1031–1033, 1995.
- [22] J. Hida et al.: Lymph node metastases detected in the mesorectum distal to carcinoma of the rectum by the clearing method: justification of total mesorectal excision. *Journal of the American College of Surgeons*, 184: 584–588, 1997.
- [23] J. H. Wong et al.: Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 17: 2896–2900, 1999.
- [24] R. S. Swanson et al.: The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Annals of surgical oncology*, 10: 65–71, 2003.
- [25] M. R. McAndrew et al.: Efficacy of routine preoperative computed tomography scans in colon cancer. *The American surgeon*, 65: 205–208, 1999.
- [26] K. Matzel et al.: Lokale Therapieprinzipien beim Rektumkarzinom. *Der Chirurg*, 74: 897-904, 2003.
- [27] S. Sengupta et al.: Local excision of rectal cancer: what is the evidence? *Diseases of the colon and rectum*, 44: 1345–1361, 2001.
- [28] Y. Fong et al.: Liver resection for colorectal metastases. *Journal of clinical oncology*, 15: 938–946, 1997.
- [29] E. Mamounas et al.: Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *Journal of clinical oncology*, 17: 1349–1355, 1999.
- [30] A. Benson et al.: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology*, 22: 3408-341, 2004.

- [31] A. Figueredo et al.: Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *Journal of clinical oncology*, 22: 3395–3407, 2004.
- [32] Colorectal Cancer Collaborative Group: Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet*, 358: 1291–1304, 2001.
- [33] C. Cammà et al.: Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 284: 1008–1015, 2000.
- [34] M. F. Brennan: Safety in numbers. *The British journal of surgery*, 91: 653–654, 2004.
- [35] E. V. A. Finlayson et al.: Effects of hospital volume on life expectancy after selected cancer operations in older adults: a decision analysis. *Journal of the American College of Surgeons*, 196: 410–417, 2003.
- [36] T. E. Le Voyer et al.: Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *Journal of clinical oncology*, 21: 2912–2919, 2003.
- [37] C. C. Compton et al.: Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Modern pathology*, 16: 376–388, 2003.
- [38] F. Rijsewijk et al.: The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, 50: 649–657, 1987.
- [39] R. P. Sharma et al.: Effect of the *Wingless* (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 48: 461–465, 1976.
- [40] R. Nusse et al.: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31: 99–109, 1982.

- [41] E. C. Woodhouse et al.: General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80: 1529–1537, 1997.
- [42] H. Gabbert et al.: Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clinical & experimental metastasis*, 3: 257–279, 1985.
- [43] M. Ono et al.: Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer*, 78: 1179–1186, 1996.
- [44] O. De Wever et al.: Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18: 1016–1018, 2004.
- [45] S. Hirohashi: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *The American journal of pathology*, 153: 333–339, 1998.
- [46] J. Behrens et al.: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382: 638–642, 1996.
- [47] M. Molenaar et al.: XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86: 391–399, 1996.
- [48] J. Behrens: The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochemical Society transactions*, 33: 672–675, 2005.
- [49] H. Clevers et al.: TCF/LEF factor earn their wings. *Trends in genetics*, 13: 485–489, 1997.
- [50] T. Brabletz et al.: Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *The American journal of pathology*, 156: 865–870, 2000.
- [51] T. C. He et al.: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281: 1509–1512, 1998.

- [52] M. Shtutman et al.: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5522–5527, 1999.
- [53] O. Tetsu et al.: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398: 422–426, 1999.
- [54] T. J. Koh et al.: Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *The Journal of clinical investigation*, 106: 533–539, 2000.
- [55] T. C. He et al.: PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 99: 335–345, 1999.
- [56] T. Yamada et al.: Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer research*, 60: 4761–4766, 2000.
- [57] M. G. Daidone et al.: Correspondence re: T. Zhang et al.: Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.*, 61: 8664-8667, 2001. *Cancer research*, 64: 776–777, 2004.
- [58] J. M. Mariadason et al.: Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer research*, 61: 3465–3471, 2001.
- [59] Y. Naishiro et al.: Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. *Cancer research*, 61: 2751–2758, 2001.
- [60] H. Lickert et al.: Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development*, 127: 3805–3813, 2000.
- [61] S. P. Rockman et al.: Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *The Journal of biological chemistry*, 276: 45113–45119, 2001.

- [62] M. Fujita et al.: Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer research*, 61: 7722–7726, 2001.
- [63] B. Mann et al.: Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 1603–1608, 1999.
- [64] T. Brabletz et al.: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology*, 155: 1033–1038, 1999.
- [65] H. C. Crawford et al.: The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 18: 2883–2891, 1999.
- [66] N. Barker et al.: The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *The EMBO journal*, 20: 4935–4943, 2001.
- [67] X. Zhang et al.: Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research*, 61: 6050–6054, 2001.
- [68] D. Gradl et al.: The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Molecular and cellular biology*, 19: 5576–5587, 1999.
- [69] F. Hlubek et al.: Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer research*, 61: 8089–8093, 2001.
- [70] V. J. Wielenga et al.: Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *The American journal of pathology*, 154: 515–523, 1999.
- [71] I. Sordat et al.: Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia. *The Journal of pathology*, 185: 44–52, 1998.
- [72] B. P. Nguyen et al.: Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Current opinion in cell biology*, 12: 554–562, 2000.

- [73] M. Gaire et al.: Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *The Journal of biological chemistry*, 269: 2032–2040, 1994.
- [74] Y. Kawasaki et al.: Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*, 289: 1194–1197, 2000.
- [75] R. Fodde et al.: Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature cell biology*, 3: 433–438, 2001.
- [76] K. B. Kaplan et al.: A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nature cell biology*, 3: 429–432, 2001.
- [77] J. Huang et al.: APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9049–9054, 1996.
- [78] K. Shitoh et al.: Frequent activation of the beta-catenin-Tcf signaling pathway in nonfamilial colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Genes, chromosomes & cancer*, 30: 32–37, 2001.
- [79] W. Liu et al.: Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature genetics*, 26: 146–147, Oct. 2000.
- [80] A. Duval et al.: Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer research*, 59: 4213–4215, 1999.
- [81] D. E. Aust et al.: Altered distribution of beta-catenin, and its binding proteins E-cadherin and APC, in ulcerative colitis-related colorectal cancers. *Modern pathology*, 14: 29–39, 2001.
- [82] American Joint Committee on Cancer (AJCC): *Cancer staging manual 7th edition*. Springer, New York, 2009.

- [83] W. Remmele et al.: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe*, 8: 138–140, 1987.
- [84] H. Mann: On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*, 18: 50-60, 1947.
- [85] K. Pearson: On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine*, 50: 157-175, 1900.
- [86] T. Brabletz et al.: Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathology, research and practice*, 194: 701–704, 1998.
- [87] T. Brabletz et al.: Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10356–10361, 2001.
- [88] F. Hlubek et al.: Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. *International journal of cancer*, 121: 1941–1948, 2007.
- [89] O. R. Bandapalli et al.: Transcriptional activation of the beta-catenin gene at the invasion front of colorectal liver metastases. *The Journal of pathology*, 218: 370–379, 2009.
- [90] T. J. Hugh et al.: beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *International journal of cancer*, 82: 504–511, 1999.
- [91] A. Stanczak et al.: Prognostic Significance of Wnt-1,  $\beta$ -catenin and E-cadherin Expression in Advanced Colorectal Carcinoma. *Pathology oncology research*, 17: 955–963, 2011.
- [92] T. O. Khor et al.: A comparative study of the expression of Wnt-1, WISP-1, survivin and cyclin-D1 in colorectal carcinoma. *International journal of colorectal disease*, 21: 291–300, 2006.

- [93] R. F. Holcombe et al.: Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Molecular pathology*, 55,: 220–226, 2002.
- [94] E. Vincan et al.: The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clinical & experimental metastasis*, 25: 657–663, 2008.
- [95] A. De: Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 43: 745–756, 2011.
- [96] A. Lugli et al.: Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology*, 50: 453–464, 2007.
- [97] J. Chen et al.: Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis*, 26: 37–43, 2005.
- [98] S. B. Baylin et al.: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in cancer research*, 72: 141–196, 1998.
- [99] S. B. Baylin et al.: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in genetics*, 16: 168–174, 2000.
- [100] A. Knudson: Alfred Knudson and his two-hit hypothesis. (Interview by Ezzie Hutchinson). *The lancet oncology*, 2: 642–645, 2001.
- [101] S. Segditsas et al.: APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene*, 28: 146–155, 2009.
- [102] D. Hanahan et al.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70, 2000.
- [103] C. Gaspar et al.: APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *The International journal of developmental biology*, 48: 377–386, 2004.
- [104] R. Fodde et al.: Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current opinion in cell biology*, 19: 150–158, 2007.

- [105] J. M. Wu et al.: Heterogeneity of breast cancer metastases: comparison of therapeutic target expression and promoter methylation between primary tumors and their multifocal metastases. *Clinical cancer research*, 14: 1938–1946, 2008.
- [106] R. Bernards et al.: A progression puzzle. *Nature*, 418: 823, 2002.
- [107] C. A. Klein: Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature reviews. Cancer*, 9: 302–312, 2009.
- [108] N. H. Stoecklein et al.: Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International journal of cancer*, 126: 589–598, 2010.
- [109] J. S. Vermaat et al.: Primary colorectal cancers and their subsequent hepatic metastases are genetically different: implications for selection of patients for targeted treatment. *Clinical cancer research*, 18: 688–699, 2012.
- [110] S. E. Baldus et al.: Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clinical cancer research*, 16: 790–799, 2010.
- [111] R. Bendardaf et al.: Prognostic and predictive molecular markers in colorectal carcinoma. *Anticancer research*, 24: 2519–2530, 2004.
- [112] E. Van Cutsem: Optimizing administration of epidermal growth factor receptor-targeted agents in the treatment of colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 6: 60–65, 2007.
- [113] E. Van Cutsem et al.: The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. The integration of cytotoxics and biologicals in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 21: 1089–1108, 2007.
- [114] A. Lièvre et al.: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research*, 66: 3992–3995, 2006.

- [115] F. Di Fiore et al.: Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *British journal of cancer*, 96: 1166–1169, 2007.
- [116] S. Khambata-Ford et al.: Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology*, 25: 3230–3237, 2007.
- [117] E. López-Knowles et al.: Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 19: 301–309, 2010.
- [118] S. C. C. Wong et al.: Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clinical cancer research*, 10: 1401–1408, 2004.
- [119] L. Wang et al.: Prognostic value of nuclear beta-catenin overexpression at invasive front in colorectal cancer for synchronous liver metastasis. *Annals of surgical oncology*, 18: 1553–1559, 2011.

## 6. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mir eine unbeschwerte Kindheit in meiner Heimat Wuppertal ermöglicht haben und mich mit Ihrer Liebe und Ihrem Verständnis auf dem nicht immer einfachen Weg des Erwachsenwerdens begleitet haben. Ohne Ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht wäre Vieles für mich heute Selbstverständliche nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel möchte ich mich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein, der mir das Thema der vorliegenden Abhandlung zur Bearbeitung überlassen hat, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Als Doktorvater, Betreuer und Freund in einer Person hat er es immer wieder aufs Neue verstanden mich für die onkologischen Aspekte der Chirurgie sowie für das wissenschaftliche Arbeiten zu begeistern.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Chirurgischen Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die schöne Zeit bedanken. Sie haben einen nicht unerheblichen Teil dazu beigetragen, dass ich gerne zum Arbeiten in das Labor gegangen bin.

Herrn Gideon Kückelhaus verdanke ich mein Interesse für die Chirurgie. Ohne die Famulaturen unter seiner Obhut hätte ich nicht den Berufsweg eines Chirurgen eingeschlagen. Ich denke sehr gerne an diese Zeit zurück.

## 7. Lebenslauf

Name:	Sebastian Kraus
Geburtsdatum:	25.05.1978
Geburtsort:	Wuppertal
Familienstand:	ledig
1984-1988	Grundschule
1988-1997	Gymnasium
07/1994-12/1994	Schüleraustausch in Guadalajara, Mexiko
06/1997	Allgemeine Hochschulreife
07/1997-06/1998	Zivildienst, Johanniter-Unfall-Hilfe Wuppertal
06/1998-12/1998	Rettungsassistentenschule Klinikum Niederberg, Velbert
01/1999-12/1999	Feuerwehr der Stadt Kerpen als Rettungsassistent im Anerkennungsjahr
04/2000-05/2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
06/2007	Approbation als Arzt
Seit 10/2007	Assistenzarzt, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. T. Knoefel)

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf im Dezember 2012

Sebastian Kraus