Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von EGFR, K-ras, PTEN, VEGF, Hif-1 α, Survivin, XIAP und Smac/DIABLO in Lymphknotenmetastasen kolorektaler Karzinome

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Quentine Mary Pye

2016

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. N.H. Stoecklein

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Mittlerweile stehen Ärzten/innen viele therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung erkrankter Patienten/innen zur Verfügung. Allerdings sprechen, bei identischen Voraussetzungen, nicht alle Erkrankten gleich auf eine Behandlung an. Die Gründe für derartige Unterschiede im Outcome stehen heute im Zentrum der Forschung. Es ist eine Vielzahl von Biomarkern bekannt, die in die Biologie des kolorektalen Karzinoms eingreifen. Beruhend auf dem Nachweis solcher Marker werden schon heute Entscheidungen für oder gegen eine spezifische Therapie getroffen und Patienten genau selektiert. Und dennoch erlebt die Medizin immer wieder Rückschläge in der Behandlung von Tumorpatienten. Ziel ist es, die an der Karzinogenese beteiligten Biomarker therapeutisch zu nutzen. Hierfür muss histopathologisch und auf molekularer Ebene eine dezidierte Markerklassifikation der jeweiligen Tumorentität erfolgen. Im Anschluss können Patienten anhand des Markerprofils für eine Therapie selektiert werden.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die vergleichende Analyse von acht an der kolorektalen Karzinogenese beteiligten Biomarkern. Untersucht wurden der Wachstumsrezeptor EGFR, das Ras-Protein K-ras, das Tumorsuppressorgen PTEN, die Apoptoseinhibitoren Survivin und XIAP, das mitochondriale Protein Smac/DIABLO, sowie die Angiogenesefaktoren VEGF und Hif-1α. Anhand der vergleichenden Untersuchung der Expression dieser Marker im Primärtumor und in korrespondierenden Lymphknotenmetastasen sollte untersucht werden, ob die Ausprägung der Marker in Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase miteinander korrelierte und ob es Einflüsse auf das Überleben gab.

Hierfür wurden Tissue microarrays von Lymphknotenmetastasen angefertigt, die Biomarker mittels Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar gemacht und anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Auswertung der korrespondierenden Primärtumoren war Inhalt von zwei vorangegangenen Dissertationen, deren Daten vorlagen. Für die statistische Analyse wurden absolute und relative Häufigkeiten errechnet und eine Rangkorrelation mittels Spearman`schem Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass Survivin, XIAP und Smac/DIABLO nicht in den Primärtumoren untersucht worden waren, weshalb für diese keine Aussage hinsichtlich der Korrelation zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase gemacht werden konnte. Für EGFR, K-ras, VEGF und Hif-1α konnte eine Korrelation zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase nachgewiesen werden. PTEN hingegen zeigte keine Korrelation zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Survivin, XIAP und VEGF in etwa gleichem Ausmaß in den Lymphknotenmetastasen exprimiert wurden. Eine Assoziation mit dem Überleben konnte für keinen der acht Marker bestätigt werden.

Diese Ergebnisse implizieren zum einen ein großes Maß an Homogenität zwischen der Markerexpression im Primärtumor und in der Lymphknotenmetastase. Die Studienlage hierzu ist kontrovers, in einigen Arbeiten wurden ähnliche Ergebnisse erhoben, in anderen eine deutliche Heterogenität zwischen Primärtumor und Metastase dokumentiert. Weitere Studien sind erforderlich, bevor entschieden werden kann, ob im klinisch-pathologischen Alltag Primärtumoren oder Lymphknotenmetastasen untersucht werden sollten.

VEGF, Survivin und XIAP zeigten eine Koexpression in den Metastasen. Eine solche Ko-Expression von Biomarkern in Metastasen maligner Tumore ist bisher nicht umfassend untersucht und mit klinisch-pathologischen Faktoren korreliert worden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass das Markerprofil von Primärtumor und Metastase ein hohes Maß an Homogenität aufweist. Um eine prognostische Aussagekraft und Möglichkeit für therapeutische Intervention genauer zu untersuchen, sind weitere Studien erforderlich.

Abkürzungen

AI	Apoptotic index
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
BIR	Baculovirus IAP repeat
CIMP	CPG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CPG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln
CPP	Chromosomal passenger protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPR-1	Effector cell protease receptor-1
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FOLFIRI	Folinsäure, 5- Fluoruracil, Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Oxaliplatin
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosintriphosphat exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
Hif-1	Hypoxia-inducible factor-1
HNPCC	hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HRE	Hypoxieresponsive Elemente
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IAP	Inhibitor of apoptosis
IF	Invasionsfront
IRS	Immunoreactive Score
K-ras	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
LK	Lymphknoten
MMR	Mismatch-Reparatur-Gen
MST	Mikrosatelliteninstabilität
NF-κB	Nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
PI	Proliferating cell nuclear antigen labelling index
PI3K	Phophatidylinositol-3-Kinase
PT	Primärtumor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
SiRNA	Small interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspases
DIABLO	direct IAP-binding protein with low isoelectric point
TGF	Transforming growth factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis inducing ligand
TZ	Tumorzentrum
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XIAP	X-linked inhibitor-of-apoptosis protein

INHALT

1. EINLEITUNG 1

1.1 Die Pathologie des kolorektalen Karzinoms 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Ätiologie 1
1.1.3 Pathogenese 2
1.1.4 Morphologie des kolorektalen Karzinoms 3
1.1.5 Staging und Grading 4

1.2 EGFR und K-Ras in epithelialen Geweben und Tumoren 6
1.2.1 EGFR 6
1.2.2 K-ras 8

1.3 PTEN in epithelialen Geweben und Tumoren 9

1.4 IAPs in epithelialen Geweben und Tumoren 11
1.4.1 Einführung 11
1.4.2 Survivin 11
1.4.3 XIAP 13

1.5 Smac/DIABLO in epithelialen Geweben und Tumoren 15

1.6 Angiogenese Faktoren in epithelialen Geweben und Tumoren 17
1.6.1 Einführung 17
1.6.2 VEGF 17
1.6.3 Hif-1 18

1.7 Fragestellung der Arbeit 20

2. MATERIAL UND METHODEN 21

2.1. Patientenkollektiv 21

2.2. Tissue microarrays 21
2.2.1 Herstellung der Tissue microarrays 22

2.3 Immunhistochemie 23
2.3.1 Verwendete Antikörper 23
2.3.2 Immunhistochemische Methode 24
2.3.3 Färbeprotokolle 24

2.4 Mikroskopische Auswertung und statistische Analyse 27

3. ERGEBNISSE 28

3.1 Patientenkollektiv 28

3.2 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter 28

3.3 Statistische Analyse der Protein-Immunhistochemie 29
3.3.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und der Färbeintensität 29

3.3.2 Korrelation von EGFR-, K-Ras-, PTEN-, VEGF- und Hif-1α-Expression in Lymphknoten und Primärtumor und immunhistochemische Expressionsmuster 30
3.3.3 Häufigkeitsverteilung, Färbeintensität und immunhistochemisches Expressionsmuster für Survivin, XIAP und Smac/DIABLO 37
3.3.4 Anteil der acht untersuchten Proteine in den Lymphknotenmetastasen 40
3.3.5 Überlebensanalyse 41

4. DISKUSSION 41

4.1 Einleitung 41

4.2 EGFR 42

4.3 K-Ras 45

4.4 PTEN 48

4.5 VEGF 51

4.6 Hif-1α 54

4.7 Survivin und XIAP 56

4.8 Smac/DIABLO 57

4.9 VEGF, Survivin und XIAP 58

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 60

6. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS 62

1. Einleitung

1.1 Die Pathologie des kolorektalen Karzinoms

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland erkrankten im Jahr 2008 35.350 Männer und 30.040 Frauen an einem kolorektalen Karzinom. Mit einem prozentualen Anteil von 14,3% bei den Männern und 13,5% bei den Frauen rangiert das kolorektale Karzinom hiermit nach Prostata- und Mammakarzinom an Platz zwei der Krebsneuerkrankungen. Auch hinsichtlich der Sterbefälle in 2008 belegt das kolorektale Karzinom den zweiten Platz. Das Risiko zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter. Mehr als die Hälfte aller Fälle betreffen Menschen jenseits des 70. Lebensjahres. Erfreulicherweise wird jedoch - bei beiden Geschlechtern - ein Rückgang der altersstandardisierten Sterberaten um 20% in den letzten 10 Jahren verzeichnet (Krebsregister Deutschland, 2012).

In Europa steigt die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms mit zunehmendem Alter stark an. Interessant hierbei ist jedoch, dass sich das mediane Erkrankungsalter europaweit unterscheidet (Brenner et al., 2008).

Weltweit belegt das kolorektale Karzinom bei Männern den dritten Platz der neudiagnostizierten malignen Tumoren, bei Frauen sogar den zweiten Platz mit mehr als 1,2 Millionen Neuerkrankungen bei beiden Geschlechtern insgesamt in 2008. Die höhesten Inzidenzraten finden sich in Australien, Neuseeland, Europa und Nordamerika, die niedrigsten in Afrika und Asien (Jemal et al., 2011).

1.1.2 Ätiologie

70-80% der kolorektalen Neoplasien entstehen sporadisch (Karoui et al., 2007). Dieses Geschehen ist multifaktoriell bedingt. Hierbei spielt die Lebensführung der Betroffenen eine bedeutende Rolle. Besonders die Ernährung ist wesentlich für die Erkrankung, sie kann diese je nach Zusammensetzung begünstigen oder ihr entgegenwirken. In einer Vielzahl von Studien wurde nachgewiesen, dass hohe Aufnahme von Fett und tierischem Protein ein Risikofaktor für die Entwicklung von intestinalen Neoplasien darstellt. Der Verzehr von reichlich Ballaststoffen, Früchten und Gemüse hingegen hat einen protektiven Effekt (Campos et al., 2005). Besonders der regelmäßige Verzehr von rotem Fleisch steht in Zusammenhang mit der Entwicklung von intestinalen Karzinomen. Die statistische Auswertung mehrerer voneinander unabhängiger Studien

im Jahre 2002 wies ein erhöhtes Risiko von 35% für kolorektale Neoplasien bei hohem Konsum von rotem Fleisch nach (Cross and Sinha, 2004).

Durch problematisches Ernährungsverhalten hervorgerufene sogenannte „Lifestyle-related-diseases“ wie Diabetes, Adipositas, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz werden auch mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Neoplasien assoziiert (Takahashi et al., 2007). Auch langjähriger Abusus von Nikotin (mindestens 16 Jahre) wurde in einer Studie als Risikofaktor für die Entwicklung von Neoplasien identifiziert (Tiemersma et al., 2002). In einer Studie, die den Zusammenhang zwischen moderatem Alkoholkonsum (max. 30 g/d (Park et al., 2010)) und erhöhtem Neoplasierisiko untersuchte, wurde hingegen keine signifikante Risikoerhöhung im Vergleich zur abstinenten Kontrollgruppe gefunden, nachdem Lebensführung und dietätische Faktoren an diese angepasst worden waren (Park et al., 2009).

Neben der Lebensführung stellen auch langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wichtige Risikofaktoren für das Entstehen kolorektaler Karzinome dar. Auf deren Boden entwickeln sich nach Schätzungen ≤ 2% der kolorektalen Karzinome jährlich (Triantafillidis et al., 2009).

Einen geringen Anteil an kolorektalen Neoplasien stellt die familiäre Disposition aufgrund genetischer Determination. Hierbei fallen ≤ 1% der Fälle auf die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und 2-3% auf das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) (Karoui, Tresallet et al., 2007).

1.1.3 Pathogenese

Die Pathogenese aller kolorektalen Karzinome unterliegt genetischer Instabilität, welche man in zwei Kategorien unterteilt: Zum einen die chromosomale Instabilität (CIN) in ca. 80-85% der Fälle, zum anderen die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in ca. 15% der Fälle (Hung and Chung, 2006).

Im Modell der CIN kommt es zu progressiven Veränderungen der DNA mit Aktivierung von Onkogenen und Inhibition von Tumorsuppressor-Genen. Dies führt in einem stufenweisen Prozess zur Umwandlung von Kolonmukosa in ein kolorektales Karzinom. In der Mehrzahl der Fälle verläuft diese Umwandlung der Schleimhaut über die Vorläuferläsion des Adenoms und kann Dekaden dauern. Durch Hyperproliferation und verminderte Apoptose kommt es in der Schleimhaut zur Entwicklung dieser Polypen und mit zunehmendem Dysplasiegrad zur Entstehung eines malignen Tumors (Alberts, 2002). Dies wird als Adenom-Karzinom Sequenz bezeichnet, bei der es nach

Vogelstein et al. initial zu molekulargenetischen Veränderungen im APC-Gen (Adenomatöses Polyposis Coli Gen) und zum Verlust der Heterozygosität im zugehörigen Chromosom in frühesten Stadien der Polypenbildung kommt. Im nächsten Schritt finden Mutationen im ras-Gen statt, welche dazu führen, dass ein ursprünglich kleines Adenom schneller wachsen kann und einen höheren Dysplasiegrad erreicht. Schließlich sind Mutationen im p53-Gen späte Ereignisse auf der Schwelle vom vorangeschrittenen Adenom zum invasiven Karzinom (Watanabe and Muto, 2000). Dieser die Mutation des APC-Gens als initiales Element der Karzinomentstehung enthaltende Weg begründet sowohl die Entstehung von sporadischen Neoplasien als auch die der FAP. Es gibt jedoch noch einen anderen der Karzinomentstehung zugrunde liegenden Weg. Es handelt sich hierbei um Mutationen in DNA-Mismatch-Reparatur-Genen (MMR). Diese führen zum Auftreten von MSI infolge defekter DNA-Reparatur. Diese MSI wurden bei der Erforschung von Patienten mit dem HNPCC-Syndrom entdeckt (Hung and Chung, 2006). Ein aufgrund dieser MSI häufig von Mutationen betroffenes Gen ist unter anderem der TGF-beta-Rezeptor. Es handelt sich dabei um ein Tumor-Suppressor-Gen, dessen Inaktivierung zu Zellproliferation führt (Treanor and Quirke, 2007). Es existiert eine Reihe weiterer Gene, die an der Regulation der Zellproliferation, dem programmiertem Zelltod und dem Erhalt der genomischen Integrität beteiligt sind.

Zuzüglich zu genetischen Mutationen können auch epigenetische Veränderungen die Karzinogenese bedingen. Die beim kolorektalen Karzinom am häufigsten vorkommende ist die aberrante Methylierung der DNA im Bereich von Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln (CPG), auch CPG Island Methylator Phenotype (CIMP) genannt, in bestimmten Promotorregionen. Diese Methylierung führt nachweislich zur Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen (Hung e Chung, 2006).

1.1.4 Morphologie des kolorektalen Karzinoms

Der überwiegende Anteil der Karzinome entsteht im rektosigmoidalen Bereich des Darms, in den letzten Jahren steigt der Anteil der proximal gelegenen Karzinome jedoch an. Makroskopisch unterscheidet man polypoid (exophytisch), ulzerierend (endophytisch) und diffus-infiltrierend wachsende Tumoren, Mischformen sind häufig (Böcker et al., 2008).

Es handelt sich histologisch in den meisten Fällen um Adenokarzinome. Diese werden abhängig vom Ausmaß der Drüsenbildung in hoch (> 95% Drüsenbildung), mäßig (50-

95% Drüsenbildung) und niedrig differenzierte (0-49% Drüsenbildung) Adenokarzinome unterteilt (WHO, 2010). Des Weiteren handelt es sich bei Karzinomen mit viel extrazellulärem Schleim (> 50%) um muzinöse Karzinome, solche mit intrazellulären Schleimvakuolen (> 50% der Tumorzellen) werden als Siegelringzellkarzinome bezeichnet. Beim adenosquamösen, kleinzelligen und medullärem Karzinom sowie dem Plattenepithelkarzinom handelt es sich um seltene histologische Varianten (Böcker et al., 2008).

1.1.5 Staging und Grading

Dukes führte 1932 die erste Stadieneinteilung für das kolorektale Karzinom ein, die auch heute in Grundzügen noch Gültigkeit besitzt. 1967 ergänzte Turnbull sie um das Stadium D (Fernmetastasen). Heute teilt man das kolorektale Karzinom nach der 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren der UICC von 2010 ein. In diese Einteilung gehen die TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung, der histopathologische Differenzierungsgrad, die Residualtumorklassifikation nach Resektion und fakultative Deskriptoren wie die venöse Invasion, die Lymphgefäßinvasion und die perineurale Invasion ein (Tabellen 1-3) (Hiddemann et al., 2004) (Wittekind and Meyer, 2010).

Einteilung	Beschreibung
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 durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nichtperitonealisiertes perikolisches oder perirektales Fett
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	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten N1a Metastase in 1 regionärem Lymphknoten N1b Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten N1c Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten N2a Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten N2b Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen M1a Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten) M1b Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum
Pn – Perineurale Invasion	
PnX	Perineurale Invasion kann nicht beurteilt werden
Pn0	Keine perineurale Invasion
Pn1	Perineurale Invasion

Tabelle 1 **TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms** (Wittekind and Meyer, 2010)

Grad	Beschreibung
G 1	Gute Differenzierung: Ein Karzinom mit histologisch und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel sehr ähnlich sind
G 2	Mäßige Differenzierung: Ein Karzinom, das im Differenzierungsmuster zwischen G I und G III einzuordnen ist
G 3	Schlechte Differenzierung: Ein Karzinom mit histologischen und zellulären Merkmalen, die normalem Epithel kaum ähneln
G 4	Undifferenziert: Es lassen sich keine glandulären- oder plattenepitheltypischen Differenzierungsmuster erkennen

Tabelle 2 **Histopathologisches Grading des kolorektalen Karzinoms** (Hiddemann et al., 2004)

Stadium	TNM-Klassifikation			Dukes
Stadium 0	Tis	N0	M0	---
Stadium I	T1, T2	N0	M0	Dukes A
Stadium IIA	T3	N0	M0	Dukes B
Stadium IIB	T4	N0	M0	---
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0	Dukes C
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0	---
Stadium IIIC	Jedes T	N2	M0	---
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	Dukes D

Tabelle 3 **Stadiengruppierung des kolorektalen Karzinoms, Vergleich mit der Dukes-Klassifikation** (Hiddemann et al., 2004)

1.2 EGFR und K-Ras in epithelialen Geweben und Tumoren

1.2.1 EGFR

Der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor) ist ein transmembranes 170 k-Da Glykoprotein und gehört zur erbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die wichtigsten Liganden sind EGF (epidermal growth factor) und TGF-α (transforming growth factor-α) (Herbst, 2004). Die Aktivierung von EGFR setzt Signalkaskaden in Gang, die zu erhöhter Zellproliferation und zunehmender Migration, Invasion und Metastasierung der Tumorzelle führen. Außerdem kann die

Tumorangiogenese induziert und die Apoptoserate vermindert werden (Deng et al., 2009).

EGFR-Expression findet sich in einer Vielzahl menschlicher Tumore, beispielsweise in Gliomen, Lungenkarzinomen, in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, der Brust, der Bauchspeicheldrüse, der Harnblase oder der Niere (Krasinskas, 2011).

Assoziationen mit schlechter Prognose und reduziertem Überleben wurden hierbei beobachtet. Außerdem spielt sie eine Rolle bei der Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika und Radiatio (Herbst, 2004).

Im kolorektalen Karzinom wird die EGFR-Expression in vielen Studien mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Die Ergebnisse unterscheiden sich häufig hinsichtlich der Expressionsraten: EGFR-Expression (n=102) in 75,5% der Fälle (Goldstein and Armin, 2001); EGFR-Expression (n=249) in 72,7% (McKay et al., 2002); EGFR-Expression (n=474) in 82,1% der Fälle (Cunningham et al., 2004). Dies ist auch der Variabilität der Immunhistochemie geschuldet, welche unter anderem bedingt sein kann durch unterschiedliche Antikörperklone, Färbeprotokolle, Scoringverfahren und CutOff-Werte. Aus diesem Grund ist die Studienlage zur klinischen Signifikanz der EGFR-Expression und deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Faktoren sowie der Prognose beim kolorektalen Karzinom kontrovers (Krasinskas, 2011).

Die im Folgenden zitierten Arbeiten basieren sämtlich auf immunhistochemischen Methoden.

Einen Bezug zwischen EGFR-Expression und fortgeschrittenem Tumorstadium fanden Spano et al. und Theodoropoulos et al. (Spano et al., 2005; Theodoropoulos et al., 2009).

Mc Kay et al. und Abd El All et al. konnten eine Assoziation zwischen der EGFR-Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors nachweisen, wohingegen Resnick et al., Goldstein et al. und Spano et al. dies nicht gelang (Abd El All et al., 2008; Goldstein and Armin, 2001; McKay et al., 2002; Resnick et al., 2004; Spano et al., 2005).

Auch hinsichtlich der Korrelation der EGFR-Expression mit dem Überleben besteht in den gesichteten Studien kein Konsens. Einige Arbeitsgruppen stellten eine Korrelation mit verminderten Überlebensraten fest (Goldstein and Armin, 2001; Resnick et al., 2004), andere hingegen nicht (McKay et al., 2002; Saeki et al., 1995; Spano et al., 2005; Yasui et al., 1988).

Die EGFR-Expression scheint beim kolorektalen Karzinom jedoch Einfluss auf die Aggressivität und das Metastasierungspotential zu nehmen. Schon 1995 wiesen Radinsky et al. nach, dass es bei erhöhter Proteinexpression vermehrt zur Bildung von Lebermetastasen kommt (Radinsky et al., 1995). Abd El All et al. konnten 2008 eine Korrelation zwischen EGFR-Expression, Lymphknotenmetastasen und dem Einbruch in Lymphgefäße nachweisen (Abd El All et al., 2008). Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen von Karameris et al., die 1993 das vermehrte Auftreten von mesenterialen Lymphknotenmetastasen mit einer erhöhten EGFR-Expression korrelieren konnten (Karameris et al., 1993).

In der Metaanalyse von Nicholson et al. wurde EGRF nur als mäßiger Prognoseindikator eingestuft (Nicholson et al., 2001). Auch in anderen Studien konnte EGFR nicht als unabhängiger Prognoseindikator identifiziert werden (Spano et al., 2005; Theodoropoulos et al., 2009). Eine Metaanalyse von 2013 hingegen konnte EGFR als Prognoseindikator identifizieren (Hong et al., 2013).

1.2.2 K-ras

K-ras gehört zur Familie der Ras-Proteine, zu der die Proteine H-ras, N-ras und K-ras in seinen beiden Formen 4A und 4B gehören. Es handelt sich um eine Gruppe von GTPasen, die in sich homolog und an der inneren Plasmamembran lokalisiert sind. Die Ras-Proteine bestehen aus 188 Aminosäuren, bzw. 189 Aminosäuren im Fall von K-ras 4B, und haben eine molare Masse von 21 kDa (Ellis and Clark, 2000).

Die Ras-Proteine liegen entweder in inaktiver, GDP-gebundener oder aktiver, GTP-gebundener Form vor. Durch GTP-Austauschfaktoren (GEF - *Guanosine triphosphate Exchange factor*) kommt es zum Austausch von GDP zu GTP und zur Aktivierung des Ras-Proteins. GTPase-aktivierende Proteine (GAP – *GTPase-activating proteins*) spalten GTP mittels Hydrolyse zu GDP und inaktivieren den Komplex (Castagnola and Giaretti, 2005).

Es wurde eine Reihe von Mutationen in den Ras-Genen identifiziert, die zu konstitutiver Aktivierung führen. In Folge dieser Aberrationen kommt es zu gesteigerter und unkontrollierter Zellproliferation und maligner Transformation (Elsabah and Adel, 2013).

Diese Punktmutationen finden sich in hoher Prävalenz in menschlichen Karzinomen, meist lokalisiert in Kodon 12, 13 oder 61. Die Folge ist Resistenz für die GAP-induzierte Inaktivierung. Mutationen von K-ras stellen die Mehrheit dar. Häufige

Neoplasien mit K-ras-Mutation sind Pankreas, das kolorektale Karzinom und die Lunge (Friday and Adjei, 2005).

Mutationen im K-ras-Onkogen treten bereits früh in der Adenom-Karzinom-Sequenz auf. Die Häufigkeit der Mutationen nimmt hierbei mit der Größe der Adenome zu (Vogelstein et al., 1988). In ca. 30-60% aller kolorektalen Karzinome ist K-ras mutiert, in den Übrigen liegt der Wildtyp vor (Liu et al., 2011; Wicki et al., 2010).

Die zumeist angewandte Methode zur Testung von Geweben auf K-ras-Mutation ist aufgrund der auch noch bei niedriger Tumorzelllast guten Sensitivität die PCR. Elsabah et al. konstatieren, dass zur Erfassung der K-ras-Mutation zukünftig eine Ergänzung um immunhistochemische Methoden sinnvoll sein könnte (Elsabah and Adel, 2013).

Bisher haben sich viele Studien mit der Assoziation zwischen K-ras-Mutation und klinisch-pathologischen Charakteristiken beim kolorektalen Karzinom beschäftigt. Die Ergebnisse sind jedoch kontrovers. Conlin et al. wiesen eine Korrelation zwischen K-ras-Mutation und verringertem Überleben nach und stuften K-ras auch als Marker für die Aggressivität des Tumors ein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Geido et al. und einer früheren Studie von Cerottini et al. 1998 (Cerottini et al., 1998; Conlin et al., 2005; Geido et al., 2002). In der großen Multi-Center-Studie „RASCAL“ konnte ebenfalls ein höheres Risiko für ein Rezidiv mit Todesfolge bei vorliegender K-ras-Mutation belegt werden (Andreyev et al., 1998).

Smakman et al. konstatieren, dass bei kolorektalen Karzinomen mit K-ras-Mutation eine stärkere Tendenz dazu besteht, Metastasen zu bilden (Smakman et al., 2005).

Andere Arbeitsgruppen hingegen, wie die von Roth et al., konnten keinen Zusammenhang von K-ras-Mutation mit schlechter Prognose nachweisen (Roth et al., 2010). Und auch die Ergebnisse von Morrin et al. und Markowitz et al. widersprechen der Annahme, dass K-ras einen negativen Einfluss auf das Überleben beim kolorektalen Karzinom hat (Markowitz et al., 1995; Morrin et al., 1994).

Die Metaanalyse von Ren et al. konnte ebenfalls keine Assoziation von K-ras-Mutationen mit der Prognose erkrankter Patienten feststellen (Ren et al., 2012).

1.3 PTEN in epithelialen Geweben und Tumoren

Bei PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) handelt es sich um eines der am häufigsten mutierten Tumorsuppressorgene in Krebserkrankungen des Menschen. Es befindet sich auf Chromosom 10q23, einem Genlocus, der in Primärtumoren sehr empfänglich für Mutationen ist. Die Häufigkeit von Mutationen

wird bei sporadischen Tumoren auf ca. 50% bis 80% geschätzt, wie zum Beispiel beim Endometriumkarzinom, Glioblastom oder Prostatakarzinom. Bei Brustkrebs und bösartigen Neubildungen von Lunge und Colon beträgt die Mutationsrate ca. 30% bis 50%. Der komplette Verlust von PTEN ist assoziiert mit fortgeschrittenen Tumoren und Metastasierung (Salmena et al., 2008).

PTEN ist eine Lipidphosphatase, deren Hauptaufgabe die Regulation der PI3K-Signalwege darstellt. PI3Ks (Phosphatidylinositol-3-Kinasen) sind Proteine, die unter anderem Wachstum, Metabolismus und Proliferation der Zelle regulieren. Der Verlust und die Mutation von PTEN wurde in einer Vielzahl maligner Tumore nachgewiesen und führte dort zu übermäßiger PI3K-Aktivierung (Carracedo and Pandolfi, 2008).

Da die homozygote Deletion von PTEN embryonale Letalität verursacht, geht man davon aus, dass PTEN essentiell für die embryonale Entwicklung ist. Aktuelle Studien zeigen auch, dass PTEN eine Rolle in der Erhaltung chromosomaler Stabilität spielt, da der Verlust von PTEN zu ausgedehnten Veränderungen der Chromosomen führt. In PTEN-defizienten Zellen kommt es zu erhöhter Proliferation und Migration und verminderter Apoptose. Die Überexpression von PTEN in Karzinomzellen hingegen führte zu Apoptose, Blockade der Zellzyklusprogression und Zellmigration (Yin and Shen, 2008).

Schon im Jahr 2000 stellten Guanti et al. einen Zusammenhang zwischen einer Mutation im PTEN-Gen und der Entstehung kolorektaler Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität fest (Guanti et al., 2000). Auch Jang et al. wiesen den Verlust der PTEN-Expression häufiger bei Karzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität nach. Als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben konnte PTEN-Verlust jedoch nur bei Tumoren im Stadium II identifiziert werden (Jang et al., 2010). Colakoglu et al. identifizierten PTEN-Verlust sogar als unabhängigen Parameter für das Auftreten von Lokalrezidiven, konnten im Gegensatz zu Jang et al. aber keinen Zusammenhang mit dem Überleben nachweisen (Colakoglu et al., 2008). Generell scheinen Mutationen im PTEN-Gen bei kolorektalen Karzinomen mit fortgeschrittenen Tumorstadien und Metastasenbildung assoziiert zu sein (Dicuonzo et al., 2001; Salmena et al., 2008).

1.4 IAPs in epithelialen Geweben und Tumoren

1.4.1 Einführung

Die IAP (inhibitors of apoptosis)-Familie umfasst derzeit acht Proteine –wie in Tabelle 4 näher aufgeführt - deren definierendes Merkmal eine BIR (baculovirus IAP repeat) - Domäne ist. IAP's enthalten 1-3 BIR-Domänen bestehend aus 70-80 Aminosäuren (Altieri, 2010).

Die IAP's unterdrücken die Apoptose durch die Hemmung von Caspasen. Hierbei handelt es sich um Proteasen, die den apoptotischen Zelltod regulieren. Darüber hinaus haben die IAP's andere wesentliche Aufgaben hinsichtlich der Signaltransduktion in der Zelle. Besonders wichtig scheint die Interaktion mit NF-κB (nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer`of activated B-cells) zu sein. Hierbei handelt es sich um einen für Entzündung, Immunität und Überleben der Zelle essentiellen Transkriptionsfaktor. Die IAP's sind also maßgeblich an der Homöostase der Zelle beteiligt. Bei der Untersuchung maligner Tumore wird deshalb auch häufig die Deregulation ihrer Expression oder Funktion beschrieben (Altieri, 2010; LaCasse et al., 2008).

IAP	Hauptfunktion
NAIP	spezialisiert (angeborene Immunität, Neuroprotektion)
cIAP1	Signaltransduktion (TNFR, NF-κB-Aktivierung)
cIAP2	Signaltransduktion (TNFR, NF-κB-Aktivierung)
XIAP	Apoptoseinhibition
Survivin	Mitose (Zytokinese)
BRUCE	Mitose (Zytokinese)
Livin	spezialisiert (Entwicklung, andere?)
ILP2	spezialisiert (Spermatogenese?)

Tabelle 4 **IAP-Familie** (LaCasse et al., 2008)

1.4.2 Survivin

Survivin ist das kleinste Protein der IAP-Familie. Es besteht aus 142 Aminosäuren und hat eine geringe molare Masse von 16,5-kDa. Das kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 17q25. Survivin ist in der Lage, sowohl die Aktivierung als auch die Aktivität bereits mobilisierter Caspasen (Caspase-3 und Caspase-7 (Ponnelle et al.,

2005)) zu inhibieren (Xiaoyuan et al., 2010). Außerdem gehört es zu den CPP's (chromosomal passenger proteins), die als Multiprotein-Komplex (CPP-Komplex) fungieren und eine Rolle bei der Zellteilung spielen (Yang et al., 2004).

Eine Überexpression von Survivin wurde in nahezu jeder darauf untersuchten Tumorentität gefunden. Im adulten Normalgewebe wird es jedoch allenfalls in sehr geringem Ausmaß exprimiert (Vorkommen in fetalem Gewebe, Kolonepithel, Endometrium, Plazenta und Knochenmark) (Qi et al., 2009). Darin unterscheidet sich Survivin von den anderen Proteinen der IAP-Familie, die auch im Normalgewebe nachweisbar sind (Altieri, 2010).

Chen et al. untersuchten mittels Immunhistochemie kolorektales Karzinomgewebe auf Survivin. Lag Survivin-Expression vor, wurden ein niedriger AI (apoptotic index) und ein hoher PI (proliferating cell nuclear antigen labelling index) beschrieben. In den Survivin-negativen Karzinomen lag ein im Vergleich höherer AI vor und ein niedriger PI. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass Survivin durch Apoptose-Inhibition und Akzeleration von Zellproliferation die kolorektale Tumorentstehung vorantreibt (Chen et al., 2004).

Beim kolorektalen Karzinom wird Survivin im Zytoplasma und im Nukleus der Tumorzellen exprimiert. Die Lokalisation ist mitentscheidend für die Prognose. Survivin-Expression im Zellkern wurde assoziiert mit einer besseren, Survivin-Expression im Zytoplasma mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate (Qi et al., 2009). Möglicherweise liegt der Grund hierfür in der Tatsache, dass zytoplasmatisches und nukleäres Survivin voneinander unabhängig im Zellzyklus moduliert werden. Hierbei wird zytoplasmatisches im Gegensatz zu nukleärem Survivin von der Cyklin-abhängigen Kinase $p34^{cdc2}$ (O'Connor et al., 2000a) phosphoryliert und hat daher eine stärkere Affinität zu den Caspasen. Diskutiert wird, ob nukleäres Survivin durch fehlende Phosphorylierung die Apoptose induziert. Außerdem tendieren kolorektale Karzinome mit zytoplasmatischer Expression eher zu Fernmetastasierung als solche mit nukleärer (Qi et al., 2009).

Im Zentrum der Erforschung von Survivin stehen auch die therapeutischen Interventionsmöglichkeiten, die sich aus den Signalwegen dieses Proteins ergeben. Es hat sich gezeigt, dass das Immunsystem von Patienten mit kolorektalem Karzinom in der Lage ist, spezifisch auf Survivin zu reagieren. Involviert sind hierbei CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten, die nach Erkennen antigener Determinanten Survivins eine Immunkaskade auslösen. Diese Erkenntnis spricht für einen möglichen Erfolg bei

Einsatz einer Immuntherapie bei kolorektalen Karzinomen mit Survivin-Expression (Casati et al., 2003). Kameshima et al. identifizierten in diesem Zusammenhang ein HLA-Antigen -Survivin-2B80-88 – welches von CD8+ T-Lymphozyten erkannt wird. Im Rahmen verschiedener Impfprotokolle wurde Survivin-2B80-88 Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom subkutan verabreicht. In einigen Fällen konnte ein Rückgang der Tumormarker und der Tumorgröße (CT-morphologisch) beobachtet werden (Kameshima et al., 2011). Interessant ist auch, dass Survivin proangiogenetisch wirkt. Es stabilisiert Kapillarnetze und sorgt so für einen konstanten Blutfluss im Karzinomgewebe. Aufgrund dessen wurde konstatiert, dass Survivin die Wirksamkeit anti-angiogenetischer Therapie reduziert (Blanc-Brude et al., 2003). Das Spektrum potentieller Therapieansätze umfasst auch molekulare Antagonisten wie Antisense. Die Zuführung des natürlichen Survivin-Antisense, Faktor-Xa-Rezeptor EPR-1 (effector cell protease receptor-1), führte in kolorektalen Tumorzellen sowohl zur Abnahme der Survivin-Expression und Zellproliferation als auch zur Zunahme von Apoptose und Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (Yamamoto et al., 2002). Des Weiteren haben Antagonisten der Phosphorylierung von Survivin erfolgsversprechende Ergebnisse gezeigt. Die genetische, molekulare oder pharmakologische Ausschaltung der $p34^{cdc2}$-Kinase resultierte im Verlust der Survivin-Expression, Apoptose und starker Antitumor-Wirkung (O'Connor et al., 2002). Anhaltspunkt für therapeutische Intervention bietet auch die Interaktion von Survivin mit HSP90, einem molekularem Chaperon. Die Unterbrechung des Survivin-HSP90-Komplexes führt zum Abbau von Survivin, Apoptose und Zellzyklusarrest mit Zellteilungsdefekten (Fortugno et al., 2003).

Erforschung der genauen Signalwege und Einflüsse Survivins auf die Regulation von Apoptose und Mitose haben zu einem besseren Verständnis der Karzinogenese geführt und neue Therapiemöglichkeiten eröffnet (Altieri, 2004).

1.4.3 XIAP

XIAP (X-linked inhibitor-of-apoptosis protein) besteht aus 497 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 57-kDa. Das kodierende Gen befindet sich auf Chromosom Xq25 (Takeuchi et al., 2005). Unter den IAP’s stellt XIAP das molekular am besten charakterisierte Protein dar. Das Protein inhibiert die Caspasen -3, -7 und -9 durch direkte Hemmung und durch Markierung und konsekutiven Abbau durch das Proteasom. Jedoch existieren zunehmend Anhaltspunkte dafür, dass XIAP die Apoptose

unabhängig von der Interaktion mit Caspasen inhibiert und in andere Signalwege involviert ist (Dean et al., 2007). Die Überexpression von XIAP spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Progression von malignen Tumoren und wurde unter anderem beim hepatozellulären Karzinom, dem Prostatakarzinom oder der akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen (Xiang et al., 2009b).

Xiang et al. korrelierten in ihrer Arbeit die XIAP-Expression (Auswertung mittels Immunhistochemie) mit schlechter Tumordifferenzierung, venöser Invasion und den Dukes Stadien C und D. Zudem wurde eine Assoziation zwischen XIAP-Expression und kürzerem rezidivfreien Intervall sowie schlechteren Überlebensraten konstatiert (Xiang et al., 2009b).

Es war bekannt, dass XIAP als Kofaktor in Smad-, JNK- und NF-κB-Signalwegen mitwirkt. Unklar war jedoch, ob die Wirkung nicht nur indirekt durch die Fähigkeit zur Caspasen-Inhibition möglich war, denn Caspasen sind ebenfalls in diesen Signalwegen aktiv. Daher führten Lewis et al. Punktmutationen in das Protein ein, die dazu führten, dass XIAP nun nicht mehr in der Lage war, Caspasen zu inhibieren. Die XIAP-Mutanten waren alle in der Lage, obengenannte Signalwege zu aktivieren. Dies bestätigt die Vermutung einer von der Caspasen-Interaktion unabhängigen Anti-Apoptose Wirkung durch XIAP (Lewis et al., 2004). Interessant ist hierbei unter anderem die Aktivierung von NF-κB, einem Transkriptionsfaktor, der die Apoptose unterdrückt. Er ist in einer Vielzahl von malignen Tumoren aktiviert und steht in Zusammenhang mit der Resistenz von Karzinomzellen gegen die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose (Karin and Lin, 2002). XIAP aktiviert NF-κB durch seine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die sich auf der Ring-Domäne des Proteins befindet. Therapeutika, die diese Ring-Domäne attackieren, könnten demnach Apoptose induzieren (Schimmer et al., 2006). Durch die E3-Ligase ist XIAP des Weiteren in der Lage, endogene Antagonisten auszuschalten, indem es sie für den Abbau im Proteasom markiert (MacFarlane et al., 2002). Besonderes Augenmerk richtet die Forschung momentan auf Antisense-Oligonukleotide und kleinmolekulare Inhibitoren. Es zeigte sich, dass gegen XIAP gerichtete Antisense-Oligonukleotide fähig sind, Apoptose zu induzieren und die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen. Kleinmolekulare Inhibitoren haben in Abhängigkeit von der Domäne des Proteins, an welche sie angreifen, unterschiedliche Wirkungen. So imitieren beispielsweise auf die BIR 3-Domäne zielende Inhibitoren die Wirkung von Smac und verhindern so die Bindung zwischen XIAP und Caspase-9. In diesen Versuchen kam es sowohl zur Apoptoseinduktion als

auch zur Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika. Hierbei ist jedoch noch zu klären, ob die Wirkungen tatsächlich nur durch Interaktion mit XIAP vermittelt werden, oder ob die Inhibitoren noch auf weitere, von XIAP unabhängige, Angriffspunkte abzielen. Bei den gegen die BIR 2-Domäne gerichteten Inhibitoren kam es unter anderem beim kolorektalen Karzinom zur Wachstumsverzögerung im Tumorgewebe (Schimmer et al., 2006).

Ein weiterer Signalweg, der bei der Entwicklung und Progression des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielt, ist der HGF/c-Met/Akt-Signalweg. Man geht davon aus, dass das Protoonkogen c-Met an der Progression des kolorektalen Karzinoms beteiligt ist. Mehrere Studien wiesen die Überexpression dieses Rezeptors für HGF (Hepatocyte Growth Factor) im kolorektalen Karzinomgewebe nach. Bei Bindung von HGF an den c-Met-Rezeptor kommt es über den Akt-Signalweg zur Regulation zellulärer Funktionen. Dazu gehören Proliferation, Motilität, Adhäsion und Invasion. Dies bedingt die Tumorprogression (Takeuchi et al., 2005). Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von XIAP, da XIAP Substrat von Akt ist und durch dieses phosphoryliert wird. Dies reduziert den Abbau von XIAP und die durch Cisplatin induzierte Caspase-3-Aktivität. Akt-Inhibitoren sind in Erforschung und eine Option bei kolorektalen Neoplasien (Takeuchi et al., 2005).

Weitere Ansätze umfassen die mögliche Existenz von gegen XIAP gerichteten Antikörpern. Diese könnten die Grundlage einer Immuntherapie bilden. Das Verständnis über die Funktionsweise von XIAP ist in den letzten zehn Jahren sehr erweitert worden und bereitet so den Weg für die Entwicklung von Therapeutika, die direkt an das Protein angreifen und es in seiner Wirkweise hemmen. Der optimale Einsatz der neu entwickelten Therapien ist jedoch noch genau zu erforschen (Dean et al., 2007).

1.5 Smac/DIABLO in epithelialen Geweben und Tumoren

Die Mitochondrien sind unerlässlich für den Zellstoffwechsel. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei der Festlegung des „*point-of-no-return*“ im apoptotischen Prozess. Als Reaktion auf eine Vielzahl apoptotischer Stimuli sezernieren die Mitochondrien sogenannte Todesproteine ins Zytosol. Zu diesen gehören unter anderem Cytochrom C, HtrA2/Omi und auch Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectric point). Im Zytosol triggern diese Proteine dann sowohl die Caspasen-abhängige als auch die Caspasen-unabhängige Apoptose (Endo et al., 2009). Das 25-kDa Protein Smac/DIABLO fördert

die Apoptose durch seine Fähigkeit, die IAP-vermittelte Hemmung der Caspasen zu antagonisieren. Es existieren mehrere Isoformen von Smac, wie unter anderem Smacβ und Smac3. Studien, die diese Proteine untersuchten, deuten darauf hin, dass der proapoptotische Effekt von Smac von zusätzlichen, IAP-unabhängigen Mechanismen vermittelt werden könnte (LaCasse et al., 2008). Obschon sich Smac und seine Isoformen eventuell darin unterscheiden, wie sie die Apoptose potenzieren, ist die Interaktion aller Smac-Proteine mit den IAP's eine wirkungsvolle Maßnahme, um den Ablauf der Apoptose zu gewährleisten. Außer NAIP kann Smac/DIABLO alle IAP's binden, deren Interaktion mit den Caspasen unterbrechen, die Aktivität ihrer Ubiquitin-Ligase beeinträchtigen und so effektiv den Untergang der Caspasen durch IAP-vermittelte Ubiquitinierung verhindern (LaCasse et al., 2008).

Die Expression von Smac konnte in einer Vielzahl von malignen Tumoren nachgewiesen werden. Überexpression führte zum Beispiel beim Magenkarzinom, Osteosarkom und hepatozellulärem Karzinom zu erhöhter Chemosensitivität. Dahingegen führte niedrige Expression beim Schilddrüsenkarzinom zu früher Resistenz gegen Chemotherapeutika und war beim Nierenkarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Endo et al., 2009).

Endo et al. untersuchten die Smac-Expression beim kolorektalen Karzinom mittels immunhistochemischer Methoden. Das Kollektiv mit fehlender Smac-Expression war signifikant mit mehr Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einer geringeren Rate von Dukes Stadien A und B assoziiert. Des Weiteren korrelierte eine fehlende Smac-Expression mit der Aggressivität des Karzinoms. Die 1-, 3- und 5-Jahresüberlebensraten waren für die Smac-positive Gruppe deutlich besser als für die Gruppe ohne Smac-Expression (Endo et al., 2009).

Huerta et al. stellten Zelllinien aus unterschiedlichen Stadien des kolorektalen Karzinoms eines Patienten her. Die erste Zelllinie wurde aus einem Dukes Stadium B entnommen, die zweite zu einem späteren Zeitpunkt aus einer Lymphknotenmetastase. Ziel war es, herauszufinden, inwieweit sich die Zelllinien bezüglich ihrer Sensitivität für Radio-Chemotherapie unterschieden und ob diese Unterschiede durch die während des Progresses zur metastasierten Form stattgefundenen genetischen Modifikationen begründet waren. Die Zelllinie aus dem Dukes Stadium B war sensitiver für die Radio-Chemotherapie und zeigte eine höhere Smac-Expression als die Zelllinie aus der Lymphknotenmetastase. Dies könnte die Resistenz gegen therapeutisch induzierte Apoptose bei metastasierten kolorektalen Neoplasien erklären (Huerta et al., 2007).

Die Ergebnisse einiger Studien weisen darauf hin, dass die Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika einen präventiven Effekt bezüglich der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms hat (Gupta et al., 2002; Keller and Giardiello, 2003). Bank et al. fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass der Einsatz von Smac-Mimetika die Anti-Tumor-Wirkung der nichtsteroidalen Antirheumatika potenzierte (Bank et al., 2008). In der Arbeit von Schimmer et al. konnte gezeigt werden, dass maligne Zellen nach Internalisierung von Smac-Peptiden sensitiver auf Chemotherapeutika reagierten. In Kombination mit Cisplatin und TRAIL (tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis inducing ligand) wurde beim Lungenkarzinom sogar eine Wachstumsverzögerung erreicht. Somit sind Moleküle, die die Eigenschaften von Smac/DIABLO als einem endogenen Gegenspieler von XIAP imitieren, eine vielversprechende Therapieoption (Schimmer et al., 2006).

1.6 Angiogenese Faktoren in epithelialen Geweben und Tumoren

1.6.1 Einführung

Die Angiogenese im menschlichen Körper wird durch eine Balance von pro- und antiangiogenetischen Faktoren streng reguliert und ruht im adulten Gewebe normalerweise. Die einzige Ausnahme stellen Ovar und Endometrium während des Menstruationszyklus und die Wundheilung dar. Für die Kanzerogenese spielt die Angiogenese jedoch eine wichtige Rolle, denn Tumorwachstum und Metastasierung sind angiogeneseabhängig. Es kommt zum Überwiegen proangiogenetischer Stimuli und zur Störung der unter physiologischen Bedingungen erhaltenen Balance. Die Störung dieses Gleichgewichts („angiogenic switch“) geht vielfach einher mit vermehrter Expression angiogenetischer Proteine wie VEGF. Studien deuten darauf hin, dass der angiogenic switch früh während der Tumorentwicklung stattfindet, bedingt durch genetische Alterationen oder eventuell auch als Reaktion auf lokalen Stress wie Hypoxie und niedrigen pH. Die Hypoxie bedingt einen Anstieg der Transkriptionsfaktoren Hif-1 und Hif-2 in den Tumorzellen, welche wiederum die Transkription von Genen für VEGF und eine Vielzahl anderer proangiogenetische Faktoren vorantreiben (Daly et al., 2003; Hayashi et al., 2014).

1.6.2 VEGF

Bei VEGF (vascular endothelial growth factor), auch VEGF-A genannt, handelt es sich um ein Glykoprotein mit einer molaren Masse von 45 k-Da, welches zur VEGF platelet-

derived-growth-factor (PDGF) Familie strukturell verwandter Mitogene gehört. Hierzu zählt man weitere Proteine wie VEGF-B, -C und -D, die unterschiedlich homolog zu VEGF sind (Carmeliet, 2005).

Die Aufgabe von VEGF ist die Vermittlung der Angiogenese während der fetalen Entwicklung und es ist von Bedeutung bei der Wundheilung im adulten Gewebe. VEGF trägt auch zur Entwicklung von malignen Tumoren bei und wurde in einer Vielzahl von Neoplasien nachgewiesen. Es fördert das Tumorwachstum, indem es die Bildung neuer Blutgefäße aus nahegelegenen Kapillaren stimuliert und so dem Tumorgewebe den für das weitere Wachstum wichtigen Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen ermöglicht. Des Weiteren schützt VEGF durch Induktion von anti-apoptotischen Faktoren wie beispielsweise Survivin die Neovaskularisation im Tumorgewebe vor Apoptose. Außerdem initiiert VEGF die Ausschüttung und Aktivierung von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix abbauen, und begünstigt so die ungehinderte Entwicklung weiterer Blutgefäße im Tumorgewebe (Carmeliet, 2005; Ferrara et al., 2003). Die Erforschung von VEGF und seinem Einfluss auf die Entwicklung von intestinalen Neoplasien hat ergeben, dass VEGF den vorherrschenden angiogenetischen Faktor beim kolorektalen Karzinom darstellt und in bis zu 50% der Fälle dieser Tumorentität nachweisbar ist, wohingegen die Expression in gesunder Darmschleimhaut und Adenomen gering ist (Bendardaf et al., 2008). Übermäßige VEGF-Expression im kolorektalen Karzinom ist assoziiert mit gesteigerter vaskulärer Dichte, Metastasierung und Neigung zu Rezidiven. Anti-VEGF-gerichtete Therapien wie beispielsweise der monoklonale Antikörper Bevacizumab zählen zu den bedeutsamsten Fortschritten in der Krebstherapie (Oliveira et al., 2010).

1.6.3 Hif-1

Hif-1 (hypoxia-inducible factor-1) ist das Schlüsselprotein, welches die Sauerstoffhomöostase in der Zelle reguliert. Es handelt sich um ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Untereinheit. Hif-1β ist dauerhaft im Kern nachweisbar und wird nicht durch den pO2 beeinflusst, wohingegen Hif-1α pO2-labil ist. Bei hohem pO2 wird Hif-1α proteasomal abgebaut, bei Hypoxie wird es stabilisiert, reichert sich in der Zelle an und wird in den Kern transloziert. Aktuell lassen sich zwei Gruppen eindeutig identifizierter Zielgene von Hif-1 unterscheiden. Zum einen Gene, die ATP bereitstellen, zum anderen Gene, die die Gewebeoxygenierung durch Steigerung von Angiogenese und Erythropoiese verbessern (Fandrey and Joachim, 2007). Hif-1 ermöglicht der Zelle

also eine Anpassungsreaktion auf die ihr Überleben bedrohende Hypoxie. Dies spielt auch bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle. In der Mikroumgebung von Tumoren kommt es aufgrund von strukturellen und funktionalen Anomalien der Gefäße und erhöhtem Sauerstoffverbrauch bei hoher Zellproliferationsrate häufig zu Hypoxie. Der Sauerstoffmangel im Tumorzentrum führt zu Apoptose und Nekrose und ohne Angiogenese kann ein Tumor nicht weiter wachsen. Die Hypoxie im Tumorgewebe ist nun das Signal für die Aktivierung proangiogenetischer Faktoren, welche alle von Hif-1 kontrolliert werden. Besondere Bedeutung kommt hier VEGF zu. Hif-1α aktiviert die Expression des VEGF-Gens, indem es an Hypoxie-responsive Elemente (HRE) in der Promotorregion von VEGF bindet (Cao et al., 2009).

Aufgrund dieses Einflusses auf die VEGF-Expression stellt Hif-1 den Schlüssel-Initiator der Angiogenese-Aktivität in Tumoren dar (Jiang et al., 2004).

Die Bedeutung von VEGF für das kolorektale Karzinom wurde bereits erläutert. Da VEGF wesentlich von Hif-1 bestimmt wird, ist die Expression von Hif-1 und seine Wechselwirkung mit VEGF im kolorektalen Karzinom ebenfalls von Bedeutung. Eine Studie untersuchte Zelllinien des kolorektalen Karzinoms auf Hif-1α- und VEGF-Expression und fand heraus, dass der Grad der Hif-1α-Expression signifikant mit der Expression von VEGF und der Tumorangiogenese korreliert. Außerdem gaben die Ergebnisse Anlass zu der Annahme, dass Hif-1α Einfluss auf Tumorinvasion und Metastasierung hat, denn es fand sich sowohl eine höhere Hif-1α-Expression in den Dukes Stadien C und D als in Stadien A und B, als auch in Lymphknoten- und Fernmetastasen (Jiang et al., 2004).

Hif-1α interagiert auch mit Survivin, indem es an ein HRE in der Promotorregion dieses Apoptoseinhibitors bindet und die Genexpression hochreguliert, resultierend in der Resistenz der Tumorzellen gegen Apoptose. Die Herabregulierung von Hif-1α mittels siRNA (small interfering RNA) führte in der Zelllinie eines kolorektalen Karzinoms zur Reduktion der Survivin-Expression. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass Hif-1α einen Haupttranskriptionsfaktor für die Survivin Genexpression darstellt (Fan et al., 2008).

Hif-1α stellt also aufgrund seiner Wirkung auf Wachstum, Vaskularisation und Metastasenbildung in soliden Tumoren ein vielversprechendes Ziel bei der Erforschung therapeutischer Strategien dar. Die Untersuchung des neuen Benzimidazol-Analogons AC1-004 erbrachte interessante Ergebnisse im Hinblick auf eine Zelllinie eines kolorektalen Karzinoms. Es kam nach Applikation von AC1-004 sowohl zur Inhibition

der Hypoxie-getriggerten Hif-1α-Akkumulation im Tumorgewebe als auch zur Abnahme der Genexpression von VEGF und EPO. Außerdem führte es zum Abbau von Hif-1α im Proteasom (Won et al., 2009).

Es gibt eine Vielzahl von bereits bekannten Therapeutika, die ihre antiangiogenetische Wirksamkeit überwiegend über den Eingriff in die Signalwege von Hif-1 vermitteln. Hierzu gehört unter anderem der für die Therapie des Mamma-Karzinoms essentielle Her-2/neu-Inhibitor Trastuzumab (Herceptin®) (Laughner et al., 2001). Es sind jedoch auch neue Krebsmedikamente in Erforschung wie zum Beispiel Inhibitoren des Hitzeschockproteins 90 (HSP90). HSP90 bindet an Hif-1α und führt so zur Stabilisierung des Proteins. Inhibitoren wie Geldanamycin hemmen die Bindung von HSP90 an Hif-1α und führen so zum proteasomalen Abbau von Hif-1α. Auch Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) führten in Versuchen zum Abbau von Hif-1α und hemmten dessen Transaktivierungsdomäne. Die transkriptionelle Aktivität von Hif-1α konnte außerdem durch den Proteasominhibitor Bortezomib gehemmt werden. Die Wirkung dieser Inhibitoren auf das kolorektale Karzinom ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht und die tatsächliche Nutzbarkeit für die Behandlung bleibt zu belegen (Semenza, 2010).

1.7 Fragestellung der Arbeit

EGFR, K-ras, PTEN, Survivin, XIAP, Smac/DIABLO, VEGF und Hif-1α vermitteln Signalkaskaden, die bedeutend für die Entstehung und die Ausbreitung von malignen Tumoren im menschlichen Organismus sind.

Dies trifft auch für das kolorektale Karzinom zu. Es wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die sich mit der Rolle der Expression dieser Proteine in der Biologie des kolorektalen Karzinoms beschäftigen. Im Mittelpunkt dieser Studien steht meist die Bedeutung der Expression für die Entstehung, Progression und Prognose des kolorektalen Karzinoms, ebenso wie die Entwicklung therapeutischer Strategien, die in diese Signalkaskaden eingreifen. Nur wenige Studien beschäftigen sich allerdings mit der Expression obengenannter Proteine in Lymphknotenmetastasen korrespondierender Primärtumoren und dabei wurden in der Regel nur einzelne Proteine analysiert. Eine systematische, vergleichende Analyse der Expression aller genannten Proteine in korrespondierenden Lymphknoten von Primärtumoren aus einem Patientenkollektiv wurde nicht angefertigt.

Für diese Arbeit wurden 48 Fälle von kolorektalen Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen ausgewählt. Die Daten der korrespondierenden Primärtumoren liegen vor (Luczak, 2010; Reinwald, 2010). Durch den Vergleich von Lymphknotenmetastase und Primärtumor soll untersucht werden, ob beide in ihrer Markerexpression konkordant sind und somit eine gleichwertige prognostische Aussagekraft aufweisen.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Das Kollektiv besteht aus 48 an kolorektalem Adenokarzinom erkrankten Patienten mit Lymphknotenmetastasen. Die Gewebeproben der Lymphknoten dieses Kollektivs aus den Jahren 1990 bis 1995 wurden dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Düsseldorf entnommen, (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Helmut Erich Gabbert). Aus den routinemäßig formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Lymphknoten wurden Tissue microarrays hergestellt, wobei jeweils 2 Proben aus einem befallenen Lymphknoten gewonnen wurden.

2.2. Tissue microarrays

Tissue microarrays sind gut geeignet für die Untersuchung von Markern mittels verschiedener Methoden wie beispielsweise der Immunhistochemie.
Es handelt sich hierbei um Paraffinblöcke, die mehrere unterschiedliche Gewebeproben enthalten. Für die Herstellung werden mit einer Stanze Gewebezylinder aus zahlreichen, in Paraffin archivierten Gewebeproben (Spenderblöcken) entnommen und in einem Empfängerblock zusammengesetzt. Danach werden aus den Empfängerblöcken Dünnschnitte angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Auf jedem Schnitt kann nun parallel eine Vielzahl von Gewebeproben ausgewertet werden. Studien mit Tissue microarrays ermöglichen einen einheitlichen Auswertungsprozess mit hohem Standard und Kosteneffizienz (Dancau et al., 2010; Dhir, 2008)

2.2.1 Herstellung der Tissue microarrays

Im ersten Schritt wurden im Archiv der Pathologie Paraffinblöcke (Spenderblöcke) selektiert, in denen Lymphknoten von Patienten mit kolorektalem Karzinom eingebettet waren. Von diesen wurden Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Nach lichtmikroskopischer Sichtung dieser Schnitte wurden die metastatisch veränderten Lymphknotenareale auf dem Objektträger markiert. Es folgte das Auflegen des markierten Objektträgers auf den zugehörigen Paraffinblock, um beim Stanzen eine möglichst hohe Treffsicherheit für das lichtmikroskopisch ausgewählte Areal zu erreichen. Das entsprechende Areal wurde mit einer Stanze des Durchmessers 1 mm und einer Eindringtiefe von 3 mm gestanzt und die gewonnenen Gewebeproben in die im Empfängerblock vorhandenen Stanzlöcher eingebracht. Verwendet wurde hierfür ein Tissuearrayer der Marke Beecher Instruments. Pro Patient wurden zwei Gewebeproben gestanzt, in einem Array befanden sich die Gewebeproben von 15 Patienten. Um die Orientierung im Empfängerblock zu gewährleisten, befand sich unten rechts eine externe Kontrolle mit plazentarem Gewebe.

Abschließend wurden die fertig gestellten Paraffinblöcke für fünf Minuten bei 60° C erhitzt, geglättet, geschnitten und immunhistochemisch gefärbt.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Verwendete Antikörper

In Tabelle 5 erfolgt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Darstellung von EGFR, K-ras, PTEN, Survivin, XIAP, Smac/DIABLO, VEGF und Hif-1α.

Proteine	Antikörper	Produzent
EGFR	EGFR pharmDX™Kit	DakoCytomation, Hamburg
K-ras	Polyklonaler Antikörper Ras AB-1	LabVision, Fremont, CA, USA
PTEN	Monoklonaler Antikörper 28H6	Biozol, Eching
Survivin	Epitope Specific Rabbit Antibody	Thermo Scientific, Fremont
XIAP	Monoklonaler Antikörper hILP (human IAP-like Protein)	BD Biosciences, Heidelberg
Smac/DIABLO	Polyklonaler Antikörper Kaninchen Anti-Smac/DIABLO	Merck, Darmstadt
VEGF	Polyklonaler Antikörper Kaninchen Anti-VEGF	Zymed Laboratories Inc., USA
Hif-1α	Monoklonaler Antikörper Maus Anti-Hif-1α	Chemicon International, Hofheim

Tabelle 5 **Verwendete Antikörper zur Darstellung von EGFR, K-ras, PTEN, Survivin, XIAP, Smac/DIABLO, VEGF und Hif-1α,** EGFR = endothelial growth factor receptor, PTEN = phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, XIAP = x-linked inhibitor-of-apoptosis protein, Smac/DIABLO = second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectrc point, VEGF = vascular endothelial growth factor, Hif-1α = hypoxia inducible factor 1α

EnVision™ + System-HRP, Rabbit bzw. Mouse der Firma Dakocytomation sind in Tris-HCL-Puffer gelöste, mit Peroxidase markierte Polymerkonjugate. Diese dienten als Sekundärantikörper. Als Substratlösung wurde Diaminobenzidin (DAB) für EGFR verwendet, für die übrigen Antikörper 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC).

2.3.2 Immunhistochemische Methode

Die hier verwendete Polymerkonjugatmethode nutzt sowohl ein enzym- als auch ein antikörpermarkiertes Polymerkonjugat. Dessen Rückgrat besteht aus einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid). An dieses können durchschnittlich 70 Enzymmoleküle und 10 Antikörper binden. Bei dem für den Nachweis genutzten EnVision™-System ist der Sekundärantikörper an das Dextran-Trägermolekül gebunden.

Zuerst wird der Primärantikörper gebunden und dann das EnVision™-Polymer. Im Vergleich zu anderen Methoden sind bei dieser nicht nur weniger Inkubationsschritte notwendig, sondern sie zeichnet sich außerdem durch eine hohe Sensitivität und geringe Neigung zu unspezifischen Hintergrundfärbungen aus.

2.3.3 Färbeprotokolle

2.3.3.1 EGFR-Färbeprotokoll

1. Entparaffinierung

Vor der immunhistochemischen Färbung steht die Entparaffinierung und anschließende Rehydrierung der Gewebeschnitte. Zunächst werden die 2-4 µm dicken Paraffinschnitte über Nacht bei 37° C getrocknet und danach 15 Minuten in Xylol getaucht. Um die Ausschwemmung des Paraffins und die Rehydrierung des Gewebes zu erreichen werden die Objektträger für jeweils eine Minute in eine absteigende Alkoholreihe mit 2x100%, 2x95% und 1x70% getaucht. Die anschließende Spülung mit Leitungswasser bedingt die Auschwemmung des Paraffins und die Rehydrierung. Die vollständige Entparaffinierung ist wichtig, da Überreste des Paraffins zu unspezifischer Färbung führen können.

2. Färbung

Nun folgt die proteolytische Andauung der Gewebeprobe mittels Proteinkinase K. Dafür werden die Proben vollständing mit Proteinase-K-Lösung bedeckt (mindestens 3 Tropfen (100µL)) und 5 (± 0,5) Minuten inkubiert. Dann erfolgt die Spülung des Gewebes mit Wasser und das Eintauchen in ein frisches Wasserbad mit Reagenzqualität für 5 (± 1) Minuten. Um die Gefahr der Zerstörung der Zellmembran durch proteolytische Andauung zu vermeiden, sollten die genauen Zeitvorgaben möglichst eingehalten werden.

Um unerwünschte Hintergrundfärbungen durch die endogene Peroxidase zu reduzieren, werden die Proben mit einem Peroxidase-Block (3% Hydrogen Peroxid) bedeckt (mindestens 3 Tropfen (100 µL)) und 5(± 1) Minuten inkubiert. Danach folgt eine Spülung mit Wasser und das Eintauchen in ein Bad aus 0,03% Triton aqua dest..
Die Gewebeprobe wird dann mit dem primären Antikörper (mindestens 3 Tropfen (100µL)) und einem negativen Kontrollreagenz 30 (± 1) Minuten, um Austrocknung zu vermeiden, in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert und danach erneut gespült. Es folgt die Hinzugabe des markierten Polymers (mindestens 3 Tropfen (100µL)) und die erneute Spülung nach 30 (± 1) minütiger Inkubation. Danach wird DAB+Substrat-Chromogenlösung (mindestens 3 Tropfen (100µL)) auf den Objektträger gegeben und für 10 (± 1) Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben für 2-5 Minuten in ein frisches Wasserbad von Reagenzqualität getaucht.

3. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Die Objektträger werden für 6 Minuten in Meyer's Hämatoxylin gestellt und danach mit Leitungswasser gespült. Hierbei ist es sehr wichtig, dass alle Hämatoxylinreste vollständig entfernt werden. Die Präparate werden nach einem 2-5 minütigem Wasserbad in einer aufsteigenden Alkoholreihe und mit Xylol behandelt. Es folgt die Benetzung mit angewärmter Glycerin-Gelatine und die blasenfreie Abdeckung der gefärbten Gewebsschnitte mit Deckgläschen.

4. Negativkontrolle

Um durch unspezifisches Binden der Antikörper hervorgerufene Färbeartefakte zu vermeiden, wird bei jedem Färbedurchlauf eine negative Kontrollgewebeprobe angefertigt. Hierbei wird diese wie die ursprünglichen Gewebeproben gefärbt, jedoch wird auf die Applikation des Primärantikörpers verzichtet. Eine signallose Negativkontrolle bestätigt die Spezifität der Färbung.

2.3.3.2 EnVision™+HRP (DAKO) Färbeprotokoll für K-ras, PTEN, Survivin, XIAP, Smac/DIABLO, VEGF und Hif-1α

1. Entparaffinierung

Zur vollständigen Entfernung des Paraffins werden die Gewebeschnitte für 2x5 Minuten in Xylol und danach für 2x5 Minuten in 100% Aceton gestellt. Hiernach werden sie für 2x5 Minuten mit Leitungswasser gespült.

2. Vorbehandlung des Antikörpers

Die Gewebeschnitte werden in einen Citratpuffer gestellt (pH6) und für 3x5 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt. Es ist hierbei wichtig zu beachten, dass die Schnitte die ganze Zeit von Puffer bedeckt sind. Ist der Puffer verkocht, wird frischer Puffer nachgefüllt. Die Objektträger müssen nach der Behandlung in der Mikrowelle 10 Minuten abkühlen, werden dann mit Leitungswasser abgespült und abschließend für weitere 5 Minuten darin platziert.

3. Peroxidaseblock

Nach Inkubation der Gewebeschnitte für 20 Minuten in 0,3%igem H2O2-Methanol-Bad (1ml H2O2 in 100ml Methanol bei zwei Küvetten) und anschließender Spülung mit Leitungswasser werden sie für 2x5 Minuten in TBS-Puffer (pH 7,4) belassen.

4. Inkubation mit dem Primärantikörper

Der Antikörper wird mit einem Antikörperverdünnungspuffer (Zymed, San Francisco, USA) verdünnt:

K-ras mit 1:200, PTEN mit 1:50, Survivin mit 1:100**,** XIAP mit 1:250, Smac/DIABLO mit 5µg/ml, VEGF mit 1:100 und Hif-1α mit 1:500. Die mit der Verdünnung beschichteten Gewebeproben werden über Nacht bei 4° C inkubiert.

5. Inkubation mit der EnVision™-Polymerlösung

Nach einer Einwirkzeit von 2x5 Minuten in einem TBS-Puffer (pH 7,4) werden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit der EnVision™+HRP-Polymerlösung inkubiert, (goat anti-mouse bei monoklonalem AK, goat anti-rabbit bei polyklonalem AK). Hiernach werden sie erneut für 2x5 Minuten in TBS-Puffer gestellt.

6. Inkubation mit der Substratlösung

Es folgt die Inkubation der Schnitte mit AEC-Substratlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Bei AEC besteht die Möglichkeit, die Inkubation bis zu 30 Minuten zu verlängern, danach wird mit Leitungswasser gespült.

7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer

Die Schnitte werden für 5 Minuten in Meyer's Hämatoxylin gestellt, danach mit Leitungswasser gespült und bläuen dann für 5 Minuten in warmem Leitungswasser. Abschließend werden sie für 15 Minuten in Aqua bidest. gegeben und schließlich mit Glycerin-Gelatine benetzt und blasenfrei eingedeckt.

2.4 Mikroskopische Auswertung und statistische Analyse

Die Präparate wurden bei 400-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch gesichtet und ausgewertet. Eingeteilt wurden die Lymphknotenmetastasen entsprechend der geschätzten Prozentzahl der immunreaktiven Tumorfläche nach folgendem Score-System:

Score 0: 0%
Score 1: ≤ 10%
Score 2: ≥ 10 – 49%
Score 3: ≥ 50 – 89%
Score 4: ≥ 90%

Die Färbeintensität wurde folgendermaßen eingeteilt:

Stärke 0: Kein Marker im Lymphknoten nachweisbar
Stärke 1: Schwache Anfärbung
Stärke 2: Mäßige Anfärbung
Stärke 3: Starke Anfärbung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS® 19.0 für Windows durchgeführt. Das Patientenkollektiv und die Verteilung der Scores und Färbeeigenschaften der Marker in den Lymphknoten wurden mittels deskriptiver Verfahren beschrieben. Errechnet wurden absolute und relative Häufigkeiten. Für die Korrelation von Primärtumor und Lymphknoten wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient verwendet, ebenso wie zur Beurteilung der Konstellation der acht Proteine in den Lymphknotenmetastasen und der Korrelation von Überleben (in Monaten) in Zusammenhang mit der Markerexpression in den Lymphknoten. Als Signifikanzniveau wurde das allgemein übliche α=5% gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung von 48 Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom aus den Jahren 1990-1995. Das Kollektiv setzt sich zusammen aus 13 männlichen und 35 weiblichen Patienten. Das Alter der jüngsten Patientin betrug 28, das der ältesten 87 Jahre. Das mediane Alter lag bei 67,9 Jahren. Die erhobenen Daten aus den Lymphknotenmetastasen wurden verglichen mit den Daten aus den korrespondierenden Primärtumoren, die für zwei vorhergehende Dissertationen erhoben worden waren.

3.2 Beschreibung des Gesamtkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter

Es folgt die Beschreibung des Patientenkollektivs hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter (Tabelle 6).

Variable	Häufigkeit	Prozent
Lokalisation		
Caecum/Ascendens	16	33,3
Transversum	3	6,3
Sigma/Descendens	17	35,4
Rectum	12	25
pT		
1	1	2,1
2	2	4,2
3	36	75
4	9	18,75
pN		
0	0	0
1	26	54,2
2	22	45,8
pM1	2	4,2
UICC		
1	0	0
2	0	0
3	46	95,8
4	2	4,2
Grading		
1	1	2,1
2	25	52,1
3	20	41,7
4	2	4,2
LVI		
negativ	31	64,6
positiv	17	35,4
BVI		
negativ	42	87,5
Intramural/extramural	6	12,5
Total	48	100

Tabelle 6 **Patientenkollektiv mit klinisch-pathologischen Parametern,** LVI = Lymph vessel invasion, BVI = Blood vessel invasion

3.3 Statistische Analyse der Protein-Immunhistochemie

3.3.1 Häufigkeitsverteilung der Reaktivität und der Färbeintensität

Zur Beurteilung der Reaktivität der Lymphknotenmetastasen wurden vier Prozentstufen festgelegt. Die Intensität der Anfärbung wurde ebenfalls mit 4 Stufen beurteilt (siehe auch 2.4)

Sechs der untersuchten Proteine waren in der Mehrzahl der Lymphknotenmetastasen nachweisbar. K-ras, PTEN und Smac/DIABLO konnten in allen 48 Fällen nachgewiesen werden. Survivin fand sich in 98% und XIAP in 87,5% aller Fälle. VEGF wurde in 95,8% aller Fälle nachgewiesen. EGFR und Hif-1α hingegen zeigten die geringsten Anteile. EGFR fand sich in 66,7%, Hif-1α nur in 29,1% aller Fälle (Tabelle 7). Bezüglich der Färbeintensität zeigten EGFR, XIAP, VEGF und Hif-1α eher ein schwaches Färbemuster. PTEN, Survivin und Smac/DIABLO waren in der Mehrzahl der Fälle mäßig intensiv angefärbt. K-ras imponierte in über 50% der Fälle mit einer starken Färbeintensität (Tabelle 8).

Score	**1**	**2**	**3**	**4**
Prozentrang	**< 10 %**	**> 10-49 %**	**> 50-89 %**	**> 90 %**
EGFR (%)	26 (54,2)	9 (18,8)	12 (25)	1 (2,1)
K-ras (%)	0	3 (6,3)	32 (66,7)	13 (27,1)
PTEN (%)	0	2 (4,2)	32 (66,7)	14 (29,2)
Survivin (%)	2 (4,2)	9 (18,8)	30 (62,5)	7 (14,6)
XIAP (%)	10 (20,8)	20 (41,7)	17 (35,4)	1 (2,1)
Smac/DIABLO (%)	1 (2,1)	2 (4,2)	24 (50)	21 (43,8)
VEGF (%)	8 (16,7)	14 (29,2)	26 (54,2)	0
Hif-1 α (%)	43 (89,6)	3 (6,3)	1 (2,1)	1 (2,1)

Tabelle 7 **Häufigkeitsverteilung der Reaktivität,** EGFR = endothelial growth factor receptor, PTEN = phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, XIAP = x-linked inhibitor-of-apoptosis protein, Smac/DIABLO = second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectrc point, VEGF = vascular endothelial growth factor, Hif-1α = hypoxia inducible factor 1α

Stärke	0	1	2	3
Färbeintensität	**keine**	**schwach**	**mittel**	**stark**
EGFR (%)	16 (33,3)	32 (66,7)	0	0
K-ras (%)	0	1 (2,1)	21 (43,8)	26 (54,2)
PTEN (%)	0	6 (12,5)	32 (66,7)	10 (20,8)
Survivin (%)	1 (2,1)	13 (27,1)	28 (58,3)	6 (12,5)
XIAP (%)	6 (12,5)	28 (58,3)	13 (27,1)	1 (2,1)
Smac/DIABLO (%)	0	8 (16,7)	35 (73)	5 (10,4)
VEGF (%)	2 (4,2)	40 (83,3)	6 (12,5)	0
Hif-1 (%)	34 (70,8)	8 (16,7)	5 (10,4)	1 (2,1)

Tabelle 8 **Häufigkeitsverteilung der Färbeintensität,** EGFR = endothelial growth factor receptor, PTEN = phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, XIAP = x-linked inhibitor-of-apoptosis protein, Smac/DIABLO = second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectrc point, VEGF = vascular endothelial growth factor, Hif-1α = hypoxia inducible factor 1α

3.3.2 Korrelation von EGFR-, K-Ras-, PTEN-, VEGF- und Hif-1α-Expression in Lymphknoten und Primärtumor und immunhistochemische Expressionsmuster

Nur für EGFR, K-ras, PTEN, VEGF und Hif-1α lagen Daten aus den korrespondierenden Primärtumoren vor. Die ermittelten Werte für Score und Stärke aus dem Lymphknoten wurden korreliert mit den entsprechenden Daten aus dem Tumorzentrum und der Invasionsfront des korrespondierenden Primärtumors.

3.3.2.1. EGFR

Für EGFR fand sich ein Zusammenhang zwischen dem Score im Primärtumor und im Lymphknoten. Die Scores an Invasionsfront und Lymphknoten korrelierten hierbei stärker miteinander als die in Tumorzentrum und Lymphknoten. Lag im Primärtumor also eine prozentual hohe immunreaktive Tumorfläche vor, war dies auch in der Lymphknotenmetastase der Fall und umgekehrt. Die Intensität der Anfärbung korrelierte zwischen Tumorzentrum und Lymphknoten (Tabelle 9). In den ausgewerteten Lymphknotenmetastasen zeigte EGRF eine überwiegend als schwach gewertete Färbeintensität mit teils mäßig angefärbten Anteilen (Abb. 1).

EGFR													
TZ		Score LK					IF		Score LK				
Score	n	1	2	3	4	n	Score	n	1	2	3	4	n
1	23	15	2	6	0	23	1	29	20	4	5	0	29
2	14	8	4	2	0	14	2	9	3	2	4	0	9
3	7	3	2	2	0	7	3	5	3	2	0	0	5
4	4	0	1	2	1	4	4	5	0	1	3	1	5
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,271 p-value: 0,031							r_s: 0,397 p-value: 0,003						
EGFR													
TZ		Stärke LK					IF		Stärke LK				
Stärke	n	0	1	2	3	n	Stärke	n	0	1	2	3	n
0	8	6	2	0	0	8	0	8	3	5	0	0	8
1	27	7	20	0	0	27	1	29	10	19	0	0	29
2	10	3	7	0	0	10	2	8	3	5	0	0	8
3	3	0	3	0	0	3	3	3	0	3	0	0	3
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,318 p-value: 0,014							r_s: 0,087 p-value: 0,278						

Tabelle 9 **Korrelation Primärtumor/Lymphknoten für EGFR Score und Stärke,** TZ=Tumorzentrum, IF= Invasionsfront, LK=Lymphknoten, r_s= Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient, EGFR=endothelial growth factor receptor

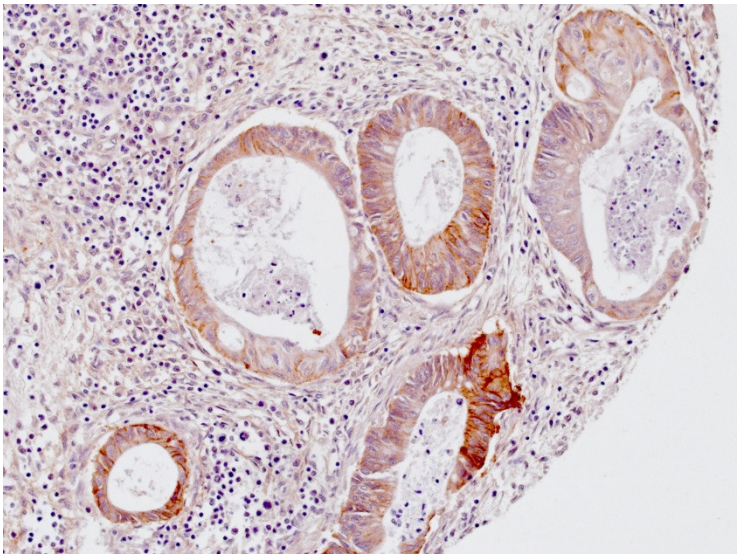

Abb. 1 **Immunhistochemisches Expressionsmuster von EGFR,** EGFR=epidermal growth factor receptor, 200-fache Vergrößerung, Score 2 (>10-49%), Stärke 1-2 (Färbeintensität schwach bis mäßig)

3.3.2.2. K-ras

Wurde bei K-ras ein hoher Anteil immunreaktiver Tumorfläche im Primärtumor beobachtet, so traf dies auch für die Lymphknotenmetastase zu und umgekehrt. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expression in Tumorzentrum und Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Intensität der Anfärbung korrelierte hingegen negativ zwischen Invasionsfront und Lymphknoten (Tabelle 10). In den ausgewerteten Lymphknotenmetastasen zeigte K-ras eine mäßige bis starke Färbeintensität (Abb. 2).

K-ras													
TZ		Score LK					IF		Score LK				
Score	n	1	2	3	4	n	Score	n	1	2	3	4	n
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
3	4	0	1	3	0	4	3	1	0	0	1	0	1
4	44	0	2	29	13	44	4	47	0	3	31	13	47
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,247 p-value: 0,045							r_s: 0,064 p-value: 0,334						
K-ras													
TZ		Stärke LK					IF		Stärke LK				
Stärke	n	0	1	2	3	n	Stärke	n	0	1	2	3	n
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	0	1	1	4	6	1	6	0	0	1	5	6
2	22	0	0	11	11	22	2	26	0	0	11	15	26
3	20	0	0	9	11	20	3	16	0	1	9	6	16
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,009 p-value: 0,476							r_s: -0,299 p-value: 0,019						

Tabelle 10 **Korrelation Primärtumor/Lymphknoten für K-ras Score und Stärke,** TZ=Tumorzentrum, IF= Invasionsfront, LK=Lymphknoten, r_s= Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient

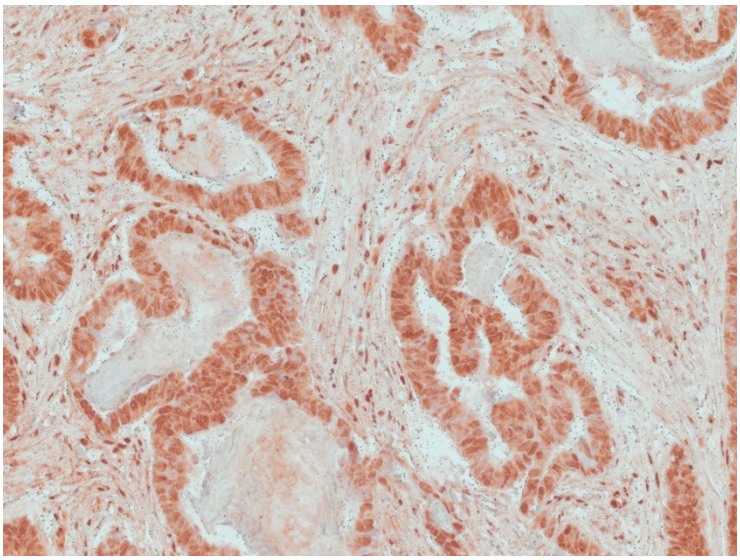

Abb. 2 **Immunhistochemisches Expressionsmuster K-ras,** 200-fache Vergrößerung, Score 4 (>90%), Stärke 2 (Färbeintensität mäßig)

3.3.2.3. PTEN

Für PTEN konnte nicht nachgewiesen werden, dass ein hoher/niedriger Anteil immunreaktiver Tumorfläche im Primärtumor mit entsprechend hohem/niedrigem Anteil in der Lymphknotenmetastase einhergeht. Auch bezüglich der Färbeintensität ergab sich kein Zusammenhang zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase (Tabelle 11). In den ausgewerteten Lymphknotenmetastasen zeigte PTEN eine mäßige bis starke Färbeintensität (Abb. 3).

PTEN													
TZ		Score LK					IF		Score LK				
Score	n	1	2	3	4	n	Score	n	1	2	3	4	n
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	2	0	0	2	0	2	2	1	0	0	1	0	1
3	30	0	2	19	9	30	3	38	0	2	26	10	38
4	16	0	0	11	5	16	4	9	0	0	5	4	9
Total	48					48	Total	48					48
r_s: 0,098 p-value: 0,254							r_s: 0,189 p-value: 0,1						
PTEN													
TZ		Stärke LK					IF		Stärke LK				
Stärke	n	0	1	2	3	n	Stärke	n	0	1	2	3	n

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10	0	1	7	2	10	1	2	0	0	1	1	2
2	18	0	3	12	3	18	2	28	0	5	17	6	28
3	20	0	2	13	5	20	3	18	0	1	14	3	18
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,066 p-value: 0,328							r_s: -0,011 p-value: 0,471						

Tabelle 11 **Korrelation Primärtumor/Lymphknoten für PTEN Score und Stärke,** TZ=Tumorzentrum, IF= Invasionsfront, LK=Lymphknoten, r_s= Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient, PTEN=phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

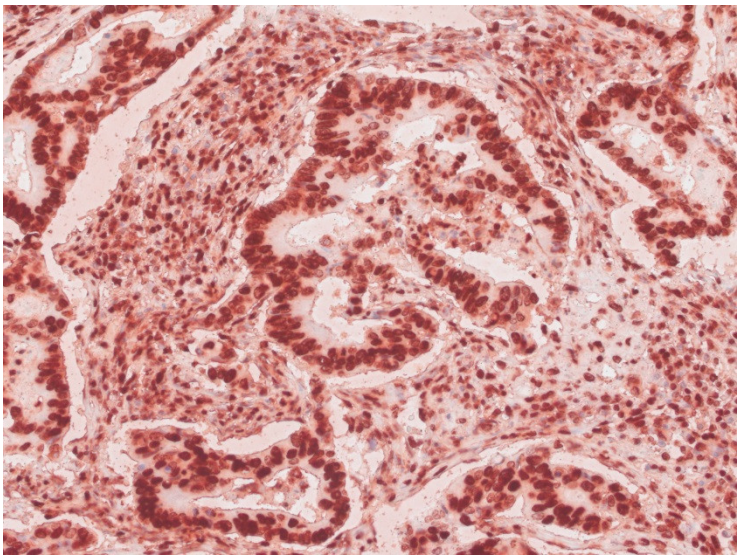

Abb. 3 **Immunhistochemisches Expressionsmuster PTEN,** PTEN=phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, 200-fache Vergrößerung, Score 4 (>90%), Stärke 3 (Färbeintensität stark)

3.3.2.4. VEGF

Für VEGF ließ sich nachweisen, dass bei hohem Anteil immunreaktiver Tumorfläche im Primärtumor auch ein hoher Anteil immunreaktiver Tumorfläche in der Lymphknotenmetastase bestand. Hierbei bestand ein stärkerer Zusammenhang zwischen Invasionsfront und Lymphknoten als zwischen Tumorzentrum und Lymphknoten. Die Färbeintensität von Primärtumor und Lymphknotenmetastase korrelierte hingegen nicht miteinander (Tabelle 12). In den ausgewerteten Lymphknotenmetastasen zeigte VEGF eine schwach bis mäßige Färbeintensität (Abb. 4).

VEGF													
TZ		Score LK					IF		Score LK				
Score	n	1	2	3	4	n	Score	n	1	2	3	4	n
1	12	4	4	4	0	12	1	15	4	4	7	0	15
2	2	0	0	2	0	2	2	3	1	2	0	0	3
3	13	3	3	7	0	13	3	10	3	4	3	0	10
4	21	1	7	13	0	21	4	20	0	4	16	0	20
Total	48					48	Total	48					48
Spearman: 0,244 p-value: 0,048							Spearman: 0,377 p-value: 0,004						
VEGF													
TZ		Stärke LK					IF		Stärke LK				
Stärke	n	0	1	2	3	n	Stärke	n	0	1	2	3	n
0	12	1	11	0	0	12	0	15	1	12	2	0	15
1	26	1	20	5	0	26	1	23	1	20	2	0	23
2	9	0	8	1	0	9	2	10	0	8	2	0	10
3	1	0	1	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0
Total	48					48	Total	48					48
Spearman: 0,166 p-value: 0,129							Spearman: 0,095 p-value: 0,260						

Tabelle 12 **Korrelation Primärtumor/Lymphknoten für VEGF,** TZ=Tumorzentrum, IF= Invasionsfront, LK=Lymphknoten, r_s= Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient, VEGF=vascular endothelial growth factor

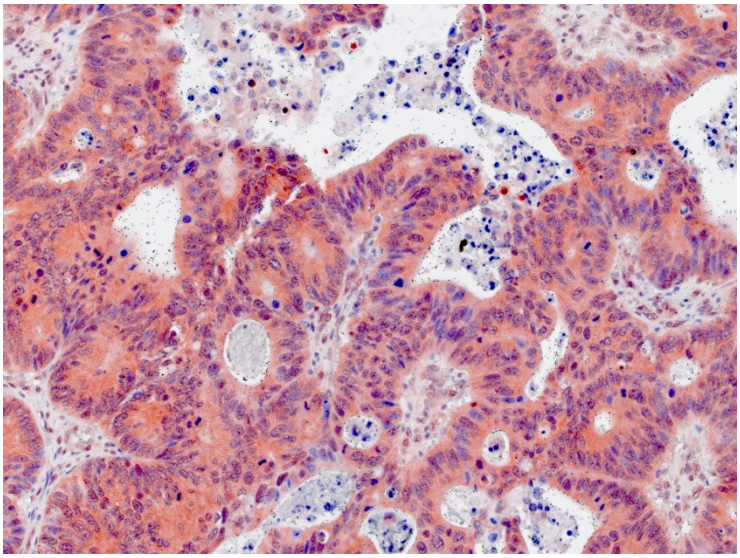

Abb. 4 **Immunhistochemisches Expressionsmuster VEGF,** VEGF = vascular endothelial growth factor, 200-fache Vergrößerung, Score 3 (50-89%), Stärke 2 (Färbeintensität mäßig)

3.3.2.5 Hif-1α

Hif-1α zeigte von allen fünf untersuchten Proteinen den stärksten Zusammenhang zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Lag im Primärtumor ein hoher/niedriger Anteil immunreaktiver Fläche vor, so war dies auch in der Lymphknotenmetastase der Fall. Es konnte sowohl für den Anteil der immunreaktiven Tumorfläche als auch für die Färbeintensität ein deutlicher Zusammenhang nachgewiesen werden (Tabelle 13). In den ausgewerteten Lymphknotenmetastasen zeigte Hif-1α überwiegend eine schwache Färbeintensität mit mäßig angefärbten Ausnahmen (Abb. 5).

Hif-1α													
TZ		Score LK					IF		Score LK				
Score	n	1	2	3	4	n	Score	n	1	2	3	4	n
1	41	40	1	0	0	41	1	40	39	1	0	0	40
2	3	3	0	0	0	3	2	2	2	0	0	0	2
3	1	0	1	0	0	1	3	3	2	1	0	0	3
4	3	0	1	1	1	3	4	3	0	1	1	1	3
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,686 p-value: 0							r_s: 0,638 p-value: 0						
Hif-1α													
TZ		Stärke LK					IF		Stärke LK				
Stärke	n	0	1	2	3	n	Stärke	n	0	1	2	3	n
0	36	33	3	0	0	36	0	35	33	2	0	0	35
1	1	0	1	0	0	1	1	3	0	3	0	0	3
2	7	1	3	3	0	7	2	8	1	3	4	0	8
3	4	0	1	2	1	4	3	2	0	0	1	1	2
Total 48						48	Total 48						48
r_s: 0,829 p-value: 0							r_s: 0,864 p-value: 0						

Tabelle 13 **Korrelation Primärtumor/Lymphknoten für Hif-1α Score und Stärke,** TZ=Tumorzentrum, IF= Invasionsfront, LK=Lymphknoten, r_s= Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient, Hif-1α=hypoxia inducible factor 1α

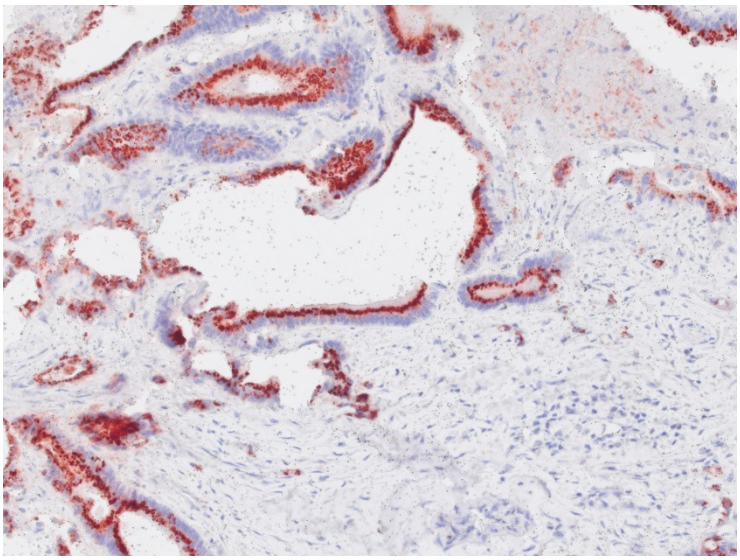

Abb. 5 **Immunhistochemisches Expressionmuster Hif-1α,** Hif-1α=hypoxia inducible factor α, 200-fache Vergrößerung, Score 3 (50-89%), Stärke 2 (Färbeintensität mäßig)

3.3.3 Häufigkeitsverteilung, Färbeintensität und immunhistochemisches Expressionsmuster für Survivin, XIAP und Smac/DIABLO

Für Survivin, XIAP und Smac/DIABLO lagen keine Daten aus Primärtumoren vor. Es folgt eine reine Darstellung der Verteilung von Scores und Färbeintensitäten.

Im Fall des Survivin betrug der Anteil immunreaktiver Tumorfläche in der Mehrzahl der Lymphknotenmetastasen mehr als 50% (Tabelle 14). Die Färbeintensität war hierbei mäßig bis stark ausgeprägt (Abb. 6).

Survivin		Stärke				
Score	n	0	1	2	3	n
1	2	1	1	/	/	2
2	9	/	5	4	/	9
3	30	/	7	21	2	30
4	7	/	/	3	4	7
	Total 48	Total 48				

Tabelle 14 **Häufigkeitsverteilung von Reaktivität und Färbeintensität für Survivin**

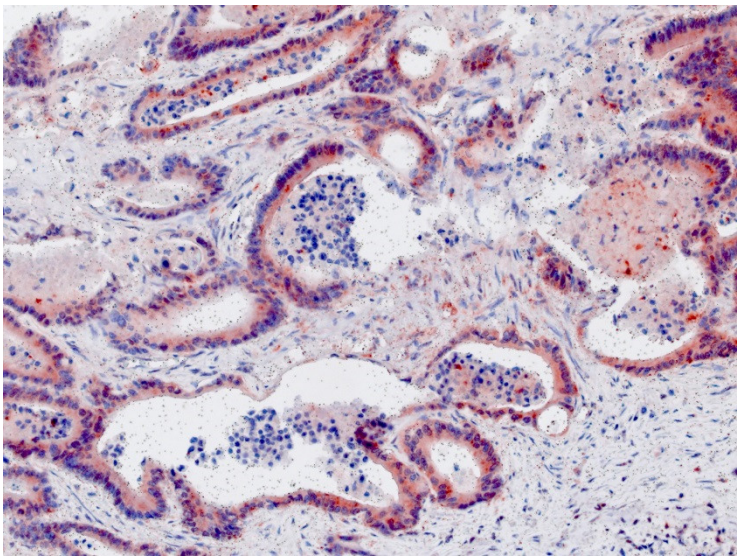

Abb. 6 **Immunhistochemisches Expressionsmuster Survivin,** 200-fache Vergrößerung, Score 3 (50-89%), Stärke 2 (mäßige Färbeintensität)

Im Fall des XIAP betrug der Anteil immunreaktiver Tumorfläche in der Mehrzahl der Lymphknotenmetastasen weniger als 50% (Tabelle 15). Die Färbeintensität war hierbei schwach bis mäßig ausgeprägt (Abb. 7).

XIAP		Stärke				
Score	n	0	1	2	3	n
1	10	6	4	/	/	10
2	20	/	17	3	/	20
3	17	/	7	9	1	17
4	1	/	/	1	/	1
	Total 48					Total 48

Tabelle 15 **Häufigkeitsverteilung von Reaktivität und Färbeintensität für XIAP**
XIAP=x-linked inhibitor-of apoptosis protein

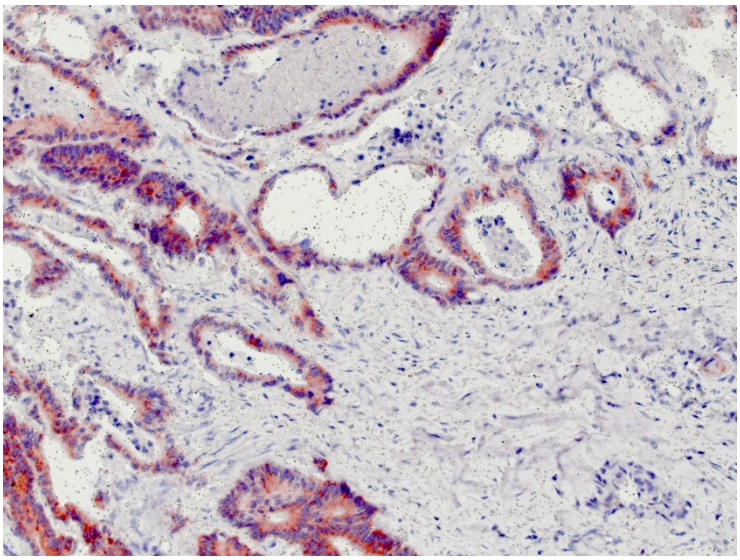

Abb. 7 **Immunhistochemisches Expressionsmuster XIAP**, XIAP = X-linked inhibitor-of-apoptosis protein, 200-fache Vergrößerung, Score 3 (50-89%), Stärke 2 (Färbeintensität mäßig)

Im Fall des Smac/DIABLO betrug der Anteil immunreaktiver Tumorfläche in der Mehrzahl der Lymphknotenmetastasen mehr als 50% (Tabelle 16). Die Färbeintensität war hierbei mäßig ausgeprägt (Abb. 8).

Smac/DIABLO		Stärke				
Score	n	0	1	2	3	n
1	1	/	1	/	/	1
2	2	/	2	/	/	2
3	24	/	4	18	2	24
4	21	/	1	17	3	21
	Total 48					Total 48

Tabelle 16 **Häufigkeitsverteilung von Reaktivität und Färbeintensität für Smac/DIABLO,** Smac/DIABLO=second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectrc point

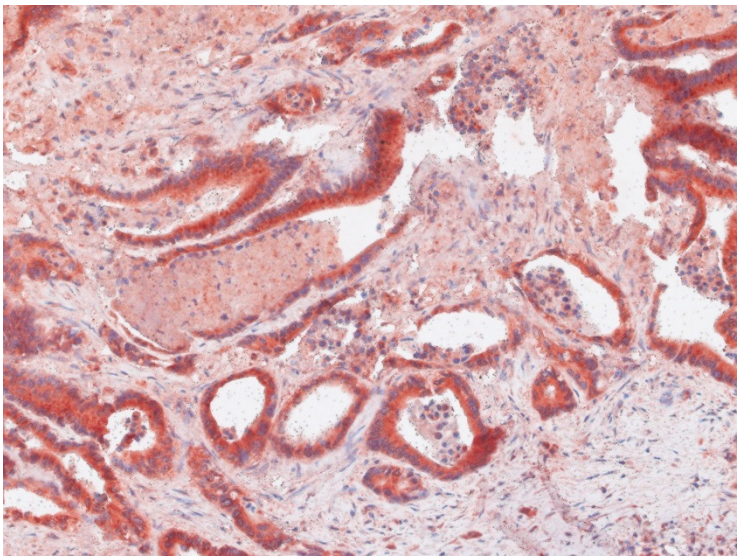

Abb. 8 **Immunhistochemisches Expressionsmuster Smac/DIABLO,** 200-fache Vergrößerung
Smac/DIABLO=second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP-binding protein with low isoelectric point, Score 4 (>90%), Stärke 2 (Färbeintensität mäßig)

3.3.4 Anteil der acht untersuchten Proteine in den Lymphknotenmetastasen

Die Scores aller acht Proteine wurden gegeneinander korreliert. Dies sollte erfassen, ob eine Tendenz für das Auftreten bestimmter Proteine in identischer Ausprägung in den Lymphknotenmetastasen vorliegt. Es fand sich ein Zusammenhang zwischen VEGF, Survivin und XIAP. In 46% der Fälle waren diese mit identischem Score in den Lymphknotenmetastasen nachweisbar (Tabelle 17).

	EGFR	**K-ras**	**PTEN**	**Survivin**	**XIAP**	**S/D**	**VEGF**	**Hif-1α**
EGFR	1,0	0,266	-0,143	0,103	0,218	0,251	-0,66	0,103
p-value		*0,034*	*0,167*	*0,244*	*0,069*	*0,043*	*0,328*	*0,243*
K-ras	0,266	1,0	0,204	-0,034	0,018	0,163	0,297	0,119
p-value	*0,034*		*0,082*	*0,409*	*0,452*	*0,135*	*0,020*	*0,210*
PTEN	-0,143	0,204	1,0	-0,296	-0,157	0,128	0,170	-0,133
p-value	*0,167*	*0,082*		*0,020*	*0,143*	*0,192*	*0,124*	*0,183*
Survivin	0,103	-0,034	-0,296	1,0	**0,434**	0,107	**0,401**	0,010
p-value	*0,244*	*0,409*	*0,020*		***0,001***	*0,235*	***0,002***	*0,474*
XIAP	0,218	0,018	-0,157	**0,434**	1,0	0,001	**0,325**	0,111
p-value	*0,069*	*0,452*	*0,143*	***0,001***		*0,497*	***0,012***	*0,226*

S/D	0,251	0,163	0,128	0,107	0,001	1,0	0,057	0,016
p-value	*0,043*	*0,135*	*0,192*	*0,235*	*0,497*		*0,350*	*0,458*
VEGF	-0,066	0,297	0,170	**0,401**	**0,325**	0,057	1,0	0,138
p-value	*0,328*	*0,020*	*0,124*	***0,002***	***0,012***	*0,350*		*0,175*
Hif-1α	0,103	0,119	-0,133	0,010	0,111	0,016	0,138	1,0
p-value	*0,243*	*0,210*	*0,183*	*0,474*	*0,226*	*0,458*	*0,175*	

Tabelle 17 **Korrelation der Proteine im LK mit Spearman-Rangkoeffizient,** EGFR=endothelial growth factor receptor, PTEN=phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, XIAP=x-linked inhibitor-of-apoptosis protein, S/D=Smac/DIABLO, VEGF=vascular endothelial growth factor, Hif-1α=hypoxia inducible factor 1α,

3.3.5 Überlebensanalyse

Zur Erfassung, ob zwischen der Ausprägung der Marker in den Lymphknoten und der Überlebenszeit in Monaten eine signifikante Korrelation besteht, wurde auch hier eine Korrelation mittels Spearman-Rangkoeffizient durchgeführt. Für keines der acht Proteine ergab sich jedoch eine signifikante Korrelation. Auf die Darstellung der Überlebenszeiträume wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet (Tabelle 18).

	EGFR	**K-ras**	**PTEN**	**VEGF**	**Hif-1α**	**Survivin**	**XIAP**	**Smac/ DIABLO**
r_s	-0,069	0,034	0,172	0,190	0,021	0,110	0,097	-0,090
p-value	*0,321*	*0,410*	*0,121*	*0,098*	*0,445*	*0,228*	*0,256*	*0,271*

Tabelle 18 **Überlebensanalyse,** r_s = Spearman`scher Rangkorrelationskoeffizient, EGFR=endothelial growth factor receptor, PTEN=phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, XIAP=x-linked inhibitor-of-apoptosis protein, S/D=Smac/DIABLO, VEGF=vascular endothelial growth factor, Hif-1α=hypoxia inducible factor 1α

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms beinhaltet neben der Tumorchirugie den Einsatz von Zytostatika und monoklonalen Antikörpern. Das jeweilige Outcome ist jedoch von Patient zu Patient unterschiedlich. Hier sind Marker nötig, die zuverlässig

das Ansprechen auf die jeweilige Therapie und den Einfluss auf das Überleben vorhersagen können. Ziel ist eine individualisierte Therapie, fußend auf molekularen Tumorcharakteristika (Rossi et al., 2013; Watanabe et al., 2001). Üblicherweise wird für die Erforschung solcher Marker Primärtumorgewebe gewonnen und untersucht. Dies geschieht in der Annahme, dass sich Primärtumor und Metastase hinsichtlich ihrer Biologie und Expression von Markern nicht unterscheiden, wobei viele Studien gezeigt haben, dass auch dies der Fall sein kann (Deng et al., 2009). Diese Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen könnte Grund für das Versagen obiger Therapien sein und bedarf näherer Aufmerksamkeit (Jin et al., 2012).

4.2 EGFR

EGFR war der erste Wachstumsfaktor, der als möglicher Angriffspunkt für die Therapie des kolorektalen Karzinoms untersucht wurde, da eine Ausprägung in der Mehrheit der epithelialen malignen Tumoren nachgewiesen wurde. Hierbei spielen sowohl die extrazelluläre Rezeptordomäne des EGFR blockierende monoklonale Antikörper als auch Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase eine wesentliche Rolle (Arteaga, 2002).

Für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms sind derzeit zwei monoklonale Antikörper zugelassen, Cetuximab (chimärer, monoklonaler Mensch-Maus-IgG1 AK) und Panitumumab (humaner monoklonaler IgG2 AK). Beim Einsatz dieser EGFR-Antagonisten ist jedoch die sorgfältige Auswahl, der zu therapierenden Patienten nötig. Ein Ansprechen auf die Therapie wird nur in 10-20% der Fälle beobachtet (Ciardiello and Tortora, 2008; Yang et al., 2013).

Wesentlich hierbei sind die Ras-Proteine, welche eine Schlüsselposition im EGFR-Signalweg einnehmen. EGFR bindet an der Zelloberfläche an Rezeptoren und setzt hiermit konsekutiv die Bindung der Ras-Proteine an GTP in Gang. Diese sind folgend aktiviert und interagieren mit einer Vielzahl von Effektormolekülen, die ihrerseits Zellproliferation, - überleben und – differenzierung regulieren (Schubbert et al., 2007).

Viele Arbeiten haben sich seither damit beschäftigt, warum nur ein Teil der Patienten gut auf eine anti-EGFR basierte Therapie anspricht und aus welchem Grund die Entwicklung von Resistenzen beobachtet wird. Zentral hierbei ist die Untersuchung der beteiligten Signalwege, die durch die Ras-Proteine vermittelt werden (Amado et al., 2008; Benvenuti et al., 2007; Bokemeyer et al., 2009; Silvestris et al., 2009; Van Cutsem, 2008).

Benvenuti et al. kommen in ihrer Arbeit zu uneinheitlichen Ergebnissen. Einerseits schlussfolgern sie, dass Patienten mit mutiertem K-ras nicht von einer anti-EGFR Therapie durch monoklonale Antikörper profitieren. Andererseits sind Fälle dokumentiert, in denen Patienten trotz K-ras-Mutation auf die Antikörpertherapie ansprechen (Benvenuti et al., 2007).

Amado et al. hingegen konnten eindeutig nachweisen, dass die Therapie mit Panitumumab nur effektiv ist, wenn der Wildtyp K-ras vorliegt (Amado et al., 2008).

Es liegen mittlerweile auch die Ergebnisse mehrerer groß angelegter Studien vor. In der OPUS-Studie wurde die Therapiekombination aus FOLFOX-4 (Folinsäure, 5-Fluoruracil, Oxaliplatin) und Cetuximab untersucht, in der CRYSTAL-Studie die aus FOLFIRI (Folinsäure, Fluoruracil, Irinotecan) und Cetuximab. In beiden Fällen profitierten Patienten mit Wildtyp-K-ras deutlich von der Kombination (i.S. von Ansprechraten und progressionsfreiem Überleben), wohingegen Patienten mit K-ras-Mutation mehr von der zytostatischen Monotherapie profitierten (Bokemeyer et al., 2009; Van Cutsem, 2008).

Silvestris et al. haben in ihrer Veröffentlichung mehrere Studien miteinander verglichen und kommen zu dem Schluss, dass die alleinige Selektion behandelter Patienten nach K-ras-Status nicht ausreicht, um die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf monoklonale Antikörper zu verbessern. Vielmehr fordern sie die Erforschung weiterer Biomarker, um die Patientenselektion weiter zu optimieren und so die Erfolgsquoten eingesetzter Chemotherapeutika zu steigern (Silvestris et al., 2009).

Wichtig ist hierbei die Erforschung der Auswirkung, die die Heterogenität der EGFR-Expression in Primärtumor und korrespondierender Metastase im Hinblick auf die Wirksamkeit einer anti-EGFR basierten Therapie hat. Diese Hypothese bildet die Grundlage mehrerer Arbeiten (Bralet et al., 2005; Deng et al., 2009; Jin et al., 2012; McKay et al., 2002; Molinari et al., 2009; Scartozzi et al., 2004; Wei et al., 2011).

Molinari et al. untersuchten 38 Primärtumoren und ihre korrespondierenden Metastasen – darunter 15 Lymphknotenmetastasen. Die EGFR-Expression wurde zum einen immunhistochemisch untersucht, wobei sie im Primärtumor und der zugehörigen Lymphknotenmetastase korrelierte (Molinari et al., 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression im Primärtumor und der zugehörigen Lymphknotenmetastase nachgewiesen werden. In 22 von 48 Fällen liegt sogar ein identischer prozentualer Anteil immunreaktiver Tumorfläche in Tumorzentrum und

korrespondierender Lymphknotenmetastase vor, die Auswertung von Invasionsfront und Lymphknotenmetastase zeigt eine Übereinstimmung in 23 von 48 Fällen. Dies impliziert das Vorliegen von Homogenität zwischen Primärtumor und Metastase.

Molinari et al. untersuchten des Weiteren den Gen-Status von EGFR in Primärtumor und Metastase. Trotz immunhistochemisch nachweislicher Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastase stimmt der Gen-Status nicht in allen Fällen überein. Sie kommen zu dem Schluss, dass diese Unterschiede in der molekularen Struktur von EGFR im Primärtumor und in den korrespondierenden Metastasen für unterschiedliches Ansprechen auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern ursächlich sein können (Molinari et al., 2009). Bezugnehmend auf die vorliegende Arbeit wäre also die Analyse des EGFR-Gen-Status sowohl im Primärtumor als auch in der Lymphknotenmetastase interessant, um weitere Aussagen zur tätsächlichen Übereinstimmung der beiden Entitäten hinsichtlich ihres Markerprofils treffen zu können.

McKay et al. untersuchten ebenfalls die EGFR-Expression 249 kolorektaler Karzinome und 42 korrespondierender Lymphknotenmetastasen mittels Immunhistochemie. Hier wurde nachgewiesen, dass sich das Ausmaß der Expression zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase in 59,5% (25/42) der Fälle unterschied. In 7 Metastasen konnte EGFR überhaupt nicht nachgewiesen werden. McKay et al. konstatieren, dass demzufolge die Expression von EGFR im Primärtumor nicht die Expression in der Lymphknotenmetastase reflektiert und kommen zu dem Schluss, dass die ausschließliche Untersuchung des Primärtumors hinsichtlich der EGFR-Expression nicht ausreicht, um ein Ansprechen auf ein therapeutisches Regime vorherzusagen.

Wei et al. wiesen EGFR nur in 16 von 56 Primärtumoren und nur in 8 der 56 zugehörigen Lymphknotenmetastasen nach (Wei et al., 2011). Bralet et al. wiesen in ihrer Arbeit in 95% der kolorektalen Karzinome EGFR nach, jedoch nur in 88% der korrespondierenden Lymphknotenmetastasen und 79% der korrespondierenden Lebermetastasen (Bralet et al., 2005). Auch Scartozzi et al. plädieren für die weitere Untersuchung von Metastasen, die im Gegensatz zu ihrem Primärtumor kein EGFR mehr exprimieren (Scartozzi et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde EGFR in 16 von 48 Lymphknotenmetastasen nicht nachgewiesen. Im Tumorzentrum der 16 korrespondierenden Primärtumoren ließ sich EGFR in 10 von 16 Fällen nachweisen, an der Invasionsfront in 13 von 16 Fällen. Dies bedeutet, dass es im Verlauf der Metastasierung zu einem Verlust der EGFR-Expression kommt.

Dies scheint auch die Arbeit von Jin et al. zu unterstützen. Untersucht wurde der Einfluss heterogener EGFR-Expression in Primärtumor und Metastasen (Lymphknoten und Leber) anhand eines Xenograft-Modells. Es konnte unterschiedliches Ansprechen auf anti-EGFR basierte Therapie nachgewiesen werden (Jin et al., 2012).

Die prognostische Überlegenheit einer starken EGFR-Expression in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Expression im Primärtumor wurde von Deng et al. untersucht. Es wurden 94 Primärtumoren und 49 korrespondierende Lymphknotenmetastasen untersucht. Starke EGFR-Expression in den Lymphknotenmetastasen war assoziiert mit geringerem Überleben, starke EGFR-Expression im Primärtumor hingegen nicht (Deng et al., 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit korrelierte der Grad der Expression von EGFR in den Lymphknotenmetastasen nicht mit dem Überleben. Ebensowenig konnte ein Einfluss auf die Überlebenszeit für die EGFR-Expression im korrespondierenden Primärtumor nachgewiesen werden (Reinwald, 2010). Hier stimmen Lymphknotenmetastase und Primärtumor also überein, anders als bei Deng et al. (Deng et al., 2009).

Zusammengefasst zeichnet die Studienlage ein eher heterogenes Bild der EGFR-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen. Die Tatsache, dass nur in einzelnen Studien die prognostische Bedeutung der EGFR-Expression in Primärtumoren und Metastasen getrennt untersucht wurde, erschwert zudem die Beurteilung ihrer prognostischen Relevanz.

Die hier vorliegende Arbeit hat die prognostische Bedeutung der EGFR-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastase getrennt voneinander untersucht. Sowohl für die EGFR-Expression als auch für deren Einfluss auf die Überlebenszeit konnte für Primärtumor und Lymphknotenmetastase eine Konkordanz nachgewiesen werden, wobei jedoch kein Einfluss der jeweiligen Gewebeentitäten auf das Überleben ermittelt werden konnte.

4.3 K-Ras

K-Ras ist ein Schlüsselprotein für Entstehung, Therapie und Prognose des kolorektalen Karzinoms, wie bereits unter 1.2.2 und 4.2 erläutert. Derzeit wird nur anhand des K-ras-Mutationsstatus entschieden, ob eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern zur Anwendung kommt oder nicht. Hierbei wurde bisher immer von einer hohen Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastase ausgegangen (Baas et al., 2011).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von K-Ras im Primärtumor und korrespondierendem Lymphknoten nachgewiesen werden. Eine Einordnung dieses auf immunhistochemischer Auswertung basierenden Ergebnisses ist schwierig. Im Mittelpunkt der gesichteten Arbeiten steht die Bestimmung des K-ras-Mutationsstatus, besonders im Hinblick auf die Entwicklung therapeutischer Ansätze.

Die Expression von K-ras in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen, ist bisher kaum immunhistochemisch erforscht. Aus diesem Grund bezieht sich die Diskussion hier auf Arbeiten, die die Homo- bzw. Heterogenität des K-ras-Mutationsstatus in Primärtumor und korrespondierenden Metastasen auf molekularer Ebene untersuchten.

Erwähnenswert ist hierbei, dass diskordante Ergebnisse verschiedener Studien unter anderem durch Anwendung technisch unterschiedlicher Methoden begründet sein können. Einen Goldstandard für die Mutationsanalyse von K-ras gibt es bisher nicht (Anderson, 2011; Franklin et al., 2010; Miglio et al., 2013).

Baldus et al. untersuchten 55 Fälle gepaarter Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. In 31% der Fälle wurde eine Diskordanz des Mutationsstatus nachgewiesen. Zudem konnten sie zeigen, dass sich der Mutationsstatus von K-ras innerhalb mehrerer Lymphknotenmetastasen eines Primärtumors unterscheiden kann und konstatieren, dass die Untersuchung betroffener Lymphknoten hinsichtlich der K-ras-Mutation keine Schlussfolgerung bezüglich des K-ras-Status des Primärtumors zulässt und deshalb auch für die Routine-Diagnostik nicht geeignet ist. Hier wurde die Methode der DNA-Sequenzierung angewandt (Baldus et al., 2010).

Floriani et al. äußern sich allgemein kritisch zur Metastasenbiopsie. Sie beziehen sich auf die Arbeit von Molinari et al. Hier wird die Analyse von Metastasen vor Einbindung in eine Therapiestudie mit monoklonalen Antikörpern vorgeschlagen (Molinari et al., 2009). Abgesehen von Kritikpunkten an der Studie selbst, sehen Floriani et al. auch Probleme im klinischen Alltag. Sie merken insbesondere an, dass es durch die Entnahme von Metastasen und deren Aufarbeitung zu einer Verzögerung der Therapieeinleitung kommt, zudem noch mit fraglichem Nutzen (Floriani et al., 2009).

Mariani et al. verglichen mittels PCR den Mutationsstatus von K-ras im Primärtumor und korrespondierenden Metastasen (unter anderem Lymphknoten) bei 38 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es konnte eine Übereinstimmung des Mutationsstatus von 97% nachgewiesen werden (Mariani et al., 2010). Auch Zauber et al. wiesen ein identisches

molekulares Profil von K-ras in kolorektalen Karzinomen und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen nach (Zauber et al., 2003).

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Santini et al., die auch mittels PCR 96% Übereinstimmung des K-ras-Mutationsstatus zwischen Primärtumoren und zugehörigen Fernmetastasen – in diesem Falle jedoch nur hepatische und pulmonale Metastasen – aufzeigen konnten (Santini et al., 2008). Voutsina et al. untersuchten 83 Patienten mit kolorektalem Karzinom und korrespondierenden Metastasen (überwiegend Leber und Lunge) mittels DNA-Sequenzierung. Eine Übereinstimmung des Mutationsstatus wurde in 94% der Fälle nachgewiesen (Voutsina et al., 2013). Miglio et al. dokumentieren ebenfalls eine hohe Konkordanz des K-ras-Mutationsstatus (in 96% der Fälle Übereinstimmung von Primärtumoren und Metastasen) (Miglio et al., 2013). Und auch Murata et al., Molinari et al. und Paliogiannis et al. bestätigten in ihren Studien den konkordanten Mutationsstatus von K-ras in Primärtumoren und Metastasen (Molinari et al., 2009; Murata et al., 2013; Paliogiannis et al., 2014).

Die Mehrzahl der Studien weist also eine hohe Übereinstimmung des Mutationsstatus von K-ras in Primärtumoren und Metastasen nach. Für den klinischen Alltag könnte dies bedeuten, dass es ausreichend wäre, entweder Primärtumorgewebe oder Metastasengewebe zu analysieren, um Patienten für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern zu selektieren (Artale et al., 2008; Miglio et al., 2013).

Baas et al. führten 2011 eine systematische Literaturrecherche durch, 21 Studien wurden letztlich inkludiert. Es wurden Konkordanzraten des K-ras-Mutationsstatus zwischen 76% und 100% erfasst mit einer Gesamtkonkordanz von 93%. Interessanterweise war die Konkordanz zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen geringer (84%) als die zwischen Primärtumor und Lebermetastasen (95%) (Baas et al., 2011). Die Metaanalyse von Han et al. aus dem Jahr 2012 kommt zu ähnlichen Diskordanzraten von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. Die Autoren konstatieren deshalb, dass die Analyse von Lymphknotenmetastasen nicht dazu geeignet ist, eine Entscheidung über ein anti-EGFR-gerichtetes Therapieregime zu treffen (Han et al., 2012).

Insgesamt kommen die gesichteten Studien bezüglich des K-ras-Mutationsstatus in Primärtumor, Fern- und Lymphknotenmetastase zu ähnlichen Ergebnissen. Auch die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass das immunhistochemische Expressionsmuster von K-ras in Primärtumor und Lymphknotenmetastase signifikant miteinander korrelierte. Auch hinsichtlich eines möglichen Einflusses der K-ras-

Expression auf das Überleben wurden einheitliche Ergebnisse für Primärtumore und Lymphknotenmetastasen erhoben. Weder für die Primärtumore (Luczak, 2010), noch für die Lymphknotenmetastasen (vorliegende Arbeit), konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Überlebenszeit nachgewiesen werden.
Möglicherweise implizieren diese Ergebnisse, dass auch immunhistochemische Verfahren für den Nachweis von K-ras in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen geeignet sein können. In der Praxis spielt hinsichtlich der Therapieentscheidung derzeit allerdings nur der K-ras-Mutationsstatus eine Rolle.

4.4 PTEN

In der vorliegenden Arbeit wurde PTEN in allen 48 Primärtumoren und ihren korrespondierenden Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass ein hoher beziehungsweise niedriger Anteil immunreaktiver Tumorfläche im Primärtumor mit entsprechend hohem oder niedrigem Anteil in der Lymphknotenmetastase einhergeht. Ebenso ergab sich kein Zusammenhang mit dem Überleben.
Eine Einordnung dieses Ergebnisses ist schwierig, da sich die gesichteten Arbeiten häufig hinsichtlich der gewählten Scoringsysteme für PTEN und Grenzwerte zur Festlegung von PTEN-Positivität vs. PTEN-Negativität unterscheiden. Die hier vorliegende Arbeit orientiert sich an dem Scoringsystem, welches bereits zur Auswertung der Primärtumoren verwendet wurde (Luczak, 2010; Reinwald, 2010).
Die nachfolgend zitierten Arbeiten basieren sämtlich auf immunhistochemischen Methoden.
Jang et al. legten in ihrer Arbeit identische Grenzwerte wie in der hier vorliegenden fest. Es wurden Kolonmukosa, Adenome, Adenokarzinome und Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch auf PTEN-Expression untersucht. Während noch alle Proben der Kolonmukosa positiv für PTEN waren (nukleäre Färbung), war dies bis hin zu den Metastasen immer weniger der Fall (85,7% positive Polypen, 50% positive Karzinome, 46,4% positive Lymphknotenmetastasen). Hieraus entstand die generelle Schlussfolgerung, dass das Ausmaß der PTEN-Expression im Rahmen der Karzinogenese abnimmt. Gepaarte Primärtumoren und Metastasen wurden jedoch nicht miteinander korreliert (Jang et al., 2010).

In der Arbeit von Molinari et al. wurde ebenfalls ein Verlust der PTEN-Expression in 8/38 Primärtumoren und 12/38 Metastasen nachgewiesen. Hier galten jedoch bereits Gewebeproben mit weniger als 50% immunreaktiver Tumorfläche als PTEN-negativ und es wurde fast ausschließlich zytoplasmatische PTEN-Expression beurteilt (Molinari et al., 2009).

Die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Annahme, dass die Expression von PTEN im Zuge der Karzinogenese abnimmt. Alle 48 Lymphknotenmetastasen exprimierten PTEN.

Voutsina et al. beobachteten, dass Metastasen PTEN-negativer Primärtumoren durchaus PTEN-positiv sein können. Es wurden sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbung beurteilt mit jeweils unterschiedlichen Grenzwerten für positive bzw. fehlende PTEN-Expression. Eine Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Metastase konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden (keine Angaben zur Lokalisation der Metastasen) (Voutsina et al., 2013).

Und auch Park et al. sahen keine Konkordanz zwischen Primärtumor- und Metastasengewebe (Metastasen von Leber, Lunge, Lymphknoten und Peritoneum, überwiegend zytoplasmatische Färbung, vierstufiges Scoringsystem mit Kombination aus Färbeintensität und Anteil der immunreaktiven Tumorfläche) (Park et al., 2011).

Barbier et al. verwendeten zur Auswertung der PTEN-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen (Leber und Lunge) den IRS (immunoreactivity score). Eine Konkordanz wurde nicht nachgewiesen (Barbier et al., 2010).

Etliche Arbeiten konnten jedoch - wenn auch teils mit erheblich abweichenden Raten – eine Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastase nachweisen (Atreya et al., 2013; Baas et al., 2011; Loupakis et al., 2009; Molinari et al., 2009).

Loupakis et al. untersuchten 45 Primärtumoren und korrespondierende Metastasen (keine Angaben zur Lokalisation der Metastasen, Scoringsystem siehe Park et al.). In 60% der Fälle fand sich eine Übereinstimmung der PTEN-Expression zwischen Primärtumor und Metastase (Loupakis et al., 2009).

Molinari et al. beobachteten in 89% der Fälle eine identische PTEN-Expression in Primärtumor und Metastase (keine Angaben zur Lokalisation der Metastasen, Scoringsystem s.o.) (Molinari et al., 2009).

Atreya et al. untersuchten 70 Primärtumoren kolorektaler Karzinome und deren gepaarte Lebermetastasen (Gewebeproben mit weniger als 10% Anfärbung galten als

PTEN-negativ, ausschließliche Beurteilung der zytoplasmatischen Färbung). In 98% der Fälle lag eine Konkordanz der PTEN-Expression vor (Atreya et al., 2013).

Die Konkordanzraten in Studien, die anstelle der Immunhistochemie die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung anwendeten, lagen zwischen 63% und 75% (Baas et al., 2011). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PTEN-Expression in Primärtumoren kolorektaler Karzinome und deren Metastasen erheblich variiert.

Ein Grund hierfür könnte der heterogene Verlust der Expression von PTEN im Zuge der Karzinogenese und Metastasierung sein (Atreya et al., 2013). Gerlinger et al. sprechen in diesem Zusammenhang davon, dass die Expression von Biomarkern innerhalb einer Tumorentität in Folge von Mutationen und chromosomaler Imbalance unterschiedlich sein kann und zu phänotypischer Diversität führt (Gerlinger et al., 2012).

Möglicherweise sind die Unterschiede zwischen Primärtumor- und Metastasengewebe aber auch bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher immunhistochemischer Verfahren (Atreya et al., 2013).

PTEN ist bisher kein etablierter Marker, der vor einer Therapieentscheidung getestet wird. Sollten sich durch Etablierung validierter Testverfahren höhere Konkordanzraten zwischen der Expression im Primärtumor und der Expression in der Metastase ergeben, könnte sich dies jedoch ändern (Atreya et al., 2013).

Dass PTEN relevant für die Prognose kolorektaler Karzinompatienten ist, konnten bereits mehrere Studien zeigen, denen es gelang, den Verlust der PTEN-Expression mit geringeren Überlebensraten zu assoziieren (Atreya et al., 2013; Jang et al., 2010; Park et al., 2011).

Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass der Verlust von PTEN in kolorektalen Karzinomen mitverantwortlich ist für eine Resistenz gegen Cetuximab (Jhawer et al., 2008). In der Studie von Frattini et al. sprach keiner der 11 Patienten mit nachweislichem PTEN-Verlust auf eine Therapie mit Cetuximab an, wohingegen 10 von 16 Patienten mit PTEN-Expression von der Therapie profitierten (Frattini et al., 2007). Sood et al. ermittelten für PTEN-Positivität (unabhängig ob im Primärtumor oder in Metastasen) ein besseres Ansprechen auf Cetuximab und längere Überlebensraten (Sood et al., 2012). Razis et al. assoziierten eine PTEN-Expression mit verlängerter progressionsfreier Überlebenszeit nach Cetuximab-Therapie (Razis et al., 2014).

Loupakis et al. konnten in diesem Zusammenhang ein längeres durchschnittliches Überleben nach Cetuximab-Therapie mit PTEN-positiven Metastasen korrelieren, wohingegen dies für PTEN-positive Primärtumore nicht gelang (Loupakis et al., 2009).

Auch Negri et al. assoziierten den Verlust der PTEN-Expression in Metastasen kolorektaler Karzinome mit vermindertem Ansprechen auf Cetuximab und Krankheitsprogress (Negri et al., 2010).
Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es hinsichtlich eines prädiktiven Wertes in Bezug auf Therapieansprechraten sinnvoll sein könnte, das Screening sowohl von Primärtumoren als auch von Metastasen um PTEN zu erweitern. Hinsichtlich der doch recht heterogenen Studienlage bezüglich Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastase erscheint es jedoch zuvor empfehlenswert, einen Standard für die immunhistochemische Auswertung der PTEN-Expression festzulegen und weitere Studien an großen Patientenkollektiven durchzuführen.

4.5 VEGF

Wissenschaftliche Studien haben sich bereits früh mit dem Zusammenhang der VEGF-Expression in kolorektalen Karzinomen und der möglicherweise daraus resultierenden verstärkten Metastasierung beschäftigt (Kondo et al., 2000; Takahashi et al., 1995). Mehrere Arbeiten konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der VEGF platelet-derived-growth-factor Familie und der Metastasierung in Lymphknoten beim kolorektalen Karzinom nachweisen und Mitglieder der VEGF-Familie werden sogar als Promotoren der Lymphangiogenese bezeichnet (Cao et al., 2009; Funaki et al., 2003; Soumaoro et al., 2006; Zafirellis et al., 2008). Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch wiederum nicht nachweisen, dass eine erhöhte VEGF-Expression mit der Invasion in Lymphgefäße, Lymphknotenmetastasen und schlechter Prognose assoziiert ist (Choi et al., 2011; Hanrahan et al., 2003).
Soumaoro et al. wiesen in ihrer Arbeit VEGF in 93,3% der Lymphknotenmetastasen korrespondierender kolorektaler Primärtumore nach, die Expression von VEGF in Primärtumor und Lymphknotenmetastase korrelierte signifikant miteinander. Zudem wurde eine Korrelation zwischen VEGF-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ermittelt (Soumaoro et al., 2006).
Zafirellis et al. konnten ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF und der durchschnittlichen Anzahl von Lymphknotenmetastasen in kolorektalen Karzinomen nachweisen (Zafirellis et al., 2008) und auch Barbier et al. wiesen in Leber- und Lungenmetastasen höhere VEGF-Expressionsraten nach als im korrespondierenden Primärtumor (Barbier et al., 2010). Auch Akagi et al., Duff et al.

und Wang et al. fanden übereinstimmende Expressionsmuster zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen (Akagi et al., 2000; Duff et al., 2006; Wang et al., 2011). Die zitierten Arbeiten basieren auf immunhistochemischen Verfahren.

Die Resultate der hier vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit diesen Ergebnissen. VEGF konnte in 95,8% aller Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Zudem korrelierte die Expression von VEGF in Primärtumor und Lymphknotenmetastase signifikant miteinander.

In Anbetracht dessen erscheint die Annahme, zwischen Primärtumor und korrespondierender Metastase herrsche Konkordanz für die VEGF-Expression, legitim.

Die Studienlage ist hier jedoch kontrovers. Karamitopoulou et al. wiesen für VEGF einen Expressionsverlust in Lymphknotenmetastasen korrespondierender Primärtumore nach (Karamitopoulou et al., 2010). Berney et al. untersuchten 58 kolorektale Karzinome und 30 Lebermetastasen auf VEGF-Expression. In den Metastasen lag schwächere VEGF-Expression vor (Berney et al., 1998). Barbier et al. fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen VEGF-Expression in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen (Leber- und Lungenmetastasen) (Barbier et al., 2010). Es gibt also durchaus Belege dafür, dass sich das Expressionsmuster des VEGF in Primärtumor und Metastase unterscheidet.

Des Weiteren konnte in der hier vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der Expression von VEGF in den Lymphknotenmetastasen und dem Überleben ermittelt werden. Auch für die VEGF-Expression in den korrespondierenden Primärtumoren wurde keine signifikante Korrelatiom mit der Überlebenszeit nachgewiesen (Reinwald, 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Karamitopoulou et al. und Madbouly et al. (Karamitopoulou et al., 2010; Madbouly et al., 2007).

Eine Vielzahl von Arbeiten kommt zu anderen Ergebnissen (Bendardaf et al., 2008; Des Guetz et al., 2006; Wang et al., 2014).

Die Metaanalyse von Des Guetz et al. ermittelte eine signifikante Korrelation zwischen VEGF-Expression und kürzerem rezidivfreiem Überleben (Des Guetz et al., 2006; Wang et al., 2014). Auch Bendardaf et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Intensive VEGF-Expression fand sich häufiger in fortgeschrittenen Tumorstadien, Tumorgewebe mit hoher VEGF-Expression sprach schlechter auf Behandlung an und die Patienten verstarben früher (Bendardaf et al., 2008). Auch die aktuellste Metaanalyse von Wang et al. klassifiziert VEGF als prognostisch ungünstigen Faktor (Wang et al., 2014).

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Beeinflussung von VEGF einen wesentlichen Ansatz in der Behandlung kolorektaler Karzinompatienten darstellt. Die Hemmung von VEGF resultiert über einen Umbau des Blutgefäßsystems im Tumorgewebe in gesteigerter Effizienz der Gefäßarchitektur. Hierdurch fluten Chemotherapeutika effektiver an (Ferrara, 2005).

Der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab, der in der Lage ist, alle Isoformen des VEGF zu erkennen und zu inhibieren, ist in Kombination mit Chemotherapie in Europa seit 2005 für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen (Díaz-Rubio and Schmoll, 2005). Seitdem wurde in mehreren klinischen Studien nachgewiesen, dass die Kombination aus Bevacizumab und unterschiedlichen chemotherapeutischen Regimes Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil bieten kann (Giantonio et al., 2007; Hurwitz et al., 2005).

Auch die Rezeptoren VEGFR 1, -2 und -3, über welche VEGF seine Wirkungen auf das Gefäßendothel vermittelt, werden als potentielle Angriffspunkte in der Krebstherapie untersucht. Die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren Sunitinib, Vatalanib und Cediranib sind in der Lage, alle drei Rezeptoren zu hemmen. Auch lösliche VEGF-Rezeptoren wie das rekombinante Fusionsprotein Aflibercept, die an VEGF-A und seine Isoformen binden und so die Weitergabe angiogenetischer Signale an das Gefäßendothel inhibieren, befinden sich in der Erforschung (Loupakis et al., 2010; Oliveira et al., 2010).

Die Zahl therapeutischer Optionen wächst also stetig. Jedoch gibt es bisher keinen Biomarker, der zuverlässig vorhersagen kann, ob Patienten auf eine anti-VEGF-gerichtete Therapie ansprechen werden. Solche prädiktive Marker sind aber wichtig für die Auswahl von Patienten für eine Therapie (Loupakis et al., 2010).

Hier wäre es möglicherweise sinnvoll, im Vorfeld die Konkordanz der VEGF-Expression in Primärtumoren und Metastasen zu untersuchen. Bei Vorliegen von Heterogenität zwischen Primärtumor und Metastase wäre es möglich, dass eine gegen VEGF-gerichtete Therapie nicht anspricht. Dieser Sachverhalt wurde von Jin et al. anhand eines Xenograft-Modells untersucht. Sie stellten Unterschiede der VEGF-Expression im kolorektalen Primärtumor und dem korrespondierenden Metastasengewebe (Lymphknoten und Leber) fest. Im Metastasengewebe lag eine höhere Expression von VEGF vor. Es wurde ein Ansprechen auf Bevacizumab dokumentiert. Hier hatte die Heterogenität keinerlei Auswirkung auf das Therapieansprechen (Jin et al., 2012). Unbeantwortet bleibt dabei jedoch die Frage, wie

sich das Ansprechen auf die Therapie im Falle einer niedrigeren VEGF-Expression in der Metastase verhält.

Auch Pan et al. dokumentierten in ihrem auf einem Xenograft-Modell basierenden Versuch unterschiedliche Ansprechraten von Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknoten- und Lebermetastasen auf Bevacizumab bzw. Bevacizumab in Kombination mit Capecitabine. Hieraus schlussfolgern sie, dass vor Auswahl einer Therapiestrategie auch in Betracht gezogen werden sollte, ob zwischen Primärtumor und Metastasengewebe Konkordanz bezüglich des Markerprofils vorliegt, gegen das sich die ausgewählte Therapie richtet (Pan et al., 2013).

Zusammenfassend erscheint die aktuelle Studienlage auf den ersten Blick heterogen, wobei bei der Sichtung der Literatur auffällt, dass die Zahl derer, die Konkordanz von Primärtumor und Metastase nachweisen konnten, überwiegt. Die hier vorliegende Arbeit stützt die Annahme von Konkordanz zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase hinsichtlich der VEGF-Expression.

4.6 Hif-1α

Der Zusammenhang von Hif-1α mit klinisch-pathologischen Faktoren beim kolorektalen Karzinom wurde bereits in mehreren auf immunhistochemischen Methoden basierenden Arbeiten untersucht (Chang et al., 2011; Wu et al., 2010; Xu et al., 2014).

Xu et al. konnten nachweisen, dass die Expression von Hif-1α signifikant mit der Lymphknotenbeteiligung korrelierte (Xu et al., 2014). Auch Wu et al. wiesen nach, dass das Auftreten von Lymphknotenmetastasen wahrscheinlicher ist, je höher die Expression von Hif-1α im Primärtumor ausgeprägt ist (Wu et al., 2010). Chang et al. untersuchten Rektumkarzinome auf Hif-1α-Expression. In den Fällen, in denen eine Mikrometastasierung in Lymphknoten vorlag, war die Hif-1α-Expression in den Primärtumoren signifikant höher (Chang et al., 2011). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Hif-1α-Expression im kolorektalen Karzinom Einfluss auf Tumorinvasion und Metastasierung hat.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für die Hif-1α-Expression ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil immunreaktiver Tumorfläche im Primärtumor und der korrespondierenden Lymphknotenmetastase nachgewiesen. Auch für die Färbeintensität zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen

Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Allerdings ließ sich dieser Marker nur in 14 Lymphknotenmetastasen (29,1%) nachweisen.

Bisher sind nur wenige Studien durchgeführt worden, die die Expression von Hif-1α in Metastasen kolorektaler Karzinome untersuchten oder gar Primärtumore und korrespondierende Metastasen miteinander verglichen. Deren Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von Hif-1α in Primärtumoren und Metastasen konkordant ist.

Shimomura et al. untersuchten Primärtumore und korrespondierende Lebermetastasen auf Expression von Hif-1α. Zum einen wiesen sie nach, dass die Expressionsmuster in Primärtumoren und Metastasen übereinstimmten. Zum anderen identifizierten sie hohe Hif-1α-Expression in Lebermetastasen als unabhängigen Risikofaktor für ein Rezidiv nach kurativer Tumorresektion. Für hohe Hif-1α-Expression in den Primärtumoren konnte dies nicht gezeigt werden (Malfettone et al., 2012; Shimomura et al., 2013). Auch Rajaganeshan et al. dokumentierten in 55 Primärtumoren und deren gepaarten Lebermetastasen übereinstimmende Expressionsmuster (Rajaganeshan et al., 2009).

Malfettone et al. verglichen ebenfalls Primärtumore und Metastasen (Lymphknoten und Leber), allerdings handelte es sich nicht um korrespondierende Metastasen. Auch sie konnten jeweils ähnliche Expressionsmuster für Hif-1α nachweisen (Malfettone et al., 2012).

Des Weiteren konnte die hier vorliegende Arbeit keinen Zusammenhang zwischen der Hif-1α-Expression in den Lymphknotenmetastasen und dem Überleben feststellen, ebensowenig wurde eine Korrelation zwischen der Hif-1α-Expression in den Primärtumoren und dem Überleben nachgewiesen (Reinwald, 2010).

Die nachfolgend zitierten Arbeiten verdeutlichen jedoch, dass es sich bei Hif-1α um einen Biomarker handelt, der beim kolorektalen Karzinom von Bedeutung für den Erkankungsverlauf ist und weitere Studien einschließlich Untersuchung korrespondierender Metastasen rechtfertigt.

Cao et al. korrelierten hohe Hif-1α-Expression im kolorektalen Karzinom mit schlechteren 5-Jahres-Überlebensraten und identifizierten Hif-1α als unabhängigen Prognosefaktor (Cao et al., 2009). Und auch die Metaanalyse von Chen et al. wies für Hif-1α-Überexpression einen signifikanten Zusammenhang mit erhöhtem Mortalitätsrisiko im Sinne kürzeren Gesamtüberlebens und verringerten rezidivfreien Überlebens nach (Chen et al., 2013).

4.7 Survivin und XIAP

Survivin war in der hier vorliegenden Arbeit in 98% der untersuchten Lymphknotenmetastasen nachweisbar, XIAP in 87,5% der Fälle. Die Korrelation mit der Expression in den Primärtumoren konnte nicht untersucht werden, da diese beiden Proteine in diesen nicht untersucht worden waren (Luczak, 2010; Reinwald, 2010). Eine Assoziation mit dem Überleben konnte für keinen der beiden Marker nachgewiesen werden.

Beim kolorektalen Karzinom tragen der Einbruch ins Lymphgefäßsystem und die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen wesentlich zur Prognose der Patienten bei. Die Identifizierung von Markern, die hieran beteiligt sind und somit potentiell einer Therapie zugänglich wären, ist zentraler Aspekt vieler Studien (Royston and Jackson, 2009).

Dass Survivin und XIAP in einer so hohen Anzahl der Lymphknotenmetastasen nachweisbar waren, ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass diese molekularen Marker eine wichtige Rolle bei der Metastasierung in lymphatisches Gewebe spielen. Primärtumoren mit Expression von Survivin oder XIAP neigen eventuell eher zu Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Dies wiederum könnte wichtig sein sowohl für die Prognose als auch für die Entwicklung individualisierter therapeutischer Regimes.

Die Metaanalyse von Huang et al. (inkludiert wurden nur Studien, die Survivin mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen hatten) zeigte, dass die Survivin-Expression mit Metastasierung in Lymphknoten assoziiert war und signifikant das Überleben vorhersagte (sowohl overall-survival als auch disease-free-survival) (Huang et al., 2013).

Auch Chu et al. konnten eine hohe Survivin-Expression als unabhängigen Prädiktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom identifizieren (Chu et al., 2012).

Die auf molekulargenetischen Methoden basierende Arbeit von Hori et al. identifizierte Survivin ebenfalls als prädiktiven Biomarker für Metastasierung in Lymphknoten (Hori et al., 2013).

Obwohl einzelne Arbeiten keinen Zusammenhang zwischen der Survivin-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Chen et al., 2004) und keine

prognostische Relevanz nachweisen konnten (Kalliakmanis et al., 2010), gelingt dies doch der überwiegenden Anzahl der gesichteten Studien.

Im Unterschied zur Studienlage bezüglich Survivin gibt es nur einzelne Arbeiten, die XIAP hinsichtlich einer Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren wie der Metastasierung in Lymphknoten oder dem Einfluss auf das Überleben hin analysieren. Xiang et al. konnten keine Korrelation zwischen der XIAP-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen nachweisen (immunhistochemische Untersuchung von 96 Gewebeproben kolorektaler Karzinome auf XIAP-Expression). Allerdings wiesen Patienten mit starker Expression von XIAP eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit auf (Xiang et al., 2009).

XIAP konnte bei Li et al. ebenfalls nicht mit der Metastasierung in Lymphknoten in Verbindung gebracht werden (Li et al., 2007).

Es ist erstaunlich, dass bisher nur so wenige Arbeiten durchgeführt wurden, die das Ziel hatten, XIAP hinsichtlich prognostischer Aussagekraft zu analysieren. Denn XIAP gilt als das IAP, welches Caspasen am stärksten inhibieren kann (De Oliveira Lima et al., 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass XIAP-Expression im kolorektalen Karzinom mit Resistenz gegen Radiochemotherapie assoziiert ist (Hehlgans et al., 2013; Moussata et al., 2012). Therapeutische Strategien, um die Expression von XIAP zu unterbrechen, sind bereits in einer Vielzahl von Studien untersucht worden, wie bereits unter 1.4.3 erläutert. In Anbetracht dieser Fülle von Arbeiten, die sich mit der therapeutischen Nutzbarkeit von XIAP beschäftigen, scheint also wenig Zweifel daran zu bestehen, dass dieser Marker äußerst relevant für das kolorektale Karzinom ist. Weitere Studien sind nötig, um XIAP als unabhängigen Prognosefaktor zu identifizieren.

4.8 Smac/DIABLO

Smac/DIABLO war in der hier vorliegenden Arbeit in 100% der Lymphknotenmetastasen nachweisbar. Die Untersuchung der Korrelation mit der Expression in den Primärtumoren war nicht möglich, da Smac/DIABLO in diesen nicht untersucht worden war (Luczak, 2010; Reinwald, 2010). Eine Assoziation mit dem Überleben konnte nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits unter 1.5 erläutert, ist Smac/DIABLO ein Gegenspieler der IAP`s, indem es die Hemmung der Caspasen antagonisiert und dadurch die Apoptose fördert. In den bereits angeführten Studien von Endo et al. und Huerta et al. war das Vorliegen von

Smac/DIABLO assoziiert mit seltenerem Auftreten von Lymphknotenmetasen und besserem Ansprechen auf Chemotherapie (Endo et al., 2009; Huerta et al., 2007).
Die Tatsache, dass Smac/DIABLO in der hier vorliegenden Arbeit in allen Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnte, scheint hierzu im Gegensatz zu stehen. Hinsichtlich der unter 1.5 beschriebenen Funktionen dieses Proteins läge die Hypothese, Lymphknotenmetastasen exprimierten weniger Smac/DIABLO, näher. Auch Qiu et al. wiesen in ihrer Arbeit nach, dass die Expression von Smac/DIABLO im Rahmen der Tumorprogression abnimmt. Untersucht wurden Gewebeproben normaler Mukosa und kolorektaler Karzinome mittels Immunhistochemie. Während Smac/DIABLO in 100% normaler Kolonmukosa nachweisbar war, nahm dies mit fortschreitendem Tumorgrad ab (85,2% G1, 79,8% G2, 61% G3, 34,6% G4) (Qiu et al., 2013). Krajewska et al. hingegen wiesen in Stadium II Karzinomen höhere Expressionsraten für Smac/DIABLO nach als in normaler Kolonmukosa (106 Gewebeproben, immunhistochemische Auswertung) (Krajewska et al., 2005).
Auch bezüglich der Frage, ob Smac/DIABLO zukünftig als prognostischer Marker gewertet werden kann, besteht weiterer Bedarf an Studien. Hector et al. konnten in ihrer Arbeit keine Korrelation zwischen Smac/DIABLO-Expression und Überlebensraten nachweisen (immunhistochemische Auswertung von 224 Gewebeproben Stadium II und III Karzinome) (Hector et al., 2012), wohingegen Krajewska et al. eine signifikante Korrelation zwischen niedriger Smac/DIABLO-Expression und verringertem Gesamtüberleben beobachteten (Krajewska et al., 2005).
Interessant wäre beispielsweise zum einen der Vergleich mit der Expression von Smac/DIABLO im korrespondierenden Primärtumor. Zum anderen wäre interessant, ob kolorektale Karzinome mit Smac/DIABLO-positiven Lymphknotenmetastasen besser auf Chemotherapie ansprechen als solche mit Smac/DIABLO-negativen Lymphknotenmetastasen.

4.9 VEGF, Survivin und XIAP

In 46% aller Fälle waren VEGF, Survivin und XIAP in identischer Ausprägung in den hier beurteilten Lymphknotenmetastasen nachweisbar. Eine Einordnung dieses Ergebnisses ist schwierig. Vergleichbare Arbeiten, in denen alle drei Marker mittels immunhistochemischer Methoden hinsichtlich ihrer Expression untersucht wurden, sind

bisher nicht durchgeführt worden. Eine Interpretation des in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisses kann demnach nur näherungsweise erfolgen.

In der Arbeit von Choi et al. konnte keine Assoziation zwischen VEGF und Survivin nachgewiesen werden (basierend auf immunhistochemischer Auswertung von 37 Gewebeproben kolorektaler Karzinome) (Choi and Chang, 2012), anders als bei Yang et al.. In deren Arbeit korrelierte die Expression dieser beiden Marker signifikant miteinander (basierend auf immunhistochemischer Auswertung von 91 Gewebeproben kolorektaler Primärtumore) (Yang et al., 2005). Es gibt weitere Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen VEGF und Survivin herstellen konnten. Schon 1999 wiesen Tran et al. nach, dass VEGF die Induktion und Verstärkung sowohl von Survivin als auch von XIAP bedingen kann (Tran et al., 1999). Auch O`Connor et al. konnten zeigen, dass die VEGF-gesteuerte Induktion von Survivin zu angiogenetischen Prozessen führt (O'Connor et al., 2000b).

De Oliveira et al. korrelierten die Expression von Survivin und XIAP miteinander (basierend auf immunhistochemischer Auswertung von 130 Gewebeproben kolorektaler Primärtumore) und fanden hierbei einen signifikanten Zusammenhang (De Oliveira Lima et al., 2009). Dieses Ergebnis erscheint aufgrund der Zugehörigkeit beider Marker zu der IAP-Familie nicht verwunderlich. Mehrere Arbeiten haben bereits die enge Verbindung der beiden Proteine nachgewiesen (Dohi et al., 2004; Hehlgans et al., 2013; Mehrotra et al., 2010). Dohi et al. wies zum Beispiel nach, dass Survivin und XIAP einen Heterokomplex bilden können. Hierdurch erhöht sich die Stabilität von XIAP gegen Abbau im Proteasom und es kommt zu synergistischer Inhibierung von Caspase 9. Zellen waren so in der Lage, Apoptose zu entgehen (Dohi et al., 2004). Mehrotra et al. wiesen in ihrer Arbeit nach, dass intermolekulare Kooperation zwischen Survivin und XIAP assoziiert war mit Tumorzellinvasion und Metastasierung (Mehrotra et al., 2010). Hehlgans et al. untersuchten dies auf potentiellen therapeutischen Nutzen. Double knockdown von Survivin und XIAP resultierte hier in Apoptose, gesteigerter Radiosensitivität und verringerter Migrationsaktivität der Zellen (Hehlgans et al., 2013). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, deutet vieles darauf hin, dass eine Assoziation zwischen VEGF und sowohl Survivin als auch XIAP besteht. Möglicherweise ist die hier erhobene identische Expression in den Lymphknotenmetastasen Ausdruck dessen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im klinischen Alltag wird immer wieder beobachtet, dass das Vorliegen identischer Tumorstadien und der Erhalt derselben therapeutischen Regimes bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen nicht selbstverständlich zu vergleichbarem Ansprechen führt. Mögliche Gründe hierfür stehen im Zentrum klinischer Forschung. Wesentlich hierbei ist die Untersuchung von Biomarkern und deren Identifizierung als unabhängige prädiktive Faktoren und Prognosefaktoren zur individuellen Risikoabschätzung und gezielter Patientenselektion im Rahmen der Therapieentscheidung.

Bei der Literaturrecherche fällt auf, dass in der Mehrheit der gesichteten Arbeiten unterschiedliche Biomarker im Primärtumor untersucht wurden und dann beispielsweise die Korrelation mit klinisch-pathologischen Faktoren erfolgte. Wenige Studien beschäftigen sich mit der Untersuchung von Primärtumoren und ihren korrespondierenden Metastasen.

In der vorliegenden Arbeit konnte herausgestellt werden, dass es besonders im Hinblick auf Hif-1α, XIAP und Smac/DIABLO nur vereinzelte Arbeiten gibt, die sich mit dieser Thematik beschäftigt haben.

Alle drei Marker wurden bereits unabhängig voneinander in einen Zusammenhang mit der Metastasierung in Lymphknoten gebracht. Das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen gilt als der wichtigste Prognosefaktor für das Überleben beim kolorektalen Karzinom. Vor diesem Hintergrund erscheint die Untersuchung metastatisch befallener Lymphknoten und ihre Korrelation mit dem Primärtumor hinsichtlich des vorliegenden Markerprofils von essentieller Bedeutung.

K-ras wurde im Vergleich zu den drei obigen Proteinen sehr häufig untersucht, jedoch fand sich keine Arbeit, die auf immunhistochemischen Methoden basierte. Bezüglich PTEN konnte gezeigt werden, dass Bedarf an einheitlichem Scoring bei der Auswertung immunhistochemischer Verfahren besteht, um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen zu optimieren. Es gibt also noch viele Angriffspunkte, um präzise Markerprofile zu erstellen. Mit diesen könnten bessere Kriterien entwickelt werden, um Patienten gezielt für Therapien auszuwählen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Biomarker EGFR, K-Ras, VEGF und Hif-1α in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen signifikant miteinander korreliert. Besonderes hinsichtlich von

K-ras handelt es sich um die erste Arbeit, die dieses Protein mittels Immunhistochemie in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen untersucht.
Ein Zusammenhang mit der Überlebenswahrscheinlichkeit konnte zwar für keinen der Marker nachgewiesen werden, eventuell wäre hier aber die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs aussagekräftiger.
Des Weiteren wurde in 46% der Lymphknotenmetastasen eine Ko-expression von VEGF, Survivin und XIAP beobachtet. Interessant ist hierbei insbesondere, dass Survivin und XIAP beide zur IAP-Familie gehören und ihre antiapoptotische Wirkung durch ähnliche Wege der Signaltransduktion vermitteln. Dieses Ergebnis weist auf vielversprechende weitere Forschungsmöglichkeiten hin. Beispielsweise sollte der Einfluss dieser Ko-expression auf klinisch-pathologische Faktoren und das Überleben analysiert werden. Bezugnehmend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die aktuelle Studienlage erscheint es weiterhin sinnvoll, nicht nur die Metastasen, sondern ebenfalls die Primärtumore auf eine Ko-expression hin zu untersuchen. Dies wäre im Besonderen der Fall, wenn für das kolorektale Karzinom Therapeutika an Relevanz gelangen würden, die gegen Survivin und XIAP gerichtet sind.
Wie unter 1.4.2 und 1.4.3 bereits erläutert, wird bereits intensiv nach Möglichkeiten geforscht, um in die von Survivin und XIAP vermittelten Signalwege einzugreifen. Mit immunhistochemischen Methoden wurden diese beiden Marker bisher jedoch immer getrennt voneinander untersucht.
Auch die Ko-expression von VEGF könnte hier von Bedeutung sein. Wie unter 1.6.2. erläutert, kann VEGF die Induktion von Survivin bewirken. Das hier beobachtete Ergebnis ihrer Ko-expression deutet möglicherweise darauf hin, dass die Expression von VEGF regelhaft mit der Expression von Survivin einhergeht und so auch Einfluss auf das Therapieansprechen hat.
Die trotz scheinbar analoger Bedingungen häufig sehr unterschiedlichen klinischen Verläufe kolorektaler Karzinompatienten ließen sich durch weiterführende Forschung also möglicherweise besser erschließen. Die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse implizieren, dass die Untersuchung von Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen und auch die Ko-expression von Markern in einer Tumorentität von besonderer Bedeutung sein können.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

Abd El All, H., A. Mishriky, and F. Mohamed, 2008, Epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma: correlation with clinico-pathological prognostic factors.: Colorectal Dis, v. 10, p. 170-8.

Akagi, K., Y. Ikeda, M. Miyazaki, T. Abe, J. Kinoshita, Y. Maehara, and K. Sugimachi, 2000, Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues: Br J Cancer, v. 83, p. 887-91.

Alberts, D., 2002, Reducing the risk of colorectal cancer by intervening in the process of carcinogenesis: a status report.: Cancer J, v. 8, p. 208-21.

Altieri, D., 2004, Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm.: J Cell Biochem, v. 92, p. 656-63.

Altieri, D. C., 2010, Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms.: Biochem J, v. 430, p. 199-205.

Amado, R. G., M. Wolf, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, T. Juan, R. Sikorski, S. Suggs, R. Radinsky, S. D. Patterson, and D. D. Chang, 2008, Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer: J Clin Oncol, v. 26, p. 1626-34.

Anderson, S. M., 2011, Laboratory methods for KRAS mutation analysis: Expert Rev Mol Diagn, v. 11, p. 635-42.

Andreyev, H. J., A. R. Norman, D. Cunningham, J. R. Oates, and P. A. Clarke, 1998, Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study.: J Natl Cancer Inst, v. 90, p. 675-84.

Artale, S., A. Sartore-Bianchi, S. M. Veronese, V. Gambi, C. S. Sarnataro, M. Gambacorta, C. Lauricella, and S. Siena, 2008, Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer: J Clin Oncol, v. 26, p. 4217-9.

Arteaga, C. L., 2002, Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia: Semin Oncol, v. 29, p. 3-9.

Atreya, C. E., Z. Sangale, N. Xu, M. R. Matli, E. Tikishvili, W. Welbourn, S. Stone, K. M. Shokat, and R. S. Warren, 2013, PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival: Cancer Med, v. 2, p. 496-506.

Baas, J. M., L. L. Krens, H. J. Guchelaar, H. Morreau, and H. Gelderblom, 2011, Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review: Oncologist, v. 16, p. 1239-49.

Baldus, S. E., K. L. Schaefer, R. Engers, D. Hartleb, N. H. Stoecklein, and H. E. Gabbert, 2010, Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases: Clin Cancer Res, v. 16, p. 790-9.

Bank, A., P. Wang, C. Du, J. Yu, and L. Zhang, 2008, SMAC mimetics sensitize nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis by promoting caspase-3-mediated cytochrome c release.: Cancer Res, v. 68, p. 276-84.

Barbier, A., J. Domont, N. Magné, J. L. Goldmard, C. Genestie, C. Hannoun, J. C. Vaillant, A. Bellanger, D. Khayat, F. Capron, and J. P. Spano, 2010, Coexpression of biological key modulators in primary colorectal carcinomas and related metastatic sites: implications for treatment with cetuximab: Bull Cancer, v. 97, p. E9-E15.

Bendardaf, R., A. Buhmeida, M. Hilska, M. Laato, S. Syrjänen, K. Syrjänen, Y. Collan, and S. Pyrhönen, 2008, VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival.: Anticancer Res, v. 28, p. 3865-70.

Benvenuti, S., A. Sartore-Bianchi, F. Di Nicolantonio, C. Zanon, M. Moroni, S. Veronese, S. Siena, and A. Bardelli, 2007, Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies: Cancer Res, v. 67, p. 2643-8.

Berney, C. R., J. L. Yang, R. J. Fisher, P. J. Russell, and P. J. Crowe, 1998, Vascular endothelial growth factor expression is reduced in liver metastasis from colorectal cancer and correlates with urokinase-type plasminogen activator: Anticancer Res, v. 18, p. 973-7.

Blanc-Brude, O., M. Mesri, N. Wall, J. Plescia, T. Dohi, and D. Altieri, 2003, Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis.: Clin Cancer Res, v. 9, p. 2683-92.

Bokemeyer, C., I. Bondarenko, A. Makhson, J. T. Hartmann, J. Aparicio, F. de Braud, S. Donea, H. Ludwig, G. Schuch, C. Stroh, A. H. Loos, A. Zubel, and P. Koralewski, 2009, Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: J Clin Oncol, v. 27, p. 663-71.

Bralet, M. P., B. Paule, R. Adam, and C. Guettier, 2005, Loss of epidermal growth factor receptor expression in lymph node and liver metastases of colon carcinoma.: J Clin Oncol, v. 23, p. 5844; author reply 5844-5.

Brenner, H., M. Hoffmeister, and U. Haug, 2008, Should colorectal cancer screening start at the same age in European countries? Contributions from descriptive epidemiology.: Br J Cancer, v. 99, p. 532-5.

Böcker, W., H. Denk, P. U. Heitz, and H. Moch, 2008, Pathologie, v. 4, Urban und Fischer Verlag/ Elsevier GmbH, 1362 p.

Campos, F., A. Logullo Waitzberg, D. Kiss, D. Waitzberg, A. Habr-Gama, and J. Gama-Rodrigues, 2005, Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention.: Nutr Hosp, v. 20, p. 18-25.

Cao, D., M. Hou, Y. Guan, M. Jiang, Y. Yang, and H. Gou, 2009, Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications.: BMC Cancer, v. 9, p. 432.

Carmeliet, P., 2005, VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer.: Oncology, v. 69 Suppl 3, p. 4-10.

Carracedo, A., and P. P. Pandolfi, 2008, The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks.: Oncogene, v. 27, p. 5527-41.

Casati, C., P. Dalerba, L. Rivoltini, G. Gallino, P. Deho, F. Rini, F. Belli, D. Mezzanzanica, A. Costa, S. Andreola, E. Leo, G. Parmiani, and C. Castelli, 2003, The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients.: Cancer Res, v. 63, p. 4507-15.

Castagnola, P., and W. Giaretti, 2005, Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: Biochim Biophys Acta, v. 1756, p. 115-25.

Cerottini, J. P., S. Caplin, E. Saraga, J. C. Givel, and J. Benhattar, 1998, The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer.: Am J Surg, v. 175, p. 198-202.

Chang, J. C., G. Y. Zhu, J. L. Yang, H. Zhang, and D. B. Wang, 2011, [Association of hypoxia-inducible factor 1α expression with microlymphatic vessel density and lymph node micrometastasis in rectal cancer]: Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, v. 14, p. 284-7.

Chen, W., Q. Liu, J. Fu, and S. Kang, 2004, Expression of survivin and its significance in colorectal cancer.: World J Gastroenterol, v. 10, p. 2886-9.

Chen, Z., X. He, W. Xia, Q. Huang, Z. Zhang, J. Ye, C. Ni, P. Wu, D. Wu, J. Xu, F. Qiu, and J. Huang, 2013, Prognostic value and clinicopathological differences of HIFs in colorectal cancer: evidence from meta-analysis: PLoS One, v. 8, p. e80337.

Choi, J., and H. Chang, 2012, The expression of MAGE and SSX, and correlation of COX2, VEGF, and survivin in colorectal cancer: Anticancer Res, v. 32, p. 559-64.

Choi, Y., M. S. Roh, Y. S. Hong, H. S. Lee, and W. J. Hur, 2011, Interleukin-24 is correlated with differentiation and lymph node numbers in rectal cancer: World J Gastroenterol, v. 17, p. 1167-73.

Chu, X. Y., L. B. Chen, J. H. Wang, Q. S. Su, J. R. Yang, Y. Lin, L. J. Xue, X. B. Liu, and X. B. Mo, 2012, Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer: J Surg Oncol, v. 105, p. 520-8.

Ciardiello, F., and G. Tortora, 2008, EGFR antagonists in cancer treatment: N Engl J Med, v. 358, p. 1160-74.

Colakoglu, T., S. Yildirim, F. Kayaselcuk, T. Z. Nursal, A. Ezer, T. Noyan, H. Karakayali, and M. Haberal, 2008, Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence?: Am J Surg, v. 195, p. 719-25.

Conlin, A., G. Smith, F. A. Carey, C. R. Wolf, and R. J. Steele, 2005, The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma.: Gut, v. 54, p. 1283-6.

Cross, A., and R. Sinha, 2004, Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer.: Environ Mol Mutagen, v. 44, p. 44-55.

Cunningham, D., Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau, and E. Van Cutsem, 2004, Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer: N Engl J Med, v. 351, p. 337-45.

Daly, M. E., A. Makris, M. Reed, and C. E. Lewis, 2003, Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment?: J Natl Cancer Inst, v. 95, p. 1660-73.

Dancau, A. M., R. Simon, M. Mirlacher, and G. Sauter, 2010, Tissue microarrays: Methods Mol Biol, v. 576, p. 49-60.

De Oliveira Lima, F., H. De Oliveira Costa, L. Barrezueta, C. Fujiyama Oshima, J. J. Silva, T. Gomes, N. J. Pinheiro, R. Neto, and M. Franco, 2009, Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis.: Oncol Rep, v. 22, p. 295-303.

Dean, E., M. Ranson, F. Blackhall, and C. Dive, 2007, X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target.: Expert Opin Ther Targets, v. 11, p. 1459-71.

Deng, Y., B. F. Kurland, J. Wang, J. Bi, W. Li, S. Rao, P. Lan, T. Lin, and E. Lin, 2009, High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor.: Am J Clin Oncol, v. 32, p. 245-52.

Des Guetz, G., B. Uzzan, P. Nicolas, M. Cucherat, J. Morere, R. Benamouzig, J. Breau, and G. Perret, 2006, Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature.: Br J Cancer, v. 94, p. 1823-32.

Dhir, R., 2008, Tissue microarrays: an overview: Methods Mol Biol, v. 441, p. 91-103.

Dicuonzo, G., S. Angeletti, J. Garcia-Foncillas, A. Brugarolas, Y. Okrouzhnov, D. Santini, G. Tonini, G. Lorino, M. De Cesaris, and A. Baldi, 2001, Colorectal carcinomas and PTEN/MMAC1 gene mutations: Clin Cancer Res, v. 7, p. 4049-53.

Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. Salvesen, J. Reed, and D. Altieri, 2004, An IAP-IAP complex inhibits apoptosis.: J Biol Chem, v. 279, p. 34087-90.

Duff, S. E., M. Jeziorska, D. D. Rosa, S. Kumar, N. Haboubi, D. Sherlock, S. T. O'Dwyer, and G. C. Jayson, 2006, Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy: Eur J Cancer, v. 42, p. 112-7.

Díaz-Rubio, E., and H. Schmoll, 2005, Introduction. Critical role of anti-angiogenesis and VEGF inhibition in colorectal cancer.: Oncology, v. 69 Suppl 3, p. 1-3.

Ellis, C. A., and G. Clark, 2000, The importance of being K-Ras: Cell Signal, v. 12, p. 425-34.

Elsabah, M. T., and I. Adel, 2013, Immunohistochemical assay for detection of K-ras protein expression in metastatic colorectal cancer: J Egypt Natl Canc Inst, v. 25, p. 51-6.

Endo, K., S. Kohnoe, A. Watanabe, H. Tashiro, H. Sakata, M. Morita, Y. Kakeji, and Y. Maehara, 2009, Clinical significance of Smac/DIABLO expression in colorectal cancer.: Oncol Rep, v. 21, p. 351-5.

Fan, L., W. Dong, C. Jiang, Q. Qian, and Q. Yu, 2008, Role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha and Survivin in colorectal carcinoma progression.: Int J Colorectal Dis, v. 23, p. 1057-64.

Fandrey, and Joachim, 2007, Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1: www.biospektrum.de, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, p. 26-28.

Ferrara, N., 2005, VEGF as a therapeutic target in cancer.: Oncology, v. 69 Suppl 3, p. 11-6.

Ferrara, N., H. Gerber, and J. LeCouter, 2003, The biology of VEGF and its receptors.: Nat Med, v. 9, p. 669-76.

Floriani, I., D. Santini, V. Torri, C. Cremolini, A. Falcone, and F. Loupakis, 2009, Do we need biopsies of metastases for colorectal cancer patients?: Br J Cancer, v. 101, p. 374-5; author reply 376.

Fortugno, P., E. Beltrami, J. Plescia, J. Fontana, D. Pradhan, P. Marchisio, W. Sessa, and D. Altieri, 2003, Regulation of survivin function by Hsp90.: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, p. 13791-6.

Franklin, W. A., J. Haney, M. Sugita, L. Bemis, A. Jimeno, and W. A. Messersmith, 2010, KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer: J Mol Diagn, v. 12, p. 43-50.

Frattini, M., P. Saletti, E. Romagnani, V. Martin, F. Molinari, M. Ghisletta, A. Camponovo, L. L. Etienne, F. Cavalli, and L. Mazzucchelli, 2007, PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients: Br J Cancer, v. 97, p. 1139-45.

Friday, B. B., and A. A. Adjei, 2005, K-ras as a target for cancer therapy.: Biochim Biophys Acta, v. 1756, p. 127-44.

Funaki, H., G. Nishimura, S. Harada, I. Ninomiya, I. Terada, S. Fushida, T. Tani, T. Fujimura, M. Kayahara, K. Shimizu, T. Ohta, and K. Miwa, 2003, Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma: Oncology, v. 64, p. 416-22.

Geido, E., A. Sciutto, A. Rubagotti, C. Oliani, R. Monaco, M. Risio, and W. Giaretti, 2002, Combined DNA flow cytometry and sorting with k-ras2 mutation spectrum analysis and the prognosis of human sporadic colorectal cancer.: Cytometry, v. 50, p. 216-24.

Gerlinger, M., A. J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N. Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C. R. Santos, M. Nohadani, A. C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P. A. Futreal, and C. Swanton, 2012, Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing: N Engl J Med, v. 366, p. 883-92.

Giantonio, B. J., P. J. Catalano, N. J. Meropol, P. J. O'Dwyer, E. P. Mitchell, S. R. Alberts, M. A. Schwartz, A. B. Benson, and E. C. O. G. S. E3200, 2007, Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200: J Clin Oncol, v. 25, p. 1539-44.

Goldstein, N. S., and M. Armin, 2001, Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system.: Cancer, v. 92, p. 1331-46.

Guanti, G., N. Resta, C. Simone, F. Cariola, I. Demma, P. Fiorente, and M. Gentile, 2000, Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis: Hum Mol Genet, v. 9, p. 283-7.

Gupta, R. A., R. N. DuBois, and M. C. Wallace, 2002, New avenues for the prevention of colorectal cancer: targeting cyclo-oxygenase-2 activity: Best Pract Res Clin Gastroenterol, v. 16, p. 945-56.

Han, C. B., F. Li, J. T. Ma, and H. W. Zou, 2012, Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens: a meta-analysis and systematic review: Cancer Invest, v. 30, p. 741-7.

Hanrahan, V., M. J. Currie, S. P. Gunningham, H. R. Morrin, P. A. Scott, B. A. Robinson, and S. B. Fox, 2003, The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression: J Pathol, v. 200, p. 183-94.

Hayashi, H., T. Arao, K. Matsumoto, H. Kimura, Y. Togashi, Y. Hirashima, Y. Horita, S. Iwasa, N. T. Okita, Y. Honma, A. Takashima, K. Kato, T. Hamaguchi, Y. Shimada, K. Nakagawa, K. Nishio, and Y. Yamada, 2014, Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma: Oncotarget, v. 5, p. 2588-95.

Hector, S., S. Conlon, J. Schmid, P. Dicker, R. J. Cummins, C. G. Concannon, P. G. Johnston, E. W. Kay, and J. H. Prehn, 2012, Apoptosome-dependent caspase activation proteins as prognostic markers in Stage II and III colorectal cancer: Br J Cancer, v. 106, p. 1499-1505.

Hehlgans, S., C. Petraki, S. Reichert, N. Cordes, C. Rödel, and F. Rödel, 2013, Double targeting of Survivin and XIAP radiosensitizes 3D grown human colorectal tumor cells and decreases migration: Radiother Oncol, v. 108, p. 32-9.

Herbst, R. S., 2004, Review of epidermal growth factor receptor biology.: Int J Radiat Oncol Biol Phys, v. 59, p. 21-6.

Hiddemann, W., H. Huber, and C. R. Bartram, 2004, Die Onkologie, v. 1, Springer Verlag, 2051 p.

Hong, L., Y. Han, H. Zhang, Q. Zhao, J. Yang, and N. Ahuja, 2013, High expression of epidermal growth factor receptor might predict poor survival in patients with colon cancer: a meta-analysis: Genet Test Mol Biomarkers, v. 17, p. 348-51.

Hori, M., T. Miki, M. Okamoto, F. Yazama, H. Konishi, H. Kaneko, F. Shimamoto, T. Ota, A. Temme, and M. Tatsuka, 2013, The detergent-soluble cytoplasmic pool of survivin suppresses anoikis and its expression is associated with metastatic disease of human colon cancer: PLoS One, v. 8, p. e55710.

Huang, Y. J., W. X. Qi, A. N. He, Y. J. Sun, Z. Shen, and Y. Yao, 2013, The prognostic value of survivin expression in patients with colorectal carcinoma: a meta-analysis: Jpn J Clin Oncol, v. 43, p. 988-95.

Huerta, S., J. Heinzerling, Y. Anguiano-Hernandez, S. Huerta-Yepez, J. Lin, D. Chen, B. Bonavida, and E. Livingston, 2007, Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF.: J Surg Res, v. 142, p. 184-94.

Hung, K., and D. Chung, 2006, New insights into the molecular pathogenesis of colorectal cancer.: Drug Discov Today Dis Mech, v. 3, p. 439.

Hurwitz, H. I., L. Fehrenbacher, J. D. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, E. Holmgren, J. Hambleton, W. F. Novotny, and F. Kabbinavar, 2005, Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer: J Clin Oncol, v. 23, p. 3502-8.

Jang, K. S., Y. S. Song, S. H. Jang, K. W. Min, W. Na, S. M. Jang, Y. J. Jun, K. H. Lee, D. Choi, and S. S. Paik, 2010, Clinicopathological significance of nuclear PTEN expression in colorectal adenocarcinoma.: Histopathology, v. 56, p. 229-39.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, 2011, Global cancer statistics: CA Cancer J Clin, v. 61, p. 69-90.

Jhawer, M., S. Goel, A. J. Wilson, C. Montagna, Y. H. Ling, D. S. Byun, S. Nasser, D. Arango, J. Shin, L. Klampfer, L. H. Augenlicht, R. Perez-Soler, R. P. Soler, and J. M. Mariadason, 2008, PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab: Cancer Res, v. 68, p. 1953-61.

Jiang, C., L. Fan, Z. Liu, Q. Qian, D. Xia, L. Diao, Y. He, and Z. Ai, 2004, Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma.: Chin Med J (Engl), v. 117, p. 1541-6.

Jin, K., H. Lan, F. Cao, N. Han, Z. Xu, G. Li, K. He, and L. Teng, 2012, Differential response to EGFR- and VEGF-targeted therapies in patient-derived tumor tissue xenograft models of colon carcinoma and related metastases: Int J Oncol, v. 41, p. 583-8.

Kalliakmanis, J. G., C. Kouvidou, C. Latoufis, G. Kouvatseas, D. Anagnostakis, G. Papatheodoridis, J. Koskinas, and A. Archimandritis, 2010, Survivin expression in colorectal carcinomas: correlations with clinicopathological parameters and survival: Dig Dis Sci, v. 55, p. 2958-64.

Kameshima, H., T. Tsuruma, T. Torigoe, A. Takahashi, Y. Hirohashi, Y. Tamura, T. Tsukahara, S. Ichimiya, T. Kanaseki, Y. Iwayama, N. Sato, and K. Hirata, 2011, Immunogenic enhancement and clinical effect by type-I interferon of anti-apoptotic protein, survivin-derived peptide vaccine, in advanced colorectal cancer patients: Cancer Sci, v. 102, p. 1181-7.

Karameris, A., P. Kanavaros, D. Aninos, V. Gorgoulis, G. Mikou, T. Rokas, M. Niotis, and N. Kalogeropoulos, 1993, Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases.: Pathol Res Pract, v. 189, p. 133-7.

Karamitopoulou, E., I. Zlobec, A. Koumarianou, E. S. Patsouris, G. Peros, and A. Lugli, 2010, Expression of p16 in lymph node metastases of adjuvantly treated stage III colorectal cancer patients identifies poor prognostic subgroups: a retrospective analysis of biomarkers in matched primary tumor and lymph node metastases.: Cancer, v. 116, p. 4474-86.

Karin, M., and A. Lin, 2002, NF-kappaB at the crossroads of life and death.: Nat Immunol, v. 3, p. 221-7.

Karoui, M., C. Tresallet, A. Brouquet, H. Radvanyi, and C. Penna, 2007, [Colorectal carcinogenesis. 1. Hereditary predisposition and colorectal cancer]: J Chir (Paris), v. 144, p. 13-8.

Keller, J. J., and F. M. Giardiello, 2003, Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors: Cancer Biol Ther, v. 2, p. S140-9.

Kondo, Y., S. Arii, A. Mori, M. Furutani, T. Chiba, and M. Imamura, 2000, Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line.: Clin Cancer Res, v. 6, p. 622-30.

Krajewska, M., H. Kim, C. Kim, H. Kang, K. Welsh, S. Matsuzawa, M. Tsukamoto, R. G. Thomas, N. Assa-Munt, Z. Piao, K. Suzuki, M. Perucho, S. Krajewski, and J. C. Reed, 2005, Analysis of apoptosis protein expression in early-stage colorectal cancer suggests opportunities for new prognostic biomarkers: Clin Cancer Res, v. 11, p. 5451-61.

Krasinskas, A. M., 2011, EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma.: Patholog Res Int, v. 2011, p. 932932.

Krebsregister Deutschland, R.-K.-I., 2012, Krebs in Deutschland 2007/2008 Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

LaCasse, E., D. Mahoney, H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird, and R. Korneluk, 2008, IAP-targeted therapies for cancer.: Oncogene, v. 27, p. 6252-75.

Laughner, E., P. Taghavi, K. Chiles, P. C. Mahon, and G. L. Semenza, 2001, HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression: Mol Cell Biol, v. 21, p. 3995-4004.

Lewis, J., E. Burstein, S. Reffey, S. Bratton, A. Roberts, and C. Duckett, 2004, Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis.: J Biol Chem, v. 279, p. 9023-9.

Li, B., Y. D. Zhang, and B. N. Tian, 2007, [Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in colorectal cancer tissues]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, v. 27, p. 1746-8.

Liu, X., M. Jakubowski, and J. L. Hunt, 2011, KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis: Am J Clin Pathol, v. 135, p. 245-52.

Loupakis, F., G. Bocci, G. Pasqualetti, L. Fornaro, L. Salvatore, C. Cremolini, G. Masi, R. Danesi, M. Del Tacca, and A. Falcone, 2010, Targeting vascular endothelial growth factor pathway in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: state-of-the-art and future perspectives in clinical and molecular selection of patients.: Curr Cancer Drug Targets, v. 10, p. 37-45.

Loupakis, F., L. Pollina, I. Stasi, A. Ruzzo, M. Scartozzi, D. Santini, G. Masi, F. Graziano, C. Cremolini, E. Rulli, E. Canestrari, N. Funel, G. Schiavon, I. Petrini, M. Magnani, G. Tonini, D. Campani, I. Floriani, S. Cascinu, and A. Falcone, 2009, PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer: J Clin Oncol, v. 27, p. 2622-9.

Luczak, C. M., 2010, Expression von EGF-Rezeptoren und seinen Downstream-Effektoren K-ras und PTEN im kolorektalen Karzinom: Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten und der Prognose, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

MacFarlane, M., W. Merrison, S. Bratton, and G. Cohen, 2002, Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro.: J Biol Chem, v. 277, p. 36611-6.

Madbouly, K. M., A. J. Senagore, A. Mukerjee, C. P. Delaney, J. Connor, and V. W. Fazio, 2007, Does immunostaining effectively upstage colorectal cancer by identifying micrometastatic nodal disease?: Int J Colorectal Dis, v. 22, p. 39-48.

Malfettone, A., N. Silvestris, A. Paradiso, E. Mattioli, G. Simone, and A. Mangia, 2012, Overexpression of nuclear NHERF1 in advanced colorectal cancer: association with hypoxic microenvironment and tumor invasive phenotype: Exp Mol Pathol, v. 92, p. 296-303.

Mariani, P., M. Lae, A. Degeorges, W. Cacheux, E. Lappartient, A. Margogne, J. Y. Pierga, V. Girre, L. Mignot, M. C. Falcou, R. J. Salmon, O. Delattre, and P. De Cremoux, 2010, Concordant analysis of KRAS status in primary colon carcinoma and matched metastasis.: Anticancer Res, v. 30, p. 4229-35.

Markowitz, S., J. D. Hines, J. Lutterbaugh, L. Myeroff, W. Mackay, N. Gordon, Y. Rustum, E. Luna, and J. Kleinerman, 1995, Mutant K-ras oncogenes in colon cancers Do not predict Patient's chemotherapy response or survival: Clin Cancer Res, v. 1, p. 441-5.

McKay, J. A., L. J. Murray, S. Curran, V. G. Ross, C. Clark, G. I. Murray, J. Cassidy, and H. L. McLeod, 2002, Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases.: Eur J Cancer, v. 38, p. 2258-64.

Mehrotra, S., L. R. Languino, C. M. Raskett, A. M. Mercurio, T. Dohi, and D. C. Altieri, 2010, IAP regulation of metastasis: Cancer Cell, v. 17, p. 53-64.

Miglio, U., R. Mezzapelle, A. Paganotti, S. Allegrini, C. Veggiani, J. Antona, S. Gentilli, G. Monga, O. Alabiso, and R. Boldorini, 2013, Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay: Pathol Res Pract, v. 209, p. 233-6.

Molinari, F., V. Martin, P. Saletti, S. De Dosso, A. Spitale, A. Camponovo, A. Bordoni, S. Crippa, L. Mazzucchelli, and M. Frattini, 2009, Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant.: Br J Cancer, v. 100, p. 1087-94.

Morrin, M., M. Kelly, N. Barrett, and P. Delaney, 1994, Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance.: Gut, v. 35, p. 1627-31.

Moussata, D., S. Amara, B. Siddeek, M. Decaussin, S. Hehlgans, R. Paul-Bellon, F. Mornex, J. P. Gerard, P. Romestaing, F. Rödel, B. Flourie, M. Benahmed, and C. Mauduit, 2012, XIAP as a radioresistance factor and prognostic marker for radiotherapy in human rectal adenocarcinoma: Am J Pathol, v. 181, p. 1271-8.

Murata, A., Y. Baba, M. Watanabe, H. Shigaki, K. Miyake, T. Ishimoto, M. Iwatsuki, S. Iwagami, Y. Sakamoto, Y. Miyamoto, N. Yoshida, K. Nosho, and H. Baba, 2013, Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer: Br J Cancer, v. 109, p. 408-15.

Negri, F. V., C. Bozzetti, C. A. Lagrasta, P. Crafa, M. P. Bonasoni, R. Camisa, G. Pedrazzi, and A. Ardizzoni, 2010, PTEN status in advanced colorectal cancer treated with cetuximab: Br J Cancer, v. 102, p. 162-4.

Nicholson, R. I., J. M. Gee, and M. E. Harper, 2001, EGFR and cancer prognosis.: Eur J Cancer, v. 37 Suppl 4, p. S9-15.

O'Connor, D., D. Grossman, J. Plescia, F. Li, H. Zhang, A. Villa, S. Tognin, P. Marchisio, and D. Altieri, 2000a, Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin.: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, p. 13103-7.

O'Connor, D., N. Wall, A. Porter, and D. Altieri, 2002, A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer.: Cancer Cell, v. 2, p. 43-54.

O'Connor, D. S., J. S. Schechner, C. Adida, M. Mesri, A. L. Rothermel, F. Li, A. K. Nath, J. S. Pober, and D. C. Altieri, 2000b, Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells: Am J Pathol, v. 156, p. 393-8.

Oliveira, S., K. Machado, J. Sabbaga, and P. Hoff, 2010, Integration of anti-vascular endothelial growth factor therapies with cytotoxic chemotherapy in the treatment of colorectal cancer.: Cancer J, v. 16, p. 220-5.

Paliogiannis, P., A. Cossu, F. Tanda, G. Palmieri, and G. Palomba, 2014, KRAS mutational concordance between primary and metastatic colorectal cancer, Spandidos Publications, Section Oncology letters.

Pan, W., S. Huang, J. Zhang, B. Zhao, H. Wang, F. Liu, K. Jin, and X. Mou, 2013, Heterogeneity-related anticancer therapy response differences in metastatic colon carcinoma: new hints to tumor-site-based personalized cancer therapy: Hepatogastroenterology, v. 60, p. 1927-34.

Park, J., C. Dahm, R. Keogh, P. Mitrou, B. Cairns, D. Greenwood, E. Spencer, I. Fentiman, M. Shipley, E. Brunner, J. Cade, V. Burley, G. Mishra, D. Kuh, A. Stephen, I. White, R. Luben, A. Mulligan, K. Khaw, and S. Rodwell, 2010, Alcohol intake and risk of colorectal cancer: results from the UK Dietary Cohort Consortium.: Br J Cancer, v. 103, p. 747-56.

Park, J., P. Mitrou, C. Dahm, R. Luben, N. Wareham, K. Khaw, and S. Rodwell, 2009, Baseline alcohol consumption, type of alcoholic beverage and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Norfolk study.: Cancer Epidemiol, v. 33, p. 347-54.

Park, J. H., S. W. Han, D. Y. Oh, S. A. Im, S. Y. Jeong, K. J. Park, T. Y. Kim, Y. J. Bang, and J. G. Park, 2011, Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer: Cancer Chemother Pharmacol, v. 68, p. 1045-55.

Ponnelle, T., C. Chapusot, L. Martin, A. Bouvier, S. Plenchette, J. Faivre, E. Solary, and F. Piard, 2005, Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer.: J Cancer Res Clin Oncol, v. 131, p. 504-10.

Qi, G., H. Tuncel, E. Aoki, S. Tanaka, S. Oka, I. Kaneko, M. Okamoto, M. Tatsuka, S. Nakai, and F. Shimamoto, 2009, Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer.: Oncol Rep, v. 22, p. 557-62.

Qiu, W., H. Liu, A. Sebastini, Q. Sun, H. Wang, L. Zhang, and J. Yu, 2013, An apoptosis-independent role of SMAC in tumor suppression: Oncogene, v. 32, p. 2380-9.

Radinsky, R., S. Risin, D. Fan, Z. Dong, D. Bielenberg, C. D. Bucana, and I. J. Fidler, 1995, Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells.: Clin Cancer Res, v. 1, p. 19-31.

Rajaganeshan, R., R. Prasad, P. J. Guillou, N. Scott, G. Poston, and D. G. Jayne, 2009, Expression patterns of hypoxic markers at the invasive margin of colorectal cancers and liver metastases: Eur J Surg Oncol, v. 35, p. 1286-94.

Razis, E., G. Pentheroudakis, G. Rigakos, M. Bobos, G. Kouvatseas, O. Tzaida, T. Makatsoris, P. Papakostas, M. Bai, A. Goussia, E. Samantas, D. Papamichael, O. Romanidou, I. Efstratiou, E. Tsolaki, A. Psyrri, W. De Roock, D. Bafaloukos, G. Klouvas, S. Tejpar, K. T. Kalogeras, D. Pectasides, and G. Fountzilas, 2014, EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab: J Cancer Res Clin Oncol, v. 140, p. 737-48.

Reinwald, K. C., 2010, Expression von EGF-Rezeptoren und seinen Downstream-Effektoren Hif-1alpha und VEGF im kolorektalen Karzinom: Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten und der Prognose, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 73 p.

Ren, J., G. Li, J. Ge, X. Li, and Y. Zhao, 2012, Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis: Dis Colon Rectum, v. 55, p. 913-23.

Resnick, M. B., J. Routhier, T. Konkin, E. Sabo, and V. E. Pricolo, 2004, Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study.: Clin Cancer Res, v. 10, p. 3069-75.

Rossi, L., F. Vakiarou, F. Zoratto, L. Bianchi, A. Papa, E. Basso, M. Verrico, G. L. Russo, S. Evangelista, G. Rinaldi, F. Perrone-Congedi, G. P. Spinelli, V. Stati, D. Caruso, A. Prete, and S. Tomao, 2013, Factors influencing choice of chemotherapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): Cancer Manag Res, v. 5, p. 377-385.

Roth, A. D., S. Tejpar, M. Delorenzi, P. Yan, R. Fiocca, D. Klingbiel, D. Dietrich, B. Biesmans, G. Bodoky, C. Barone, E. Aranda, B. Nordlinger, L. Cisar, R. Labianca, D. Cunningham, E. Van Cutsem, and F. Bosman, 2010, Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial.: J Clin Oncol, v. 28, p. 466-74.

Royston, D., and D. G. Jackson, 2009, Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma: J Pathol, v. 217, p. 608-19.

Saeki, T., D. S. Salomon, G. R. Johnson, W. J. Gullick, K. Mandai, K. Yamagami, S. Moriwaki, M. Tanada, S. Takashima, and E. Tahara, 1995, Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas.: Jpn J Clin Oncol, v. 25, p. 240-9.

Salmena, L., A. Carracedo, and P. P. Pandolfi, 2008, Tenets of PTEN tumor suppression.: Cell, v. 133, p. 403-14.

Santini, D., F. Loupakis, B. Vincenzi, I. Floriani, I. Stasi, E. Canestrari, E. Rulli, P. E. Maltese, F. Andreoni, G. Masi, F. Graziano, G. G. Baldi, L. Salvatore, A. Russo, G. Perrone, M. R. Tommasino, M. Magnani, A. Falcone, G. Tonini, and A. Ruzzo, 2008, High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice: Oncologist, v. 13, p. 1270-5.

Scartozzi, M., I. Bearzi, R. Berardi, A. Mandolesi, G. Fabris, and S. Cascinu, 2004, Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies: J Clin Oncol, v. 22, p. 4772-8.

Schimmer, A., S. Dalili, R. Batey, and S. Riedl, 2006, Targeting XIAP for the treatment of malignancy.: Cell Death Differ, v. 13, p. 179-88.

Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, 2007, Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer: Nat Rev Cancer, v. 7, p. 295-308.

Semenza, G., 2010, Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.: Oncogene, v. 29, p. 625-34.

Shimomura, M., T. Hinoi, S. Kuroda, T. Adachi, Y. Kawaguchi, T. Sasada, Y. Takakura, H. Egi, M. Okajima, H. Tashiro, T. Nishizaka, and H. Ohdan, 2013, Overexpression of hypoxia inducible factor-1 alpha is an independent risk factor for recurrence after curative resection of colorectal liver metastases: Ann Surg Oncol, v. 20 Suppl 3, p. S527-36.

Silvestris, N., S. Tommasi, D. Santini, A. Russo, G. Simone, D. Petriella, E. Maiello, G. Tonini, and G. Colucci, 2009, KRAS mutations and sensitivity to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal carcinoma: an open issue.: Expert Opin Biol Ther, v. 9, p. 565-77.

Smakman, N., I. H. Borel Rinkes, E. E. Voest, and O. Kranenburg, 2005, Control of colorectal metastasis formation by K-Ras.: Biochim Biophys Acta, v. 1756, p. 103-14.

Sood, A., D. McClain, R. Maitra, A. Basu-Mallick, R. Seetharam, A. Kaubisch, L. Rajdev, J. M. Mariadason, K. Tanaka, and S. Goel, 2012, PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: Clin Colorectal Cancer, v. 11, p. 143-50.

Soumaoro, L. T., H. Uetake, Y. Takagi, S. Iida, T. Higuchi, M. Yasuno, M. Enomoto, and K. Sugihara, 2006, Coexpression of VEGF-C and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis.: Dis Colon Rectum, v. 49, p. 392-8.

Spano, J. P., C. Lagorce, D. Atlan, G. Milano, J. Domont, R. Benamouzig, A. Attar, J. Benichou, A. Martin, J. F. Morere, M. Raphael, F. Penault-Llorca, J. L. Breau, R. Fagard, D. Khayat, and P. Wind, 2005, Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival.: Ann Oncol, v. 16, p. 102-8.

Takahashi, H., K. Yoneda, A. Tomimoto, H. Endo, T. Fujisawa, H. Iida, H. Mawatari, Y. Nozaki, T. Ikeda, T. Akiyama, M. Yoneda, M. Inamori, Y. Abe, S. Saito, A. Nakajima, and H. Nakagama, 2007, Life style-related diseases of the digestive system: colorectal cancer as a life style-related disease: from carcinogenesis to medical treatment.: J Pharmacol Sci, v. 105, p. 129-32.

Takahashi, Y., Y. Kitadai, C. D. Bucana, K. R. Cleary, and L. M. Ellis, 1995, Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer: Cancer Res, v. 55, p. 3964-8.

Takeuchi, H., J. Kim, A. Fujimoto, N. Umetani, T. Mori, A. Bilchik, R. Turner, A. Tran, C. Kuo, and D. Hoon, 2005, X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression level in colorectal cancer is regulated by hepatocyte growth factor/C-met pathway via Akt signaling.: Clin Cancer Res, v. 11, p. 7621-8.

Theodoropoulos, G. E., E. Karafoka, J. G. Papailiou, P. Stamopoulos, C. P. Zambirinis, K. Bramis, S. G. Panoussopoulos, E. Leandros, and J. Bramis, 2009, P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of 'old' tissue markers in patients with long follow-up.: Anticancer Res, v. 29, p. 785-91.

Tiemersma, E., E. Kampman, H. Bueno de Mesquita, A. Bunschoten, E. van Schothorst, F. Kok, and D. Kromhout, 2002, Meat consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility in the etiology of colorectal cancer: results from a Dutch prospective study.: Cancer Causes Control, v. 13, p. 383-93.

Tran, J., J. Rak, C. Sheehan, S. D. Saibil, E. LaCasse, R. G. Korneluk, and R. S. Kerbel, 1999, Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells: Biochem Biophys Res Commun, v. 264, p. 781-8.

Treanor, D., and P. Quirke, 2007, Pathology of colorectal cancer.: Clin Oncol (R Coll Radiol), v. 19, p. 769-76.

Triantafillidis, J., G. Nasioulas, and P. Kosmidis, 2009, Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies.: Anticancer Res, v. 29, p. 2727-37.

Van Cutsem, L., D`haens,, 2008, KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with of without cetuximab: The Crystal experience.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos, 1988, Genetic alterations during colorectal-tumor development.: N Engl J Med, v. 319, p. 525-32.

Voutsina, A., M. Tzardi, A. Kalikaki, Z. Zafeiriou, E. Papadimitraki, M. Papadakis, D. Mavroudis, and V. Georgoulias, 2013, Combined analysis of KRAS and PIK3CA mutations, MET and PTEN expression in primary tumors and corresponding metastases in colorectal cancer: Mod Pathol, v. 26, p. 302-13.

Wang, T. B., Z. G. Chen, X. Q. Wei, B. Wei, and W. G. Dong, 2011, Serum vascular endothelial growth factor-C and lymphoangiogenesis are associated with the lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer: ANZ J Surg, v. 81, p. 694-9.

Wang, Y., X. Yao, J. Ge, F. Hu, and Y. Zhao, 2014, Can Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density Be Used as Prognostic Biomarkers for Colorectal Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis: ScientificWorldJournal, v. 2014, p. 102736.

Watanabe, T., and T. Muto, 2000, Colorectal carcinogenesis based on molecular biology of early colorectal cancer, with special reference to nonpolypoid (superficial) lesions.: World J Surg, v. 24, p. 1091-7.

Watanabe, T., T. T. Wu, P. J. Catalano, T. Ueki, R. Satriano, D. G. Haller, A. B. Benson, and S. R. Hamilton, 2001, Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer: N Engl J Med, v. 344, p. 1196-206.

Wei, Q., Y. Shui, S. Zheng, K. Wester, H. Nordgren, P. Nygren, B. Glimelius, and J. Carlsson, 2011, EGFR, HER2 and HER3 expression in primary colorectal carcinomas and corresponding metastases: Implications for targeted radionuclide therapy: Oncol Rep, v. 25, p. 3-11.

WHO, 2010, WHO Classification of Tumors of the digestive System, p. 138.

Wicki, A., R. Herrmann, and G. Christofori, 2010, Kras in metastatic colorectal cancer.: Swiss Med Wkly, v. 140, p. w13112.

Wittekind, C., and H.-J. Meyer, 2010, TNM

Klassifikation maligner Tumoren, v. 7, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 295 p.

Won, M., N. Im, S. Park, S. Boovanahalli, Y. Jin, X. Jin, K. Chung, M. Kang, K. Lee, S. Park, H. Kim, B. Kwon, and J. Lee, 2009, A novel benzimidazole analogue inhibits the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 pathway.: Biochem Biophys Res Commun, v. 385, p. 16-21.

Wu, Y., M. Jin, H. Xu, Z. Shimin, S. He, L. Wang, and Y. Zhang, 2010, Clinicopathologic significance of HIF-1α, CXCR4, and VEGF expression in colon cancer: Clin Dev Immunol, v. 2010.

Xiang, G., X. Wen, H. Wang, K. Chen, and H. Liu, 2009, Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human colorectal cancer and its correlation with prognosis.: J Surg Oncol, v. 100, p. 708-12.

Xiaoyuan, C., C. Longbang, W. Jinghua, G. Xiaoxiang, G. Huaicheng, Z. Qun, and S. Haizhu, 2010, Survivin: a potential prognostic marker and chemoradiotherapeutic target for colorectal cancer.: Ir J Med Sci, v. 179, p. 327-35.

Xu, Q. R., X. Liu, Y. M. Yao, and Q. G. Liu, 2014, Expression of HSP90 and HIF-1α in human colorectal cancer tissue and its significance: Asian Pac J Trop Med, v. 7, p. 720-4.

Yamamoto, T., Y. Manome, M. Nakamura, and N. Tanigawa, 2002, Downregulation of survivin expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer.: Eur J Cancer, v. 38, p. 2316-24.

Yang, D., A. Welm, and J. Bishop, 2004, Cell division and cell survival in the absence of survivin.: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, p. 15100-5.

Yang, J., F. Liu, X. Yan, G. He, and L. Liu, 2005, [Clinical significance of survivin expression in colorectal cancer and its relationship with cell apoptosis and angiogenesis.]: Ai Zheng, v. 24, p. 116-20.

Yang, Z. Y., X. Y. Wu, Y. F. Huang, M. Y. Di, D. Y. Zheng, J. Z. Chen, H. Ding, C. Mao, and J. L. Tang, 2013, Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis: Int J Cancer, v. 133, p. 1914-25.

Yasui, W., H. Sumiyoshi, J. Hata, T. Kameda, A. Ochiai, H. Ito, and E. Tahara, 1988, Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas.: Cancer Res, v. 48, p. 137-41.

Yin, Y., and W. H. Shen, 2008, PTEN: a new guardian of the genome.: Oncogene, v. 27, p. 5443-53.

Zafirellis, K., G. Agrogiannis, A. Zachaki, K. Gravani, A. Karameris, and C. Kombouras, 2008, Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer.: J Surg Res, v. 147, p. 99-107.

Zauber, P., M. Sabbath-Solitare, S. P. Marotta, and D. T. Bishop, 2003, Molecular changes in the Ki-ras and APC genes in primary colorectal carcinoma and synchronous metastases compared with the findings in accompanying adenomas.: Mol Pathol, v. 56, p. 137-40.