

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen

Institut für allgemeine Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie

Die Identifikation von prognostischen und prädiktiven  
Markern für das Metastasierungsverhalten und  
tumorspezifische Überleben lokal begrenzter  
Kolonkarzinome

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

Vorgelegt von

Strohäker, Jens Karl Hugo

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Reymond

Tag der Disputation: 28.11.2018

Meinen Eltern,  
die alles dafür gegeben haben dies möglich zu machen.

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Epidemiologie.....	8
1.1.1 Kolorektales Karzinom.....	8
1.2 Tumorbilogie .....	9
1.2.1 Adenom-Karzinom-Sequenz.....	9
1.2.2 Metastasierungsverhalten .....	9
1.3 Prognose und Stadieneinteilung .....	10
1.3.1 TNM Klassifikation.....	10
1.3.2 UICC-Stadien.....	12
1.4 Operative Therapie .....	13
1.5 Fragestellung .....	13
1.6 ausgewählte Signalwege .....	13
1.6.1 EGFR Rezeptor Signalweg.....	14
1.6.1.1 K-Ras.....	15
1.6.2 MAP-Kinase Signalweg .....	15
1.6.2.1 pERK (phosphoryliertes-ERK) .....	16
1.6.2.2 mTOR.....	17
1.6.3 wnt-Signalweg .....	17
1.6.3.1 $\beta$ -Catenin.....	17
1.6.3.2 c-MYC .....	18
1.6.4 Matrixmetalloproteinasen .....	18
1.6.5 Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1).....	19
1.6.6 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (VEGFR3).....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Kollektiv .....	20
2.1 Patienten und Follow-Up .....	21
2.1.1 Patienten-Kollektiv .....	22
2.1.2 Histologische Befunde.....	23
2.2 Gewebepreparation .....	25
2.2.1 Tissue Microarray (TMA) .....	25
2.2.2 Erstellung des TMA.....	25

2.3 Paraffinschnitte .....	26
2.3.1 Tumor-DNA.....	26
2.4 K-Ras Mutationsanalyse .....	26
2.4.1 DNA Extraktion .....	26
2.4.2. Amplification-refractory mutation system Polymerasekettenreaktion (ARMS-PCR)27	
2.4.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	27
2.4.2.2 ARMS-PCR .....	27
2.4.3 Schmelzpunktanalyse mit dem Light Cycler .....	28
2.4.4 Sequenzierung.....	30
2.5 Immunhistochemie .....	31
2.5.1 Allgemeines zur Immunhistochemie.....	31
2.5.2 Nachweis einer Antigen-Antikörper-Bindung .....	31
2.5.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung .....	31
2.6 Auswertung TMA.....	32
2.7 Statistik.....	33
3 Ergebnisse .....	33
3.0.1 Primäre Endpunkte .....	34
3.0.2. Sekundäre Endpunkte .....	34
3.1 EGFR-Signalweg.....	34
3.1.1. KRAS .....	34
3.2 MAP-Kinase Signalweg .....	39
3.2.1 pERK .....	39
3.2.2 mTOR.....	43
3.3 Wnt-Signalweg .....	46
3.3.1 $\beta$ -Catenin .....	46
3.3.2 c-MYC .....	50
3.4 Metalloproteinasen.....	52
3.4.1 MMP-9.....	52
3.5 Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1) .....	56
3.6 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren Rezeptor 3 (VEGFR3).....	59
4 Diskussion.....	62
4.1 EGFR-Signalweg.....	62
4.1.1 K-Ras.....	62

4.2 MAP-Kinase Signalweg .....	64
4.2.1 pERK (phosphoryliertes-ERK) .....	64
4.2.2 mTOR.....	65
4.3 wnt-Signalweg.....	66
4.3.1 $\beta$ -Catenin.....	66
4.3.2 c-MYC .....	69
4.4 Matrixmetalloproteinase-9 (MMP9).....	70
4.5 Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1).....	71
4.6 VEGFR-3.....	72
5 Zusammenfassung und Ausblick .....	74
6 Literaturverzeichnis.....	75
7 Abbildungs- & Tabellenverzeichnis .....	83
8 Anhang .....	84
8.1 Antikörper Immunhistochemie .....	84
8.1.1 Färbeprotokolle.....	85
8.2 Geräte.....	86
8.3 Molekularbiologische Protokolle und Verbrauchsmittel .....	86
8.3.1 PCR-Protokoll .....	86
8.3.2 PCR-Mix (Mastermix) .....	87
8.3.3 PCR-Primer Sequenz.....	87
8.4.1 Light-Cycler Mix.....	87
8.4.2 LightCycler-Analyse-Sonden.....	87
8.5 Hersteller Verbrauchsmaterialien.....	88
Erklärung des Eigenanteils .....	89
Danksagung.....	91

## Abkürzungsverzeichnis

- ATP Adenosintriphosphat
- Ca Karzinom
- $\chi^2$  Chi-Quadrat-Test
- CRC kolorektales Karzinom
- CXCL12 Chemokinrezeptorligand 12
- CXCR4 Chemokinrezeptor 4
- ddH<sub>2</sub>O bidestilliertes Wasser
- DNA Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
- dNTP Desoxynukleotidtriphosphat
- ddNTP Didesoxynukleotidtriphosphat
- EGFR epidermal growth factor receptor
- FET Fisher's Exact Test
- GTP Guanosintriphosphat
- LNA Locked Nukleic Acid
- LRT Log-Rank-Test
- MAPK mitogen-activated proteinkinase
- MMP Matrixmetalloproteinase
- mTOR mammalian Target of Rapamycin
- PCR Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
- pERK phosphorylated extracellular signal-regulated kinase
- PGK1 Phosphoglyceratkinase-1
- RAF rapidly accelerated fibrosarcoma
- TMA Tissue-Microarray
- UICC Union internationale contre le cancer
- VEGF (R3) vascular endothelial growth factor (receptor 3)
- Wnt "wingless-related integration site"
- WT Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

### 1.1.1 Kolorektales Karzinom

Darmkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen des Menschen. Im Jahr 2012 stellte das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Tumorerkrankung des Mannes (nach Prostata und Lunge) sowie die zweithäufigste Tumorerkrankung der Frau (nach Brustkrebs) dar. Im selben Jahr gab es geschätzt ca. 62.000 Neuerkrankungen mit leichter Präferenz des männlichen Geschlechts. Die Inzidenz lag beim Mann bei 85.8 / 100.000 Einwohner, bei der Frau bei 69.3 / 100.000 Einwohner (Kaatsch et al., 2016).

Durch verbesserte Therapiestrategien lag die Sterblichkeit im selben Zeitraum nur bei 26.000. Über alle Stadien verteilt lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei knapp 60% (Kaatsch et al., 2016). Sieht man von den familiären Tumorsyndromen ab, ist der Darmkrebs eine Erkrankung des älteren Menschen. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2012 bei 72 Jahren beim Mann und bei 75 Jahren bei der Frau. All diese Statistiken beinhalten sowohl die Tumoren des Dickdarmes (ca. 2/3) als auch die des Enddarmes (ca. 1/3) und die seltenen Tumoren des Analkanals.

Histologisch handelt es sich bis auf wenige Ausnahmen fast ausschließlich um Adenokarzinome, welche von den Drüsen des Dickdarmes ausgehen. Den Rest bilden mit ca. 1% neuroendokrine Tumoren sowie im Analbereich Plattenepithelkarzinome.

Ein geringer Anteil des CRC tritt im Rahmen eines erblichen Tumorsyndroms auf (2-5%) (Jasperson et al., 2010). Weitere 30% treten familiär gehäuft auf, der überwiegende Rest der kolorektalen Karzinome tritt als sporadisches Karzinom auf (Jasperson et al., 2010). Bereits in den 80er Jahren wurde durch Vogelstein die Hypothese aufgestellt, dass die Krebsentstehung auf einer Verkettung verschiedener Ereignisse von Punktmutationen und Deletionen entsteht (Kinzler and Vogelstein, 1996, Cho and Vogelstein, 1992b, Cho and Vogelstein, 1992a), die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz.



Zu den zahlreichen Risikofaktoren des Darmkrebses gehören neben Adipositas und Nikotinkonsum vordergründig die Ernährung (balaststoffarm, übermäßiger Verzehr von rotem Fleisch, gepökelten Speisen und nitrosaminhaltigen Lebensmitteln, Alkoholgenuss) und Bewegungsmangel.

Familiäre Tumorsyndrome, die den Darm betreffen, sind insgesamt selten. Die beiden häufigsten sind die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) sowie das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (Lynch-Syndrom). Diese zeichnen sich beide durch ein früheres Auftreten von Tumoren als beim sporadischen Kolonkarzinom aus. Ein weiterer Risikofaktor sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, auf welche hier nicht weiter eingegangen werden soll (Kaatsch et al., 2016).

## **1.2 Tumorbilogie**

### **1.2.1 Adenom-Karzinom-Sequenz**

Bert Vogelstein schlug bereits 1988 ein Model vor, welches in weiten Zügen noch heute als gültig erachtet wird. Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt eine Abfolge von Aktivierungen von Onkogenen sowie den schrittweisen Verlust von Tumorsuppressorgenen in der Entwicklung vom nicht invasiv wachsenden low-grade Adenom über das high-grade Adenom mit vermehrten Atypien bis hin zum invasiven Karzinom (Vogelstein et al., 1988).

### **1.2.2 Metastasierungsverhalten**

Entsprechend der embryologischen Herkunft der verschiedenen Anteile des Kolorektums und der damit verbundenen Blutversorgung wurde bereits frühzeitig ein unterschiedliches Metastasierungsverhalten beschrieben. Bekannt ist, dass Kolontumoren, welche über das Stromgebiet der Vv. Mesentericae superiores et inferiores drainieren, neben den lokoregionären Lymphknoten primär in der Leber als erste hämatogene Filterstation für Tumorzellen Metastasen bilden (Böcker et al., 2012). Als Kontrast hierzu treten bei tiefen Rektumkarzinomen entsprechend ihres venösen Abflusses in die Iliakalgefäße häufiger pulmonale Metastasen auf, entsprechend der Lunge als erste „Filterstation“ für Tumorzellen. Zudem ist bekannt, dass Tumoren, welche in der

histologischen Untersuchung eine Lymphangiainvasion (L-Status) zeigen, häufig in die Lymphknoten metastasieren, sowie Tumoren, welche eine Venoinvasion (V-Status) zeigen, häufiger eine hämatogene Metastasierung, als wenn dieser Gefäßeinbruch nicht vorliegt, zeigen. Unbekannt ist allerdings, welche Faktoren und Eigenschaften des Tumors dieses invasive Verhalten bedingen. Nicht selten finden sich nodal negative Tumoren, die dennoch in die Leber metastasiert haben.

Eine peritoneale Metastasierung wird am ehesten durch ein Durchbrechen des Tumors durch die Serosa des Darmes bedingt. Diese Patienten sind häufig multifokal synchron metastasiert und damit den späten Tumorstadien zuzuschreiben. Da wir uns primär auf lokalisierte Stadien des Primärtumors beschränken wollten, wurden T4-Tumoren und solche, die bereits eine Peritonealkarzinose gebildet hatten, von vorneherein ausgeschlossen.

### **1.3 Prognose und Stadieneinteilung**

Das CRC gilt prinzipiell als heilbare Krebserkrankung. Besonders wenn es in den Frühstadien radikal operiert wird, sind die Heilungschancen gut. In den lokal begrenzten Stadien UICC I / II wurden in einer Deutschen Registerstudie von 2002-2006 5-Jahres-Überlebensraten von 89% beschrieben (Majek et al., 2012). Dieselbe Studie zeigt bei den lokal fortgeschrittenen Kolontumoren im UICC-Stadium III ein Überleben von 65%. Aber auch in späten Stadien besteht eine chirurgische Handlungsoption, vor allem wenn sich die Metastasen auf die Leber beschränken und resektabel sind. Auch im UICC-Stadium IV (siehe unten) sind daher 5-Jahres-Überlebensraten von ~ 30% beschrieben worden (Fong et al., 1999), (Merkel et al., 2009).

#### **1.3.1 TNM Klassifikation**

Die TNM-Klassifikation teilt Tumore nach pathologisch-histologischen Kriterien ein. Sie ist die Grundlage der Therapiestrategie sowie der Prognose des Patienten.

Für das kolorektale Karzinom hat dies folgende Bedeutung:

Das T bezeichnet die Eindringtiefe des Primärtumors in die Wandschichten des Dickdarmes.

- T0 Kein Anhalt für einen Primärtumor
- T1 Tumor infiltriert Submukosa
- T2 Tumor infiltriert Muscularis propria
- T3 Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht-peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
- T4 Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und / oder perforiert das viszerale Peritoneum
  - T4a Tumor perforiert viszerales Peritoneum
  - T4b Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen

Das N bezeichnet den Status der regionären Lymphknoten. Regionäre Lymphknoten sind die Lymphknoten, welche entlang der versorgenden Blutgefäße des vom Tumor befallenen Abschnitts des Darmes verlaufen. Zusätzlich werden noch die Lymphknoten als regionär bezeichnet, die im Bereich des versorgenden Mesenteriums des betroffenen Darmabschnitts situiert sind.

- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastase(n) in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
  - N1a Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
  - N1b Metastasen in 2 bis 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 bis 6 regionären Lymphknoten
  - N2b Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

Fernmetastasen werden mit dem Buchstaben M bezeichnet.

M0 Keine Fernmetastasen liegen vor

M1 Fernmetastasen

M1a Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)

M1b Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Nach TNM-Klassifikation maligner Tumoren (Wittekind, 2010).

### 1.3.2 UICC-Stadien

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1 – 2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3 – 4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
IIIB	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T1-2	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIC	T3-T4a	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T4b	N1-2	M0

IVA	jedes T	jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ)
IVB	jedes T	jedes N	M1b (Fernmetastasen in einem Organ oder im Peritoneum)

Tabelle 1 UICC-Stadien

## 1.4 Operative Therapie

Tumoren des Kolons werden in aller Regel durch eine Resektion des betroffenen Abschnittes sowie des anhängenden Mesenteriums und somit auch der zugehörigen Lymphknotenstationen therapiert. Das Resektionsausmaß hängt zunächst von der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors ab. Die Resektionslinien werden an die Blutversorgung des resezierten Abschnittes angepasst.

Lebermetastasen können ebenfalls chirurgisch therapiert werden und führen bei entsprechend radikaler Behandlung zu einer Lebenszeitverlängerung (Fong et al., 1999).

## 1.5 Fragestellung

Gegenstand unserer Arbeit war die Suche nach möglichen prognostischen und prädiktiven immunhistochemischen Markern am Primärtumor, die für das Metastasierungsverhalten und/oder das Überleben lokaler, lokal fortgeschrittener sowie bereits hepatisch metastasierter Patienten eine Aussage ermöglichen. Rektumkarzinome wurden aufgrund der inhomogenen Vorbehandlung mittels neoadjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie nicht eingeschlossen. Zudem wurde das Vorliegen der Marker hinsichtlich einer Seitenpräferenz des linken und rechten Hemikolons untersucht.

## 1.6 ausgewählte Signalwege

Die Auswahl der untersuchten Signalwege beruhte auf vielen beim Kolonkarzinom oder anderen Tumorerkrankungen bekannten und mit der

Tumorigenese in Verbindung gebrachter Proteine. Die Auswahl soll im folgenden Abschnitt jeweils näher vermittelt werden.

### 1.6.1 EGFR Rezeptor Signalweg

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor Signalweg (EGFR) ist ein ubiquitär vorhandener Signalweg, der eine wichtige Rolle in Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Angiogenese darstellt (Dutta and Maity, 2007). In verschiedenen Tumorerkrankungen konnte eine Dysregulation des EGFR nachgewiesen werden. Hier sind sowohl die bloße Überexpression des normalen Rezeptors als auch mutierte EGFR-Varianten mit aberranter Funktion beschrieben worden (Dutta and Maity, 2007, Paez et al., 2004).

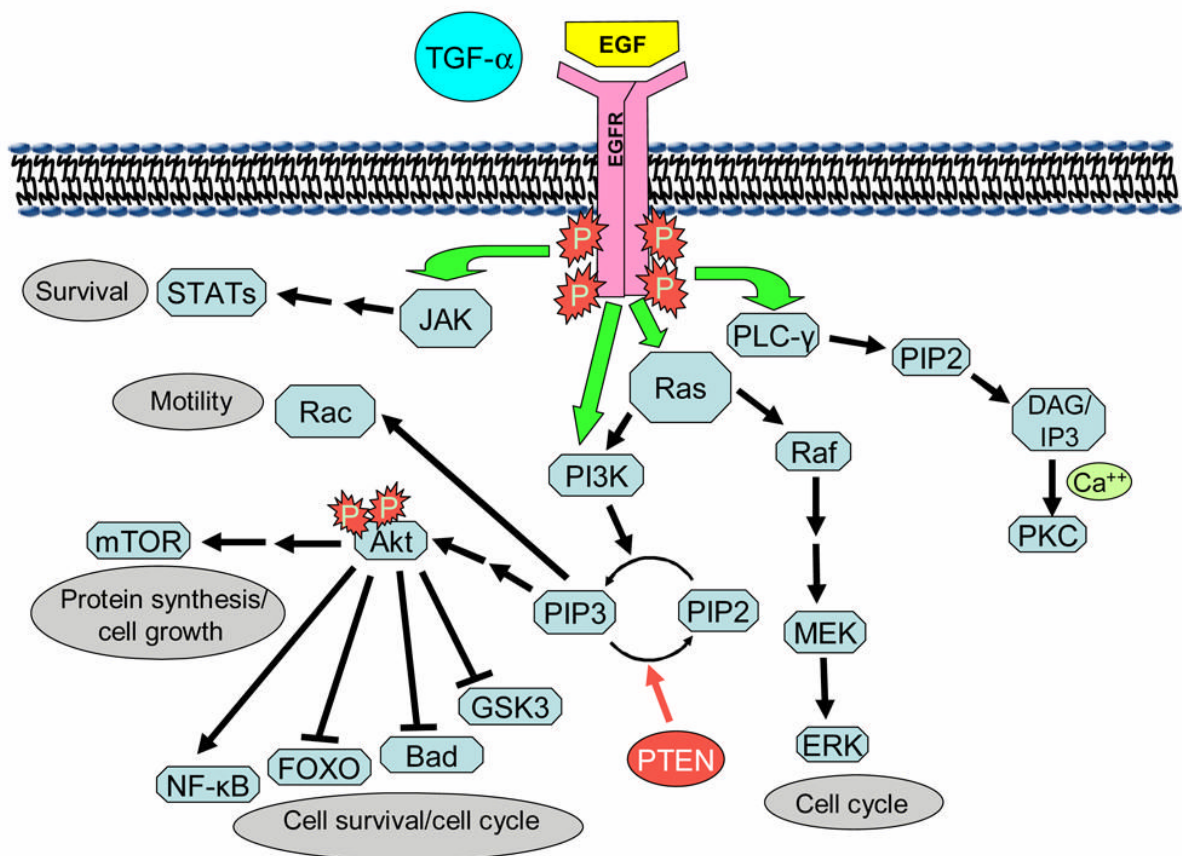


Abbildung 1 EGFR Signalweg nach Dutta et al (Dutta and Maity, 2007)

### **1.6.1.1 K-Ras**

K-Ras ist ein Proto-Onkogen, welches als kleines G-Protein im Signalweg des EGF-Rezeptors liegt. G-Proteine werden durch Bindung von GTP aktiviert und lösen daraufhin die nachgeschaltete Signalkaskade aus. Zur Beendigung dieser Aktivität besitzt es eine autoinhibierende GTPase-Fähigkeit. Ist das Gen, welches für K-ras codiert, mutiert, verliert dieses G-Protein seine GTPase-Fähigkeit. Dies führt, nach einmaliger Bindung von GTP, zu einer permanenten Aktivierung und so zu einer starken Überaktivität des EGF-Rezeptor-Signalweges. Bei Kolonkarzinomen finden sich in ca. 40% der Fälle Mutationen im K-Ras Gen (Morris et al., 2014) (Andreyev et al., 1998a).

Die sieben häufigsten K-Ras Mutationen, welche zu einem Aminosäureaustausch in K-Ras führen, machen 97% der beim kolorektalen Karzinom bekannten Mutationen aus. Diese sind auf dem Codon 12 und Codon 13 gelegen (Herzig and Tsikitis, 2015).

Ferner können Patienten, welche K-Ras Wildtyp sind, seit einigen Jahren mit den Antikörpern Cetuximab (chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper aus Säugerzelllinie) und Panitumumab (monoklonaler humaner Antikörper), jeweils Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), behandelt werden. Beide sind, nebst anderen, zugelassene und etablierte Therapieoptionen beim metastasierten kolorektalen Karzinom. Ist ein Patient mutiert in den für K-Ras codierenden Genen, so zeigt der Antikörper praktisch keine Wirkung (Amado et al., 2008). In der Zwischenzeit werden routinemäßig zudem weitere Mitglieder der Ras-Genfamilie getestet. Neben H-Ras ist vor allem N-Ras von onkogener Bedeutung. (Bos, 1988) Es konnte auch gezeigt werden, dass jegliche aktivierende Ras-Mutation eine Hinzunahme eines EGFR-Antikörpers zur adjuvanten Therapie wenig erfolgsversprechend macht. (De Roock et al., 2010, Douillard et al., 2014)

### **1.6.2 MAP-Kinase Signalweg**

Der Signalweg der mitogen-activated proteinkinase (MAPK) überträgt Signale von der Zelloberfläche in das Zellinnere. Ein zentrales Element dieses

Signalwegs ist die im Downstream gelegene „extracellular signal-regulated kinase (ERK)“. Diese überträgt extrazelluläre Signale ausgelöst durch Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Transmitter in die Zelle. (Roskoski, 2012) ERK selbst ist ein Downstream-Target des EGFR. In Abbildung 1 wird der Signalweg orientierend von EGFR über Ras, Raf und MEK bis zum ERK dargestellt. (Dutta and Maity, 2007, Garnett and Marais, 2004)

#### **1.6.2.1 pERK (phosphoryliertes-ERK)**

Menschliche extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1/2 wird durch die Kinase MEK 2 phosphoryliert und damit zu pERK aktiviert (Roskoski, 2012).

pERK hat verschiedene Funktionen im Zellzyklus. Yoon nennt in seinem Review von 2006 eine Anzahl von über 160 bekannten Substraten von ERK. Diese beinhalten sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Ziele, welche sowohl in den Prozess der Transkription (nukleär), in Mitose und Apoptose als auch in Signale an die Organelle (zytoplasmatisch) eingebunden sind. Hier soll lediglich kurz auf relevante Substrate eingegangen werden. Die Zahl der beschriebenen Substrate ist allerdings weiterhin steigend (Yoon and Seger, 2006).

Als Beispiele sollen hier zwei Ziele genannt werden. Zum einen die ribosomale S6 Kinase-Familie (Rsk), welche pro-apoptotische Proteine phosphoryliert und damit inaktiviert und zum anderen CREB (cAMP response element-binding protein), welches, ebenfalls durch Rsk phosphoryliert, die Transkription anregt bzw. als solches dephosphoryliert eine pro-apoptotische Funktion hat (Bonni et al., 1999).

Die MAP-Kinase Kaskade und pERK sind essentiell für die Übertragung extrazellulärer Rezeptoren zu den Transkriptionsfaktoren des Zellkernes. Die Phosphorylierung zytoplasmatischer Proteine durch pERK ist wichtig für die Zellproliferation (Georgieva et al., 2008).

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des B-Raf/MEK/ERK-Signalweges einen Schutz gegen Caspasen und damit die Apoptose bietet, was letztlich eine Immortalisierung bedingen kann (Erhardt et al., 1999). Über die Beeinflussung von Integrinen soll pERK eine Rolle in der



Zellmigration und Zelladhäsion und damit auch der Metastasierung spielen (Varner and Cheresch, 1996).

### **1.6.2.2 mTOR**

Das mechanistic/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ist Teil des pAKT / PI3K / mTOR Signalweges. Als Downstreamziel sowohl von AKT als auch von ERK spielt mTOR eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Buck et al., 2006), dem Zellgrößenwachstum, der Tumorigenese (Shaw and Cantley, 2006) (Khaleghpour et al., 2004) und dem Zellüberleben (Foster, 2009). Für mTOR-Inhibitoren wurde zudem ein antiangiogenetischer Effekt nachgewiesen, sodass mTOR auch eine Rolle im Tumorgefäßwachstum nachgesagt wird (Guba et al., 2002) (Karar and Maity, 2011).

### **1.6.3 wnt-Signalweg**

#### **1.6.3.1 $\beta$ -Catenin**

Als Teil des wnt-Signalweges ist  $\beta$ -Catenin ein an der Zell-Zell-Adhärenz beteiligtes Protein (Waller et al., 2016). Für gewöhnlich wird dieses durch den Tumorsuppressor Adenomatous-polyposis-coli-Protein (APC) abgebaut. Ist das APC-Gen mutiert, führt dies zu einer Fehlfunktion der Degradation von  $\beta$ -Catenin, was wiederum dazu führt, dass letzteres akkumuliert und in den Zellkern transloziert. Dort hat es proliferationsstimulierende Wirkung (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Aber auch unabhängig des erblichen Gendefekts, welcher zur familiären Adenomatosis Polyposis Coli führt, konnten auch beim sporadischen Kolonkarzinom somatische Mutationen im APC-Gen gezeigt werden (Powell et al., 1992). Diese bedingen, dass häufig nukleär transloziertes  $\beta$ -Catenin exprimiert wird (Kobayashi et al., 2000).

Ferner wird vermutet, dass  $\beta$ -Catenin ebenso eine Auswirkung auf die Metastasierung hat (Ormanns et al., 2014). Der Mechanismus ist letztlich noch nicht bekannt.

### **1.6.3.2 c-MYC**

Neben  $\beta$ -Catenin spielt auch c-Myc eine wichtige Rolle im wnt-Signalweg. MYC ist ein ubiquitär vorhandenes Protein, welches für die Genexpression vieler menschlicher Gene verantwortlich ist. Bei Überexpression kommt es somit zur vermehrten Proteinexpression und zur möglichen Entgleisung der Zellproliferation (Eilers and Eisenman, 2008).

### **1.6.4 Matrixmetalloproteinasen**

Matrixmetalloproteinasen (MMP), das sind zinkabhängige Endopeptidasen, welche es vermögen verschiedene Proteine vor allem der Extrazellulärmatrix zu spalten (Zucker and Vacirca, 2004). Es sind über 20 verschiedene Subtypen bekannt (Mook et al., 2004). Gegenstand unserer Untersuchung ist die MMP9, welche historisch auch als Gelatinase B bezeichnet wurde und sich in der rezenten Vergangenheit als relevant für das kolorektale Karzinom etabliert hat. Zuvor waren bereits Assoziationen zwischen MMPs und dem Pankreaskarzinom (Gress et al., 1995) sowie dem Mammakarzinom (Lebeau et al., 1999) hergestellt worden.

Eines der Substrate der MMP9 ist Kollagen Typ IV (Mook et al., 2004), welches essentieller Bestandteil von Basalmembranen ist. Daher wird spekuliert, dass MMP9 eine wichtige Rolle bei der Extravasation und Invasion hat (Liotta, 1986) (Chambers and Matrisian, 1997). Zudem wurden weitere Funktionen z.B. in der Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und in der Angiogenese nachgewiesen.

Lange war MMP9 vor allem in peritumoralen inflammatorischen Zellen beschrieben worden (Arii et al., 1998, Illemann et al., 2006, Zeng and Guillem, 1995). Dann konnte eine Expression in den Epithelzellen eines in die Leber metastasierten Kolonkarzinoms gezeigt werden (Gerg et al., 2008, Lubbe et al., 2006).

Im Tiermodell ging ein MMP9 Knockout mit einer reduzierten Tumormasse einher. Die Anwendung eines unselektiven Inhibitors der MMP (Batimastat) führte zu

einer signifikanten Reduktion an peritonealer und hepatischer Metastasierung und damit zu einem verlängerten Überleben (Aparicio et al., 1999, Gorden et al., 2007). Eine Anwendung beim Menschen haben diese Medikamente aber aufgrund ihres Nebenwirkungsspektrums bisher nicht erreicht und es wurden bisher auch keine selektiveren Inhibitoren klinisch zugelassen.

#### **1.6.5 Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1)**

Die Phosphoglyceratkinase 1 ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Dort katalysiert sie die ATP/ADP-abhängige Hin- und Rückreaktion von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Solide Tumoren produzieren vermehrt PGK1 im hypoxischen Zustand, um anaerob Adenosin-Triphosphat (ATP) zu gewinnen (Daly et al., 2004). Es wird zudem ein angiogenetischer Effekt vermutet. Zumindest konnte gezeigt werden, dass die Tumorzelle autoregulatorisch die Sekretion von PGK1 zu hemmen vermag, da dieses nach Akkumulation extrazellulär ansonsten angiostatisch wirkt (Lay et al., 2000).

In einer hausinternen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von PGK1 beim diffusen Magenkarzinom zu einem erhöhten Risiko für peritoneale Metastasierung führt (Zieker et al., 2008, Zieker et al., 2010a, Zieker et al., 2010b). Zudem konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass bei PGK1-Überexpression erhöhte Proteinspiegel für CXCR4 und  $\beta$ -Catenin auftreten. Im selben Zusammenhang kommt es beim Magenkarzinom durch eine zusätzliche Expression von CXCL12 (Ligand für CXCR4) zur Steigerung der Invasivität.

Auch in metastasierten Kolonkarzinomen traten erhöhte PGK1-Spiegel gegenüber den nicht-metastasierten Tumoren auf (Ahmad et al., 2013).

Daher stellte sich uns die Frage, ob und wie weit dieses Enzym einen Einfluss auf den Progress von Kolonkarzinomen hat.

#### **1.6.6 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 3 (VEGFR3)**

Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren haben verschiedene Funktionen in der Embryogenese (Shibuya, 2011). Durch ihre Stimulation des

Gefäßwachstums (Angiogenese) bedingen sie sowohl physiologische als auch pathologische Effekte. Am besten studiert ist der VEGFR2 Rezeptor. Erst seit Anfang der 2000er sind die VEGF-C und VEGF-D Unterformen bekannt, welche den VEGFR3 aktivieren und hauptsächlich in der Lymphangiogenese eine Rolle spielen (Alitalo and Carmeliet, 2002). Die Hemmung von VEGF-A ist bereits seit längerer Zeit ein Grundpfeiler der adjuvanten Therapie beim kolorektalen Karzinom, aber auch bei anderen Tumorentitäten (Hurwitz et al., 2005). Primäres Ziel erscheint hier aber nicht so sehr die weitere Metastasierung zu verhindern, sondern durch die Unterdrückung der Angiogenese das Tumorwachstum zu verlangsamen. Eine selektive Hemmung des VEGFR3 bzw. seines adulten Aktivators VEGF-D ist bisher noch nicht zugelassen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Kollektiv**

In einer Vorarbeit wurden alle Patienten, welche in den Jahren von 2004 bis 2008 an der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsklinik Tübingen an einem Kolon- oder Rektumkarzinom operiert wurden, dokumentiert. Für all diese Patienten wurde ein klinisches Follow-Up

erstellt, welches die Grundlage unserer späteren statistischen Auswertung darstellt. Es beinhaltet, neben etwa 200 weiteren Parametern, das (tumorfreie) Überleben der Patienten, die Anzahl und Art der Rezidive und Metastasen sowie etliche Komorbiditäten und Risikofaktoren. Aus diesen knapp 600 Patienten wurden all diejenigen ausgewählt, welche zwischen den Jahren 2006 und 2008 an einem primären Adenokarzinom des Kolons operiert wurden. Ferner wurden bewusst nur Patienten mit einem TNM Stadium von pT2/3 pNx cMx eingeschlossen, um auf intermediäre Tumorstadien zu fokussieren und die ohnehin selten metastasierenden Frühkarzinome sowie die bereits weit fortgeschrittenen Tumoren auszuklammern. Dieses Kollektiv wurde dann weiter aufgeteilt in Untergruppen gemäß dem synchronen Metastasierungsstatus der Patienten. Zwei dieser Patienten waren bei synchronen Lebermetastasen neoadjuvant mittels Chemotherapie (ein Patient hatte zuvor 10 Zyklen FOLFOX erhalten, der andere 6 Zyklen FOLFOX + Cetuximab) vorbehandelt worden, alle anderen Patienten waren hingegen nicht vortherapiert.

Patienten, bei denen nebst Leber- oder Lymphknotenmetastasen noch weitere synchrone peritoneale oder solide Organmetastasen diagnostiziert worden waren, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Gleiches galt für T1-Frühkarzinome bzw. lokal weit fortgeschrittene T4 Tumoren.

## **2.1 Patienten und Follow-Up**

Dreiundneunzig Patienten mit einem Karzinom des Kolons, davon zwanzig im Stadium T2/3 N1/2 M0, neunzehn im Stadium T2/3 Nx M1(Hep), sowie eine Kontrollgruppe von vierundfünfzig Patienten im Stadium T2/3 N0 M0 wurden in unsere Untersuchungen eingeschlossen. Sie wurden alle im Zeitraum von 01/2006 bis 12/2008 an der Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Tübingen operiert. Aus den OP-Resektaten wurde dann durch einen Pathologen repräsentative Proben des Tumors in Formalin fixiert und später, in Paraffin eingegossen, asserviert.

Alle in dieser Arbeit inbegriffenen Patienten haben schriftlich ihr Einverständnis zur Untersuchung ihrer Resektate gegeben.

Anhand der histopathologischen Abschlussbefunde wurde verifiziert, dass alle ausgewählten Patienten Träger eines Adenokarzinoms des Colons waren.

### 2.1.1 Patienten-Kollektiv

Eigenschaften		N = 93
Alter bei Diagnose	Median	72.0 Jahre
	Spannweite	35-94
Geschlecht	Männlich	48 (52%)
	Weiblich	45 (48%)
UICC Stadium *	I (T1/2 N0 M0)	14 (15%)
	II (T3/4 N0 M0)	39 (42%)
	III (Tx N1/2 M0)	20 (22%)
	IV (Tx Nx M1)	19 (20%)
Tumorklassifikation anatomisch	Appendix verm.	1 (1%)
	Coecum, C. ascendens + rechte Flexur	40 (43%)
	C. transversum	11 (12%)
	C. descendens + linke Flexur	9 (10%)
	C. sigmoideum	32 (34%)
Tumorklassifikation embryol.	rechts	52 (56%)
	links	41 (44%)
Metastasierung *	nicht metastasiert	54 (58%)

	metastasiert	38 (42%)
Metastasen *	N0 M0	54 (58%)
	N+ M0	20 (22%)
	Nx M1 (Hep)	19 (20%)
K-ras	Wildtyp	65 (70%)
	mutiert	28 (30%)
Status (Zensus 06/2015)	Lebend	oder 55 (60%)
	unbekannt	
	verstorben	38 (40%)
	tumorbedingtes Ableben	18 (19%)

Tabelle 2 Baseline Charakteristika Patientenkollektiv

\* 1 Patient war aufgrund einer palliativen Resektion ohne Lymphadenektomie nicht zu klassifizieren.

### 2.1.2 Histologische Befunde

Eigenschaften		N = 93
T-Stadium	pT2	17 (18%)
	pT3	76 (82%)
N-Stadium	pN0	59 (63%)
	pN1	18 (19%)
	pN2	15 (16%)
Metastasen *	N0 M0	54 (58%)
	N+ M0	20 (22%)
	Nx M1 (Hep)	19 (20%)
	- N0 M1 (Hep)	6 (6%)

	- N+ M1 (Hep)	13 (14%)
Grading pre-OP-Biopsie	G1	11 (11%)
	G2	58 (62%)
	G3	7 (8%)
	G4	0
	k.A.	17 (18%)
Grading Resektat	G1	0
	G2	59 (63%)
	G3	34 (37%)
	G4	0
Tumortyp	Adenokarzinom	69 (74%)
	Partiell muzinöses Adeno-Ca	23 (25%)
	Siegelringzelliges Adeno-Ca	1 (1%)
K-Ras	Wildtyp	65 (70%)
	mutiert	28 (30%)
	G12A	1 (1%)
	G12C	5 (5%)
	G12D	8 (9%)
	G12V	2 (2%)
	G13D	7 (8%)
	Lokus unbekannt	5 (5%)

**Tabelle 3 Histopathologische Befunde**



## **2.2 Gewebepräparation**

### **2.2.1 Tissue Microarray (TMA)**

Um ein ökonomisches Screening der Tumore zu ermöglichen, wurde ein Tissue Microarray angefertigt. Tissue Microarrays sind ein sowohl in Forschung als auch in der Diagnostik etabliertes Instrument, um hohe Anzahlen von Gewebeproben bei minimalem Aufwand von Antikörpern zu untersuchen (Kononen et al., 1998). Durch die Anordnung vieler Proben auf einem Block kann zudem eine gleichmäßigere Färbung gewährleistet werden. Der TMA erhöht die visuelle Vergleichbarkeit einer Proteinexpression unter dem Lichtmikroskop drastisch. Geeignet ist er sowohl für konventionelle Färbungen als auch Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sowie diverse weitere Verfahren. Die Farbreaktion der immunhistochemischen Färbungen wurde dann im Zuge der Auswertung evaluiert.

### **2.2.2 Erstellung des TMA**

Es wurde jeweils ein repräsentativer Gewebeblock des Tumors bestimmt, der ein möglichst großes Areal an zellulären Tumorb Bestandteilen aufwies. Ferner wurde beachtet, dass entsprechend geringe nekrotische Areale und geringes Tumorstroma vorhanden waren. Gleichermaßen lag das Augenmerk darauf, dass das paraffinierte Gewebe kaum vorbearbeitet und somit noch möglichst dick (2-3mm) war, um die davon zu gewinnende Schnittanzahl zu optimieren. Lichtmikroskopisch wurde auf einem HE-Schnitt das Tumoreareal markiert, da das Stanzen nur unter Makroskopie mit einem manuellen Puncher/Arrayer der Firma Beecher (Beecher Instruments, 53590 Wisconsin, USA) an einem ungefärbten Paraffinblock durchgeführt werden kann. Um die jeweiligen Tumoren auf dem Block wiederzufinden, wurde zuvor ein Raster angelegt, in dem genau verzeichnet ist, welcher Patient wo in den TMA eingearbeitet ist.

Die Tumoren wurden dann jeweils drei Mal gestanzt, um die Tumorerogenität darzustellen. Auf eine gezielte Probe aus der Invasionsfront wurde bewusst verzichtet. Diese Stanzen wurden dann in den Tissue-

Microarray Block, einen reinen Paraffinblock, eingebracht. Jede Stanze maß im Durchmesser 1mm. Jeder Patient war zudem durch drei horizontale Stenzen repräsentiert. In jedem Block waren 4 Patienten horizontal und 11 Patienten vertikal zueinander angeordnet. Dies entsprach jeweils 44 Patienten in Block 1 und 2 sowie den übrigen Patienten in Block 3. Um die Stenzen im Block zu fixieren, wurde dieser dann noch einmal geringgradig erhitzt, das sogenannte „Einschmelzen“. Zur besseren Orientierung wurden jeweils drei vertikal angeordnete Leberstanden im linken oberen Quadranten eingebracht.

## **2.3 Paraffinschnitte**

Mit dem paraffinierten Primärtumorgewebe wurde auf zweierlei Art und Weise verfahren. Die Aufarbeitung des Gewebes für die K-Ras Mutationsanalyse soll zunächst dargestellt werden. Darauf folgt die Prozessierung des Gewebes für die Immunhistochemie.

### **2.3.1 Tumor-DNA**

Um die K-Ras Mutationsanalyse durchzuführen, wird DNA des Tumors benötigt. Diese wird aus Tumorgewebe eines deparaffinierten, ungefärbten Schnittes gewonnen. Die in Paraffin eingebetteten Tumore wurden zunächst auf -14°C heruntergekühlt, dann mittels Rotationsmikrotoms angefrischt, geschnitten und im Wasserbad rehydriert. Im Anschluss erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur.

## **2.4 K-Ras Mutationsanalyse**

### **2.4.1 DNA Extraktion**

Um die nötige DNA für die K-Ras Mutationsanalyse zu gewinnen, wurden zunächst die Blöcke identifiziert, die große und besonders zellreiche Abschnitte des Tumors beinhalteten. Dabei wurde darauf geachtet große Nekroseareale oder Tumorstromaareale auszuschließen, da diese verhältnismäßig wenig verwertbares Erbgut enthalten. Daraufhin wurden die entsprechenden Areale auf dem HE Schnitt markiert und mit dem jeweiligen Block abgeglichen.

Es wurden von jedem Patienten sechs 7µm dicke Leerschnitte angefertigt, welche zunächst unbehandelt getrocknet wurden.

Der Prozess der DNA Extraktion begann mit der Makrodissektion des Tumors. Dazu wurden die Leerschnitte zunächst jeweils zweimal für fünf Minuten in 100% Xylol entparaffiniert. Daraufhin wurde mithilfe eines zuvor in 100% Ethanol desinfizierten Skalpell der Tumor vom Objektträger gekratzt und in ein Tube mit 1,5 ml 100% Ethanol eingebracht. Durch den Alkohol wurden sowohl gleichermaßen die übrigen Xylolreste entfernt als auch die Zellen entwässert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen/min wurde der Alkohol abpipettiert und das Gewebe für fünf Minuten in einem Vakuumexsikkator getrocknet. Die Zellen werden daraufhin in 400µl Proteinase K Puffer eingebracht. Das Suspensat wird daraufhin für 5' bei 95°C gekocht und erneut kurz zentrifugiert.

Weitere 20µl Proteinase K (Qiagen, 5911 Venlo, Niederlande) werden zugegeben und das Zentrifugat wird aufgewirbelt, um mehr Kontaktfläche für das Enzym zu bieten. Abschließend wird der Ansatz für 18h bei 56°C inkubiert.

#### **2.4.2. Amplification-refractory mutation system Polymerasekettenreaktion (ARMS-PCR)**

##### **2.4.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur zyklischen Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen. Ein Zyklus besteht aus dem Aufschmelzen der DNA Fragmente, dem Binden von Primern sowie der Synthese der jeweils komplementären DNA-Stränge.

##### **2.4.2.2 ARMS-PCR**

Der Vorteil der ARMS-PCR ist, dass Punktmutationen spezifisch erkannt werden können. Hierfür wurden Oligonukleotidprimer entwickelt, welche komplementär zu einer der sieben häufigsten Mutationen des Codons 12 oder 13 des K-ras Onkogens sind (Little, 2001). Nach Bindung sollte also nur DNA von mutierten Proben vervielfältigt werden. Um die Vervielfältigung von Wildtyp-DNA einzudämmen, wurde diese mittels Locked Nucleic Acid (LNA) unterdrückt. Unter LNA versteht man Nukleotide, deren Riboseanteil durch eine zusätzliche Methylenbrücke zwischen dem C2 und C4-Atom in der 3'-endo-

Form fixiert wird (Grunweller and Hartmann, 2007). Die Replikation der Wildtyp-DNA wird unterbunden, indem die LNA hochaffin die Wildtyp-DNA bindet und dadurch die Schmelztemperatur anhebt. Somit kommt es bei den standardisierten PCR-Zyklen nicht zur Replikation der Wildtyp-DNA, da die benötigte Trennung nicht mehr stattfindet (Koshkin et al., 1998) (K. Singh et al., 1998).

Dazu wurden 3 Reihen angesetzt. Jede davon mit einem Mix aus 0,3 µl Taq Polymerase sowie entweder 47µl 0mM LNA, 47µl 1mM LNA oder 47µl 2mM LNA. Um die 50µl zu vervollständigen, wurden 300µg DNA in 3µl ddH<sub>2</sub>O gelöst hinzugegeben. Die Konzentration wurde mittels Photometrie bestimmt und im Anschluss die PCR durchgeführt.

### 2.4.3 Schmelzpunktanalyse mit dem Light Cycler

Die Schmelzpunktanalyse beschreibt ein Verfahren, bei dem DNA-Doppelstränge kontinuierlich erwärmt werden, bis es zum Doppelstrangbruch kommt. Der sogenannte Schmelzpunkt ist der Zeitpunkt, zu dem 50% der Stränge nicht mehr in der Doppelstrangkonfiguration vorliegen. Der Light-Cycler (Roche Diagnostics GmbH, 82377 Penzberg Deutschland) ist ein automatisierter Detektor dieser Schmelzpunkte, die für jede der untersuchten KRas-Mutationen eine spezifische Zeit vorgeben. Dieser Schmelzpunkt ist unterschiedlich, da die Temperatur, welche zum Doppelstrangbruch benötigt wird, von der jeweils unterschiedlichen Anzahl der Adenin-Thymin bzw. Guanin-Cytosin Basenpaare und der damit verbundenen Wasserstoffbrückenbindungen abhängt.

Das Auftragen der Kurven erfolgt live am Computer. Zum Vergleich werden Positivkontrollen für die Mutationen G12D und G13D eingesetzt.

Genotyp		Schmelztemperatur	Temp.bereich	Kontroll RKT
12D	13D	51,8 °C	ca. 52 °C	Ca. 52 °C
12G	13C	56,2 °C		

12G	13D	57,6 °C	56-59 °C	
12T	13G	58,5 °C		
12D	13G	61,0 °C		
12A	13G	61,2 °C	61-62 °C	61-62 °C
12V	13G	61,9 °C		
12R	13G	63,2 °C	63-64 °C	
12S	13G	64,0 °C		
12G	13G	64,7 °C	-	64,7 °C
12C	13G	68,3 °C	ca. 68 °C	ca. 68 °C

Tabelle 4 Herstellerangaben Schmelztemperatur

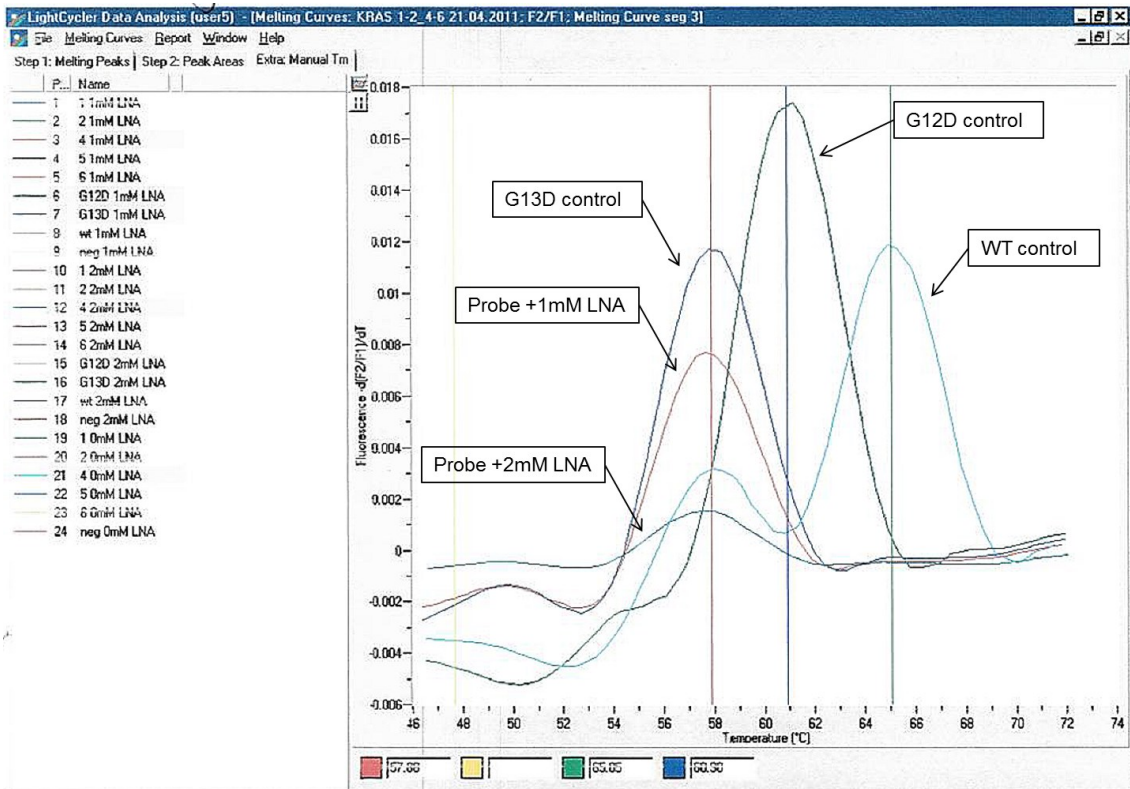


Abbildung 2 exemplarische LightCycler-Kurve

Exemplarische Darstellung der LightCycler-Kurve eines Patienten. Sowohl der Peak mit 1mM LNA als auch mit 2mM LNA stimmen mit dem G13D-Peak überein. Es liegt eine G13D Mutation vor.

Nach Abschluss der PCR wurden die Amplifikate zunächst kühl gelagert. In der Zwischenzeit wurde der Sondenmix für die Schmelzpunktanalyse vorbereitet.

Der Mix bestand hierbei aus 6,4µl ddH<sub>2</sub>O, 1,6µl MgCl<sub>2</sub>, 1,0µl der Anchorsonde sowie 1,0µl der Sequencersonde. Jeweils 10µl Sondenmix wurden daraufhin in die Glaskapillaren des Light Cyclers zusammen mit 10µl Amplifikat eingebracht. Nach kurzer Zentrifugation wurde dann die Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Daraufhin wurde die Temperaturdifferenz des gemessenen Peaks von den Positivkontrollen bzw. der Wildtypkontrolle bestimmt. Anhand von Tabellen erfolgte dann die Evaluation der Temperaturdifferenzen. Für jeden Patienten wurde sowohl das Amplifikat mit 1mM Locked Nucleic Acid (LNA) als auch mit 2mM LNA und 0mM LNA durchgeführt. Locked Nucleic Acid unterdrückt die Amplifikation von Wildtyp-DNA, welche bedingt durch die Entnahmetechnik der Tumor-DNA gelegentlich ebenfalls gewonnen wird. In aller Regel konnten Mutationen bei 1mM LNA identifiziert werden, da 2mM LNA nahezu alle Peaks unterdrückte. In einigen Fällen gab es aber auch keine Peaks in 1mM LNA, dafür aber verschobene oder verformte Kurven in den Proben ohne LNA.

Ergaben sich bei diesen Schmelzpunktanalysen Kurven, deren Peak mit dem der Wildtypkontrollen übereinstimmte, welche aber eine asymmetrische Form zeigten oder gar mehrere Peaks aufwiesen, wurde gegebenenfalls eine Sequenzierung des Amplifikats durchgeführt.

#### **2.4.4 Sequenzierung**

In Fällen, in denen die Mutation nicht eindeutig mit dem LightCycler zu klären war, wurde eine Sequenzierung des betroffenen Exons durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte automatisiert mittels GenomeLab™ - Analysesystem (Beckman Coulter, 92821 Brea, CA, USA) nach der Sanger-Methode. Hierbei wird der DNA-Doppelstrang erhitzt, aufgetrennt und mit einem Ansatz von regulären Desoxynukleotidtriphosphaten sowie mit jeweils unterschiedlich farblich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) versetzt. Mithilfe eines spezifischen Primers wird ein komplementärer Strang synthetisiert. Immer dann, wenn anstatt der normalen Nukleotide die Didesoxy-Variante eingebaut wird, kommt es zum Syntheseabbruch, da diese Basen an ihrem 3'-Ende über keine Hydroxylgruppe verfügen, welche zur Verknüpfung benötigt würde. Da die ddNTPs per Zufallsprinzip eingebaut werden, wird somit

eine Vielzahl unterschiedlich langer Fragmente erstellt. Diese werden vom Analysegerät mittels Elektrophorese sortiert. Die fluoreszenzmarkierten Basen werden von einem Laser angeregt, woraufhin die emittierte Strahlung detektiert und chromatographisch in eine Sequenz umgewandelt wird. Die zu den jeweiligen Didesoxynukleotidtriphosphaten komplementäre Sequenz stellt die gesuchte DNA-Sequenz dar (Sanger and Coulson, 1975).

## **2.5 Immunhistochemie**

### **2.5.1 Allgemeines zur Immunhistochemie**

Immunhistochemie beschreibt ein Verfahren zur Darstellung antigener Strukturen in formalinfixiertem Paraffingewebe. Um diese antigenen Strukturen nachzuweisen, wird ein spezifischer Antikörper benötigt, der diese Strukturen bindet. Die Antikörper werden in einem flüssigen Medium auf das zu untersuchende Gewebe geschichtet. Sollten Antigene Strukturen vorhanden sein, bindet der Antikörper. Der Nachweis der Bindung erfolgt mittels verschiedener, im Weiteren beschriebener Verfahren.

Die Antikörper werden hergestellt, indem man Tiere (Hase, Maus, Schwein und Ziege) aufgereinigtem Antigen aussetzt, sodass diese Antikörper gegen selbige Antigene bilden, welche dann gewonnen werden können.

### **2.5.2 Nachweis einer Antigen-Antikörper-Bindung**

Um die Bindung eines Antikörpers nachweisen zu können, muss dieser zuvor markiert worden sein. Eine Markierung kann entweder mittels fluoreszierender Farbstoffe oder mittels gekoppelter Enzyme geschehen. Erstere können nach Anregung zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge gebracht werden. Enzymgekoppelte Antikörper setzen nach Bindung ein Substrat um, welches einen Farbumschlag erzeugt.

#### **2.5.2.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Zunächst wurde vom Tissue-Microarray ein HE-Schnitt angefertigt. Dieser dient der besseren Orientierung und Vergleichbarkeit mit den immunhistochemischen Schnitten.

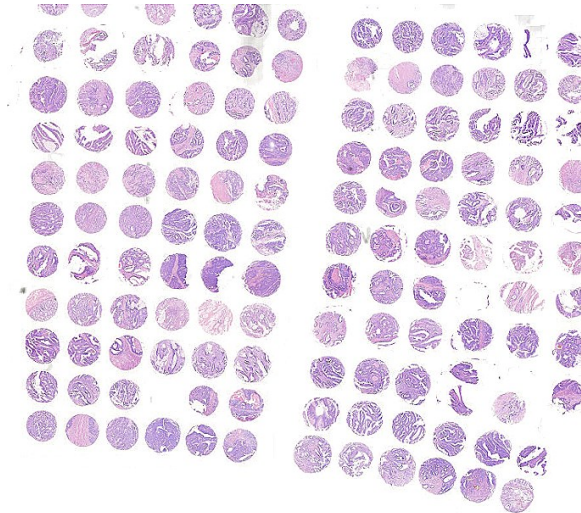
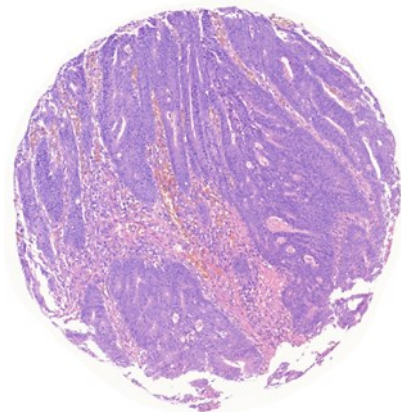


Abbildung 3 Übersichtsfotos Tissue-Microarray (H.E. Färbung)

Durch die Immunhistochemie wurden verschiedene spezifische Proteine, in dieser Arbeit pERK,  $\beta$ -Catenin, c-MYC, PGK1, MMP-9, mTOR, VEGFR3, CXCR4, am Tissue-Microarray detektiert.

Die Färbungen wurden standardisiert, nach Herstellerangaben mittels einem Färbeautomaten (Ventana Benchmark XT, Ventana medical systems inc. 85755 Tuscon, AZ, USA). Die einzelnen Protokollspezifitäten sowie Verdünnungen und Chargen-Nummern der Antikörper sind unter 5.1.1 aufgelistet.



## 2.6 Auswertung TMA

Die jeweiligen Schnitte wurden mithilfe des Zeiss Mirax Desk (Carl Zeiss AG, 73443 Oberkochen, DE) in maximaler Auflösung (Vergrößerung bis 400-fach) abfotografiert bzw. eingescannt und am Computer mithilfe des Zeiss Mirax-Viewers ausgewertet. Bei den c-MYC-Färbungen war es aufgrund geringer



Kontraste nötig den histologischen Schnitt direkt unter dem Lichtmikroskop auszuwerten.

## **2.7 Statistik**

Nach vorausgegangener Beratung des Instituts für medizinische Biometrie der Universität Tübingen erfolgte die statistische Auswertung.

Die statistischen Untersuchungen wurden allesamt mittels „IBM SPSS Statistics Version 24.0.0.1“ (60611 Chicago, IL, USA) durchgeführt. Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% entsprechend einem P-Wert von  $< 0,05$  festgelegt. Bei 4-Felder-Tafeln wurde ein Chi-Quadrat-Test, bzw. falls nötig ein Fisher's Exact Test, durchgeführt. Für die Überlebensanalysen wurde mittels Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Test das tumorabhängige Überleben (spezifisch für das CRC) berechnet.

## **3 Ergebnisse**

Im nun folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse unserer Untersuchung aufgeführt. Primäre Endpunkte sind Zusammenhänge zwischen Expression der

untersuchten Marker und den jeweiligen Metastasierungsverhalten sowie das tumorabhängige Überleben. Als sekundäre Endpunkte sind weitere mit Prognose und/oder Metastasierungsverhalten in Verbindung gebrachte Faktoren und deren Abhängigkeit von der Proteinexpression aufgeführt. Signifikante p-Werte ( $p < 0.05$ ) sind jeweils hervorgehoben.

### 3.0.1 Primäre Endpunkte

- Vorliegen synchroner Metastasen
- Vorliegen lokoregionärer lymphogener Metastasierung ohne Fernmetastasen
- Vorliegen hepatischer Metastasen (+/- lokoregionärer Lymphknotenmetastasen)
- Tumorspezifisches Überleben

### 3.0.2. Sekundäre Endpunkte

Assoziationen zwischen der Proteinexpression und

- Grading
- embryologischen Ursprung (rechtes vs. linkes Hemikolon)
- V-Status (nach TNM)
- L-Status (nach TNM)
- Vorliegen einer muzinösen Histologie

## 3.1 EGFR-Signalweg

### 3.1.1. KRAS

28 der 93 Patienten (30%) zeigten eine K-Ras Mutation. Von diesen K-Ras Mutationen lagen 16 auf dem Codon 12 und 7 auf dem Codon 13.

#### Mutationstyp

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Lokus unbekannt	5	5,4	5,4	5,4

G12A	1	1,1	1,1	6,5
G12C	5	5,4	5,4	11,8
G12D	8	8,6	8,6	20,4
G12V	2	2,2	2,2	22,6
G13D	7	7,5	7,5	30,1
Wildtyp	65	69,9	69,9	100,0
Gesamt	93	100,0	100,0	

Tabelle 5 Mutationstypen K-Ras

Fünf weitere ließen sich mittels Schmelzpunktanalyse zwar vom Wildtyp abgrenzen, aber auch mittels Sequenzierung nicht eindeutig einer der oben beschriebenen Punktmutationen zuordnen. Im Rahmen der Auswertung wurde aufgrund der geringen Größe der jeweiligen Subgruppe auf eine Differenzierung zwischen den Mutationstypen verzichtet.

Von den 28 K-Ras mutierten Patienten wiesen 11 Patienten eine Metastasierung auf: 9 der 11 metastasierten Patienten waren hepatisch, 2 der 11 Patienten waren isoliert regionär lymphogen metastasiert.

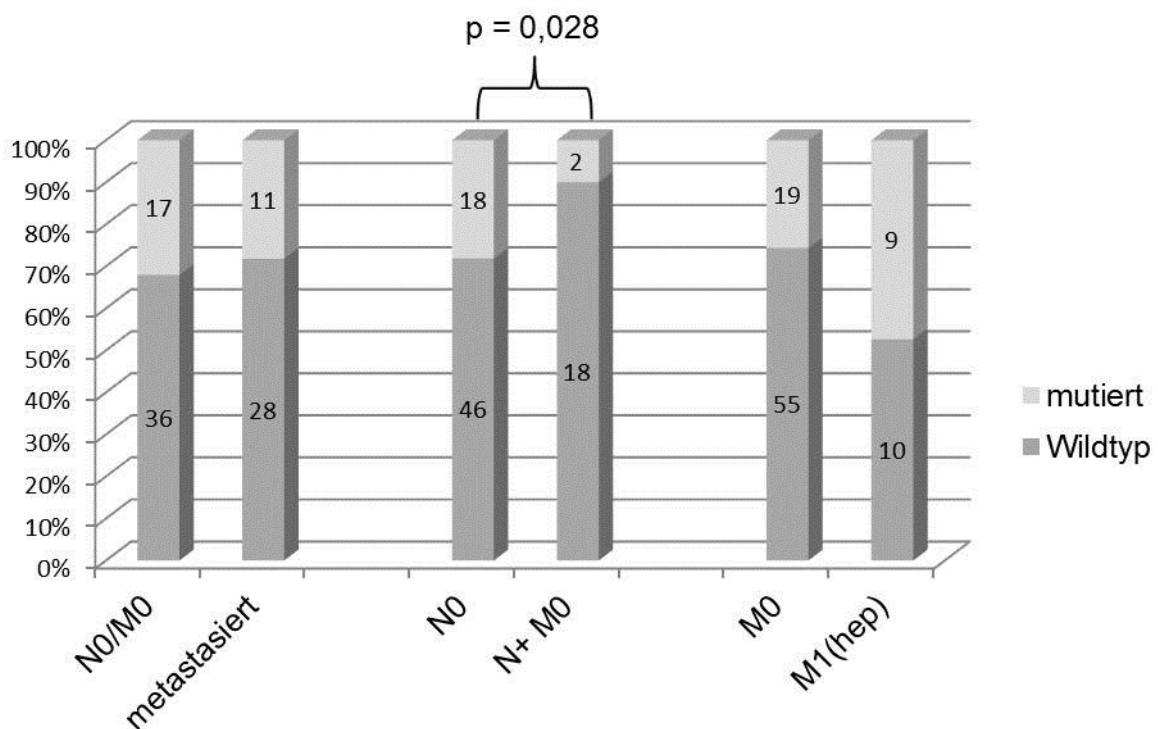


Tabelle 6 primäre Endpunkte K-Ras

In unserem Kollektiv zeigte sich keine Abhängigkeit zwischen dem K-Ras Status und dem generellen Vorliegen synchroner Metastasen. Interessanterweise lag in unserem Kollektiv eine signifikant geringere Anzahl an K-Ras mutierten Patienten unter den isoliert lymphogen metastasierten Patienten (FET  $p = 0,028$ ) vor. Nur 10% der mutierten Patienten zeigten isolierte Lymphknotenmetastasen. Der Trend hinsichtlich einer Häufung zwischen K-Ras mutierten Patient und Lebermetastasen war statistisch nicht signifikant (FET  $p = 0,092$ ).

In der oben stehenden Analyse sind wie bereits zuvor beschrieben diejenigen Patienten, welche hepatisch und lymphogen metastasiert sind, strikt von denen getrennt, die nur lymphogen metastasiert sind. Daher wurde noch eine Subgruppenanalyse durchgeführt, in der alle nodal positiven Patienten auftauchen. Das jeweilige M-Stadium ist ebenfalls angegeben.

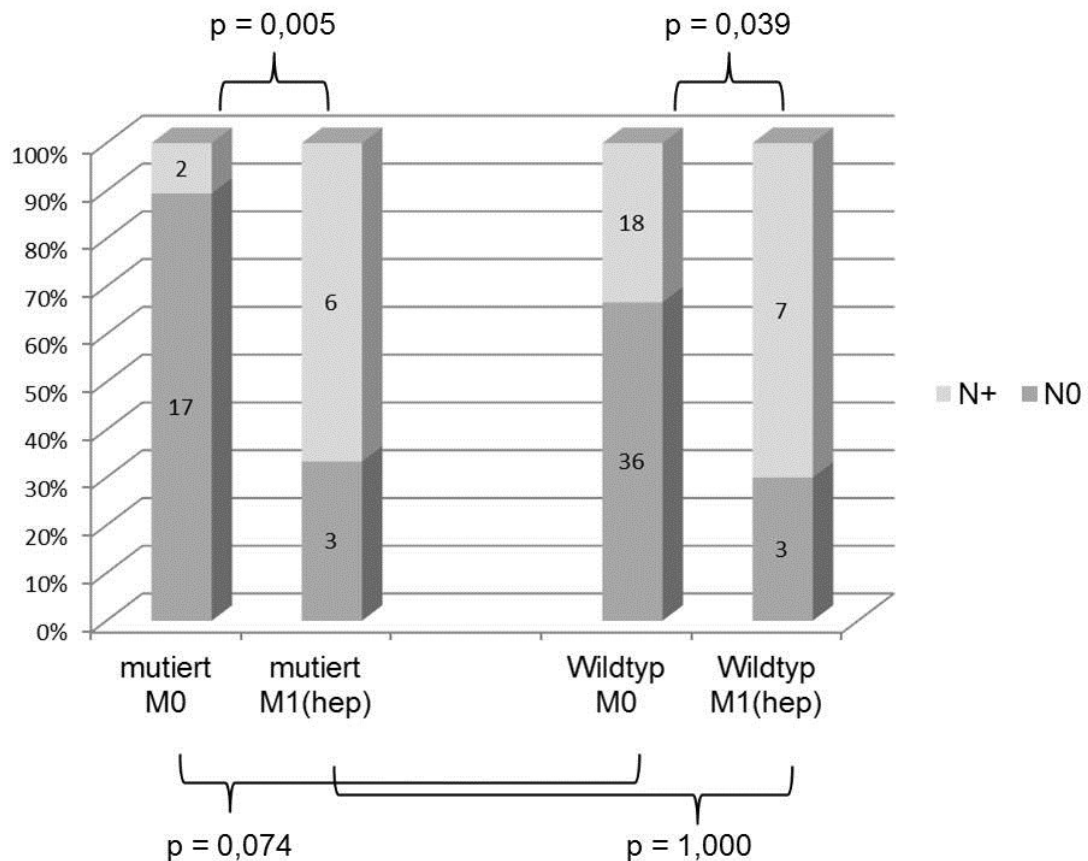


Abbildung 4 Sekundäre Endpunkte K-Ras: Nodalstatus

Hier zeigt sich zunächst einmal kein Unterschied zwischen den lebermetastasierten Patienten in Abhängigkeit von K-Ras hinsichtlich der Rate an simultanen Lymphknotenmetastasen. Gleiches gilt auch für die nicht organmetastasierten Patienten, wobei hier ein Trend vorhanden scheint. Der Prozentsatz an nodaler Positivität ist unter den hepatisch metastasierten Patienten signifikant höher als bei den nicht lebermetastasierten Patienten.

Hinsichtlich der sekundären Endpunkte zeigte sich unter den Karzinomen mit partiell muzinöser Histologie eine geringere Anzahl an K-Ras mutierten Tumoren (FET  $p = 0,038$ ). Allerdings ist unklar, wie viele dieser Tumoren nach heutigem Stand als „muzinöses“ Adenokarzinom klassifiziert würden, da nicht für alle Tumoren die gewünschten 50% an muzinösen Zellen im histopathologischen Befund angegeben wurden.

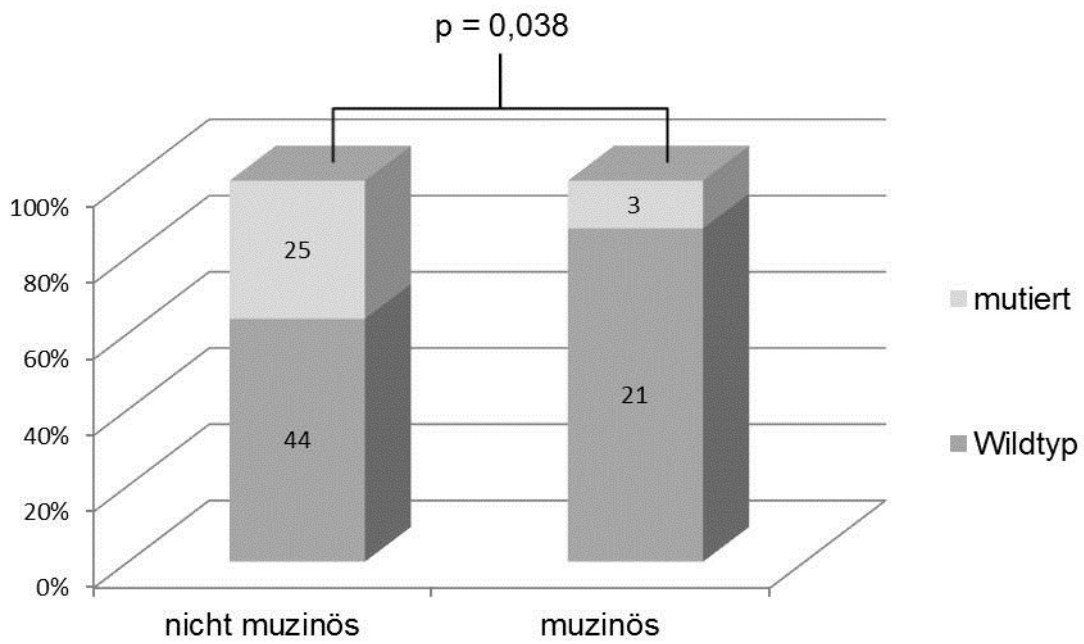


Abbildung 5 Sekundäre Endpunkt K-Ras: Muzinöse Histologie

Hinsichtlich der weiteren sekundären Endpunkte ergaben sich statistisch keine signifikanten Zusammenhänge. Das tumorabhängige Überleben ist statistisch gesehen nicht unterschiedlich zwischen mutierten und Wildtyp-Patienten ( $p = 0,229$ ).

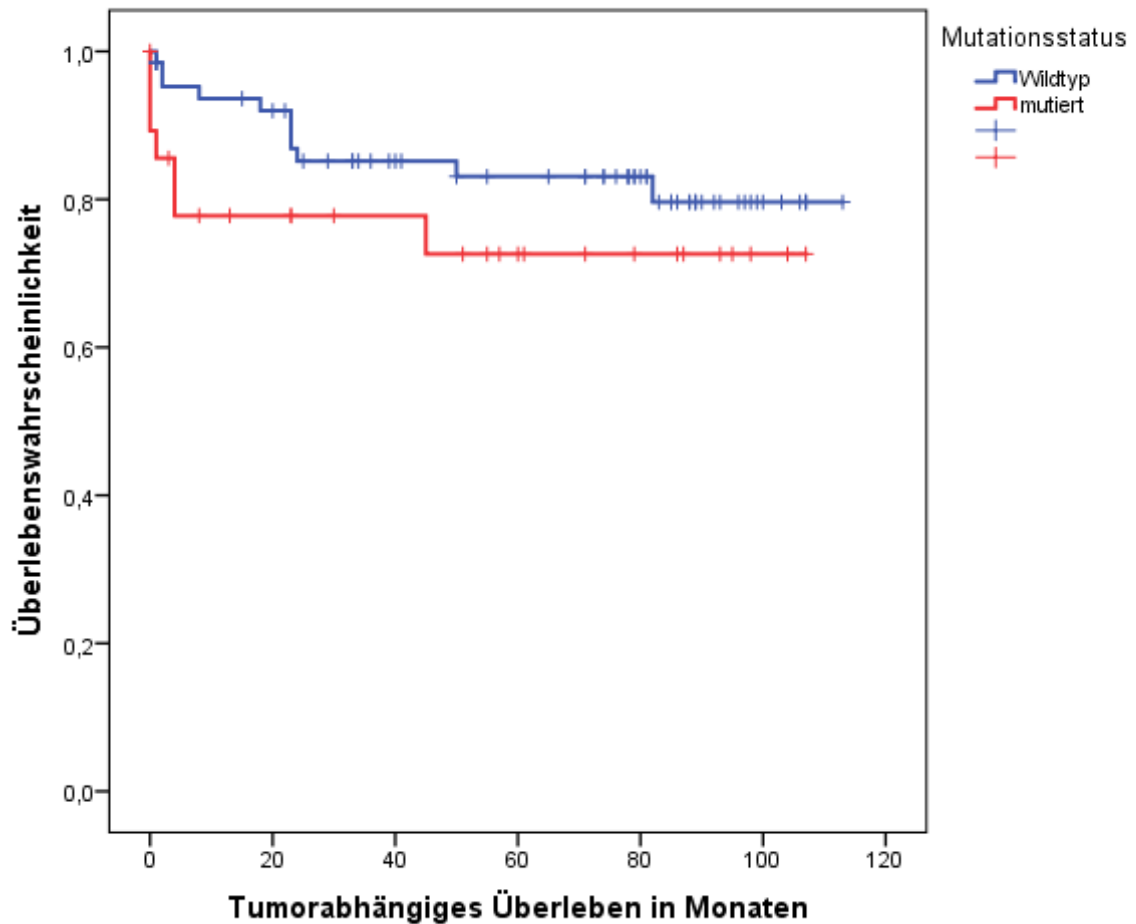


Abbildung 6 Kaplan-Meier-Kurve K-Ras

### 3.2 MAP-Kinase Signalweg

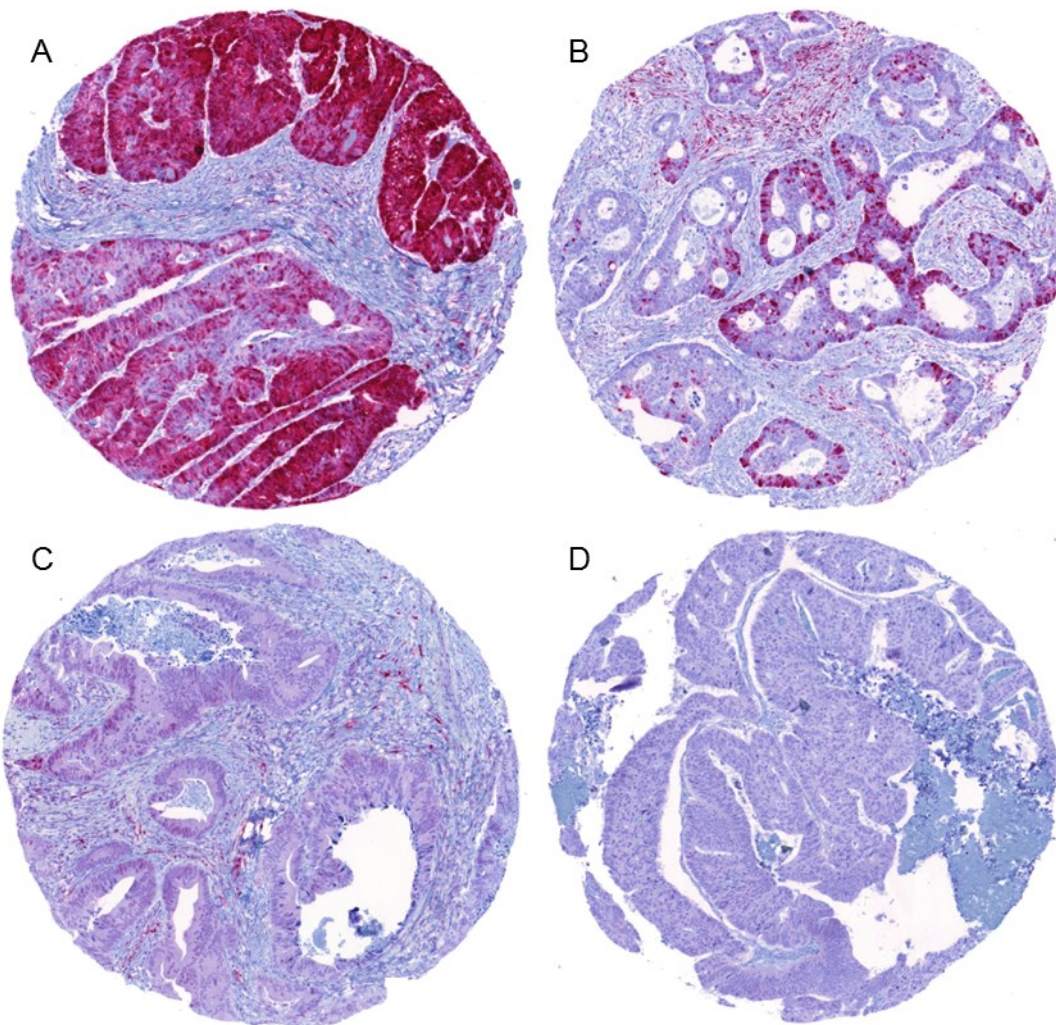
#### 3.2.1 pERK

Die nukleäre Expression von pERK wurde semiquantitativ erfasst. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde mit jeweils null bis drei Punkten bewertet. Die addierte Punktzahl wurde wie folgt eingeteilt:

Gruppe	Gesamtpunktzahl	Gruppierung	N = 93
I	0	negativ	29
II	1 – 3	schwach positiv	35

III	4 – 6	mittel positiv	18
IV	7 - 9	stark positiv	11

**Tabelle 7 Färbegrad pERK**



**Abbildung 7 Färbebeispiel pERK**

Abbildung 7: Aufgeführt hier sind beispielhafte repräsentative Sektionen des Tissue-Microarrays vierer unterschiedlicher Patienten: starke Färbung (A), mittlere Färbung (B), schwache Färbung (C), keine Färbung (D).



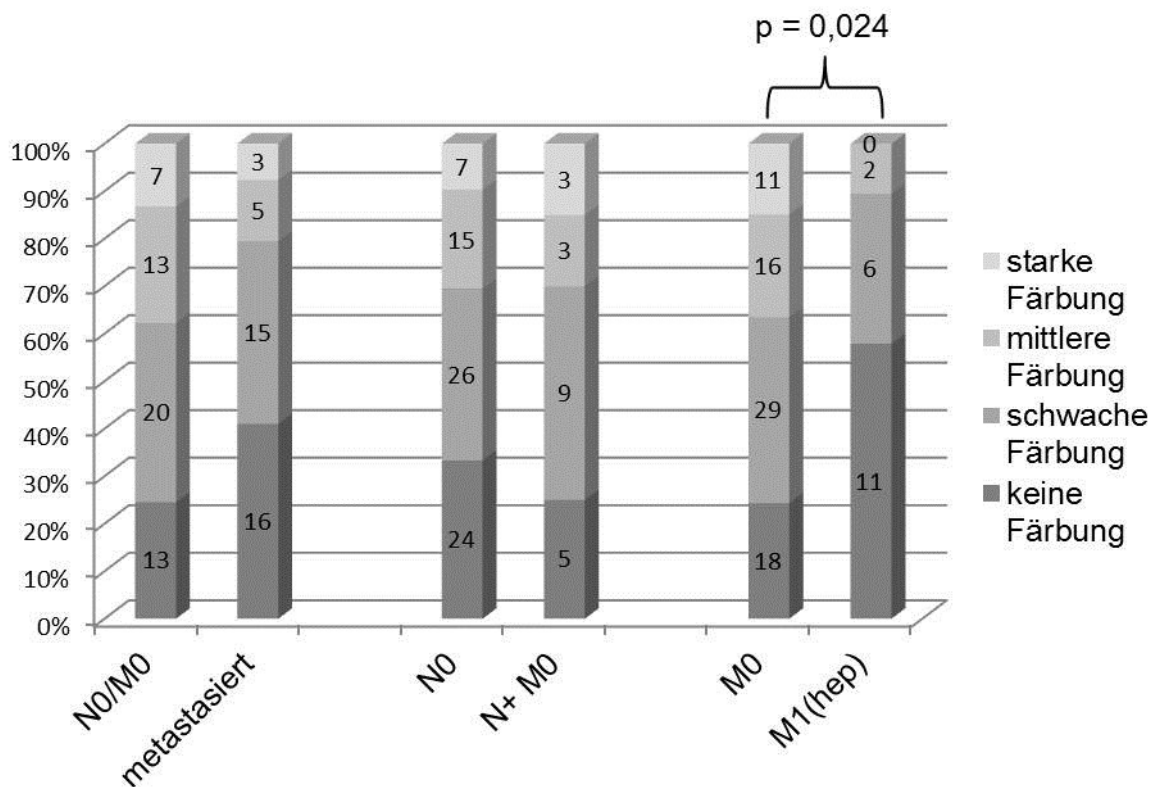


Abbildung 8 Primäre Endpunkt pERK

In Gruppe I zeigten 55% (16 / 29) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil war mit aufsteigender pERK-Expression tendenziell rückläufig mit respektiven 43% (15 / 35) in Gruppe II, 27% (5 / 18) in Gruppe III und 30% (3 / 10) in Gruppe IV (CQ p=0,246).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich mit absteigender pERK-Expression eine Abhängigkeit zu den in dieser Gruppe gehäuft auftretenden Lebermetastasen. 38% (11 / 29) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen, 17% (6 / 35) in Gruppe II, 11% (2 / 18) in Gruppe III und keiner (0 / 11) in Gruppe IV (Chi-Quadrat p=0,024).

Ebenfalls bemerkenswert bleibt, dass im Verlauf des Follow-Ups 4 Patienten metachrone Lebermetastasen entwickelten und ein Patient eine metachrone Lungenmetastase. Sowohl die pulmonalen als auch 75% (3 / 4) der metachronen Lebermetastasen traten bei Patienten auf, welche keine pERK-Expression im Primärresektat zeigten. Der vierte metachron hepatisch metastasierte Patient zeigte eine schwache pERK-Färbung des Primarius.

Ein direkter Zusammenhang mit lymphogener Metastasierung konnte nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 17% (5 / 29) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 25% (9 / 35) in Gruppe II, 17% (3 / 18) in Gruppe III, sowie 30% (3 / 10) in Gruppe IV.

Bei den sekundären Endpunkten zeigten sich zwei interessante Aspekte. Sowohl für die Patienten, welche eine Lymphangiosis carcinomatosa zeigten, als auch für die Patienten, die ein veneninvasives Wachstum in der histopathologischen Aufarbeiten zeigten, galt, dass sich dies gehäuft bei den Patienten zeigte, welche geringere Färbung für pERK aufwiesen.

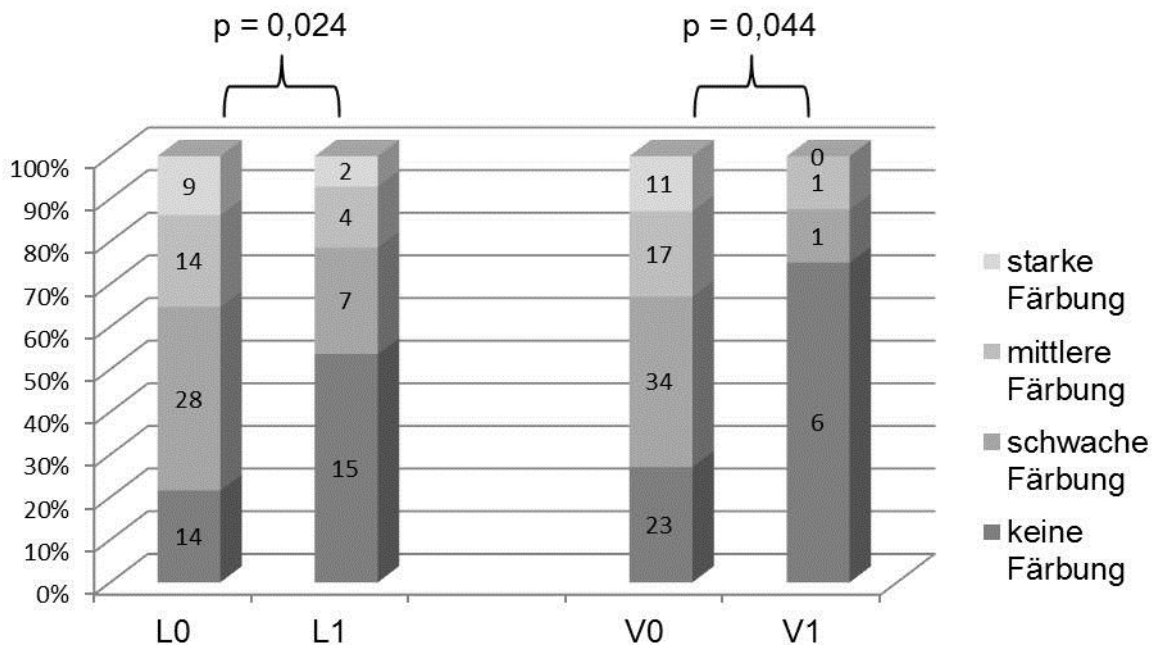


Abbildung 9 Sekundäre Endpunkte pERK: L- & V-Status

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der pERK-Expression, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu Gunsten der Patienten, die vermehrt pERK exprimierten (LR p = 0,001).

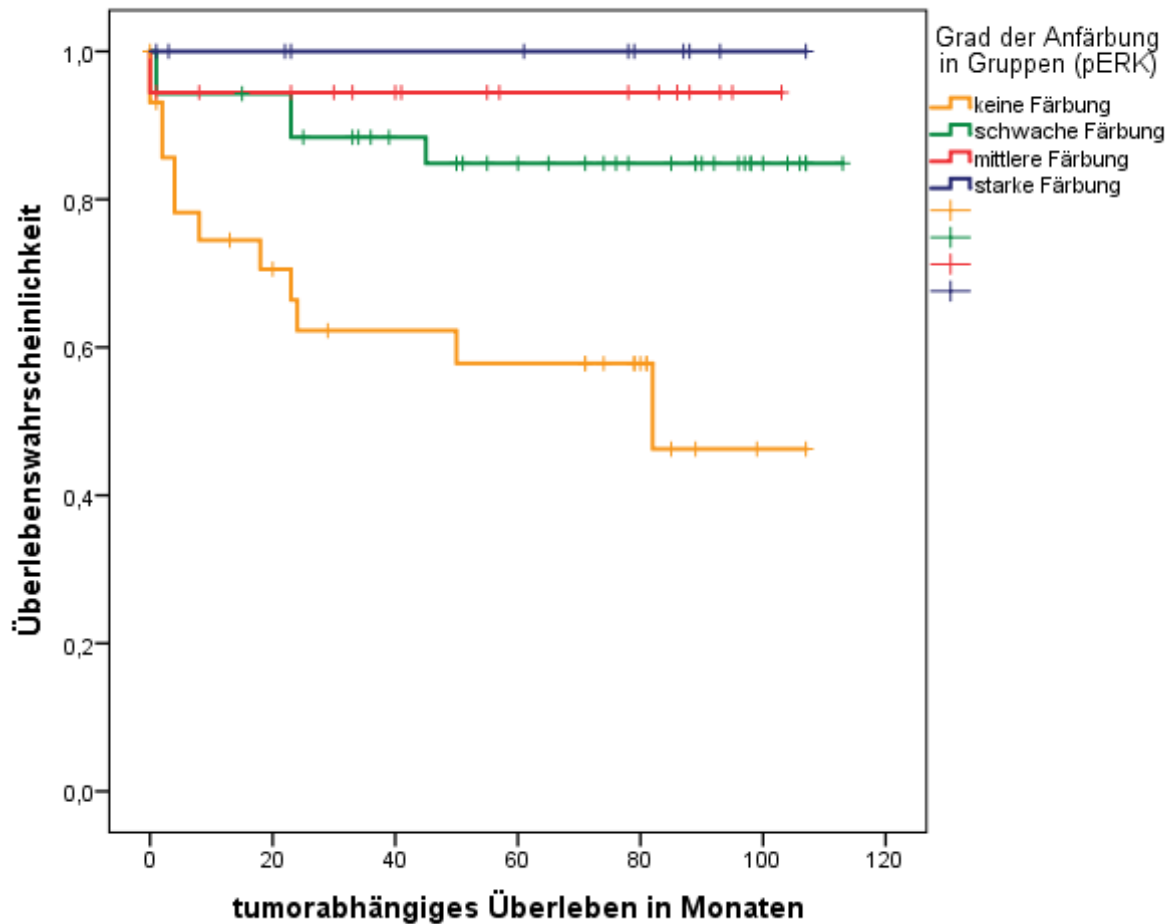


Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurve pERK

Aufgrund der nicht gänzlich vergleichbaren Gruppengrößen (n=18 in Gruppe III und n=11 in Gruppe IV) wurde separat eine Überlebens-Statistik nur für die Gruppen I (negative Färbung) und II (schwache Färbung) angefertigt. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit einem (LR p=0,006).

### 3.2.2 mTOR

Die zytoplasmatische Expression von mTOR wurde semiquantitativ erfasst. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde mit jeweils null bis drei Punkten bewertet. Die addierte Punktzahl wurde wie folgt eingeteilt:

Gruppe	Gesamtpunktzahl	Gruppierung	N = 93
--------	-----------------	-------------	--------

I	0	negativ	5
II	1 – 3	schwach positiv	18
III	4 – 6	mittel positiv	44
IV	7 - 9	stark positiv	26

**Tabelle 8 Färbegrad mTOR**

In Gruppe I zeigten 80% (4 / 5) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag bei 44% (8 / 18) in Gruppe II, 50% (22 / 44) in Gruppe III und 20% (5 / 25) in Gruppe IV.

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich keine Abhängigkeit von der mTOR-Expression. 20% (1 / 5) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen, 28% (5 / 18) in Gruppe II, 25% (11 / 44) in Gruppe III und 8% (2 / 24) in Gruppe IV.

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 60% (3 / 5) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 17% (3 / 18) in Gruppe II, 25% (11 / 44) in Gruppe III, sowie 12% (3 / 25) in Gruppe IV.

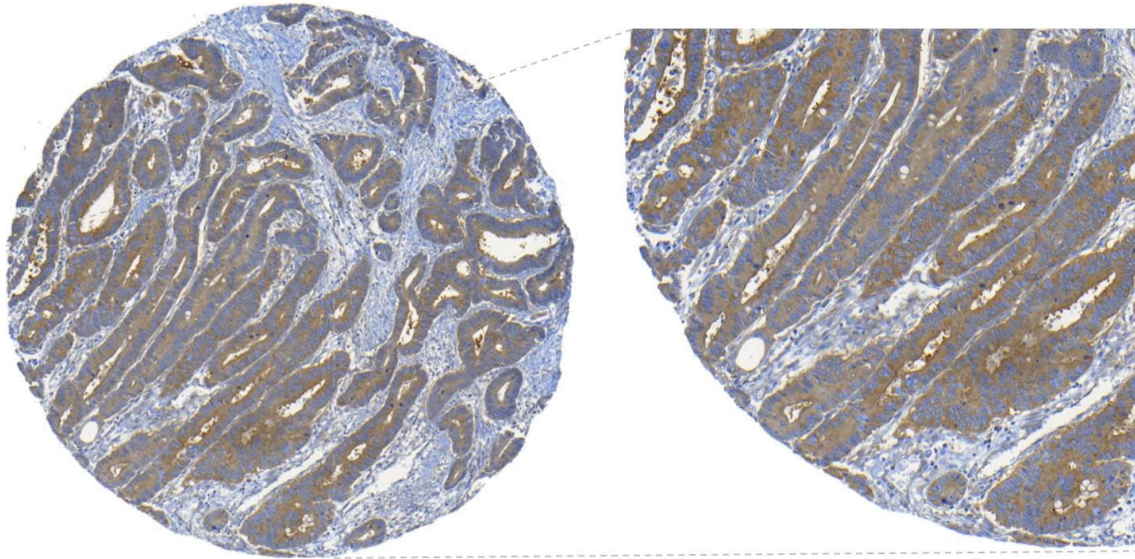


Abbildung 11 Färnebeispiel mTOR

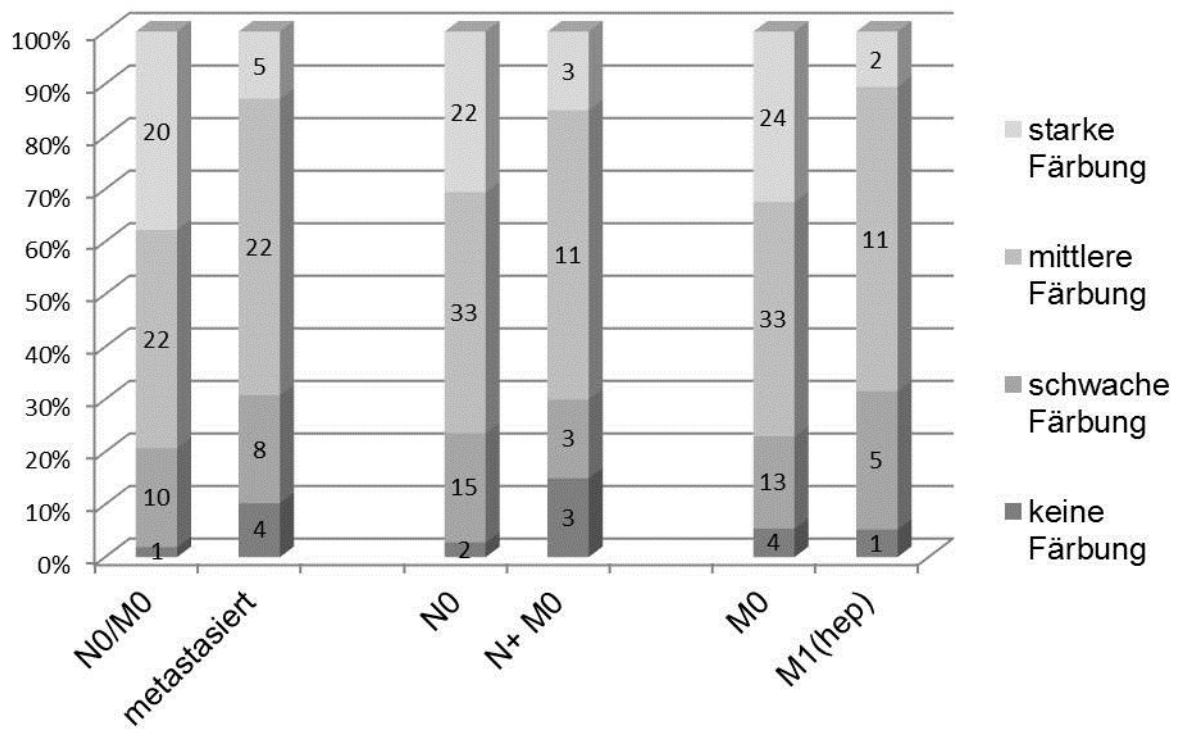


Abbildung 12 Primäre Endpunkte mTOR

Hinsichtlich der sekundären Endpunkte zeigte sich kein statistischer Zusammenhang mit der mTOR-Expression.

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der mTOR-Expression, so zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu Gunsten der Patienten, die vermehrt mTOR exprimierten. In Gruppe I liegt das 5-Jahres-Überleben bei knapp 60%. Im Vergleich dazu liegen das 5-Jahres Überleben in Gruppe II bei ca. 65%, in Gruppe III bei 80% und in Gruppe IV bei 95%.

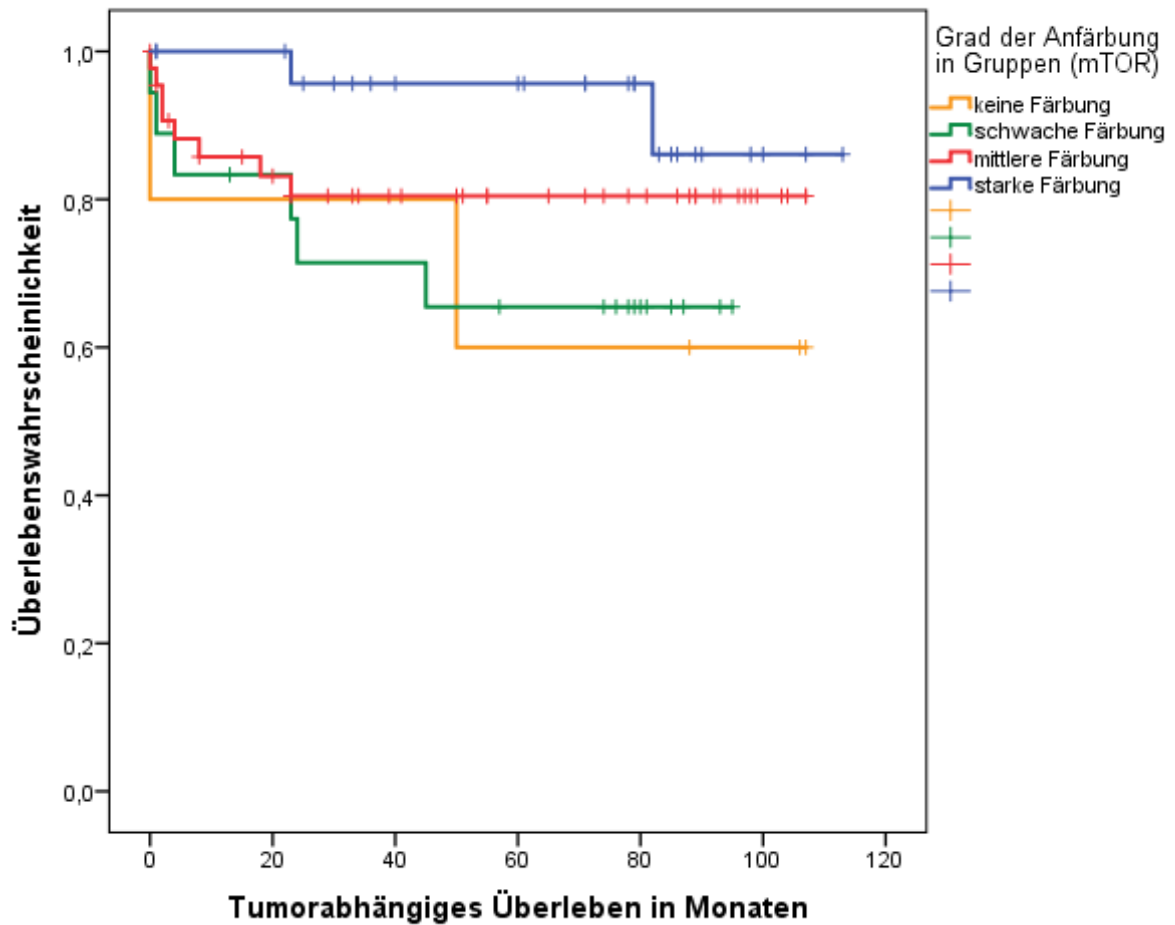


Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurve mTOR

### 3.3 Wnt-Signalweg

#### 3.3.1 $\beta$ -Catenin

Die Expression von  $\beta$ -Catenin wurde semiquantitativ erfasst. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde mit jeweils null bis zwei Punkten bewertet. Keine Punkte gab es, wenn keine nukleäre Expression

von  $\beta$ -Catenin nachzuweisen war. Ein Punkt wurde vergeben, wenn ein geringer Teil der Zellen nukleäres  $\beta$ -Catenin exprimierte und wenn der Großteil der Zellkerne  $\beta$ -Catenin exprimierte, wurden zwei Punkte vergeben. Die addierte Punktzahl wurde wie folgt eingeteilt:

Gruppe	Gesamtpunktzahl	Gruppierung	N = 93
I	0	negativ	25
II	1 – 3	schwach positiv	33
III	4 – 6	stark positiv	34

**Tabelle 9 Färbegrad  $\beta$ -Catenin**

In Gruppe I zeigten 56% (14 / 25) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 45% (15 / 33) und in Gruppe III bei 29% (10 / 34) (CQ  $p=0,113$ ).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich keine Abhängigkeit von der  $\beta$ -Catenin-Expression. 24% (6 / 25) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen, 21% (7 / 33) in Gruppe II sowie 17% (6 / 35) in Gruppe III.

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte ebenfalls nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 32% (8 / 25) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 24% (8 / 33) in Gruppe II und 12% (4 / 34) in Gruppe III.

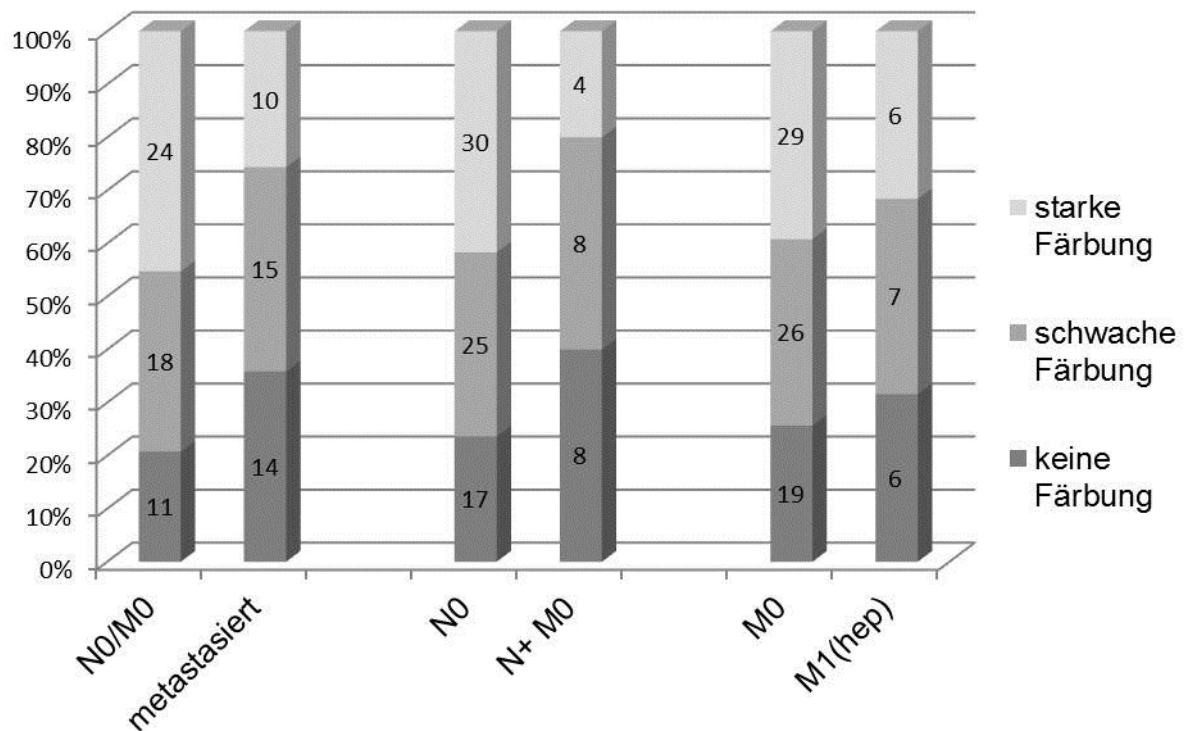


Abbildung 14 Primäre Endpunkte  $\beta$ -Catenin

Hinsichtlich der Differenzierung zeigte sich ein signifikanter, invers verlaufender Zusammenhang zwischen der  $\beta$ -Catenin-Expression und dem Grading der Tumoren. In Gruppe I waren 64% (16 / 25) schlecht differenzierte Tumoren. Demgegenüber stehen 36% (12 / 33) in Gruppe II sowie 17% (6 / 35) in Gruppe III (CQ  $p=0,001$ ).

Ein statistisch nicht signifikanter Trend zur Abhängigkeit von  $\beta$ -Catenin-Expression und einer muzinösen Differenzierung scheint zu bestehen. 40% (10 / 25) in Gruppe I waren muzinöse Adenokarzinome. Dies traf auf 27% (9 / 33) der Tumoren in Gruppe II sowie auf 14% (5 / 35) der Tumoren in Gruppe III ebenfalls zu (CQ  $p=0,078$ ).



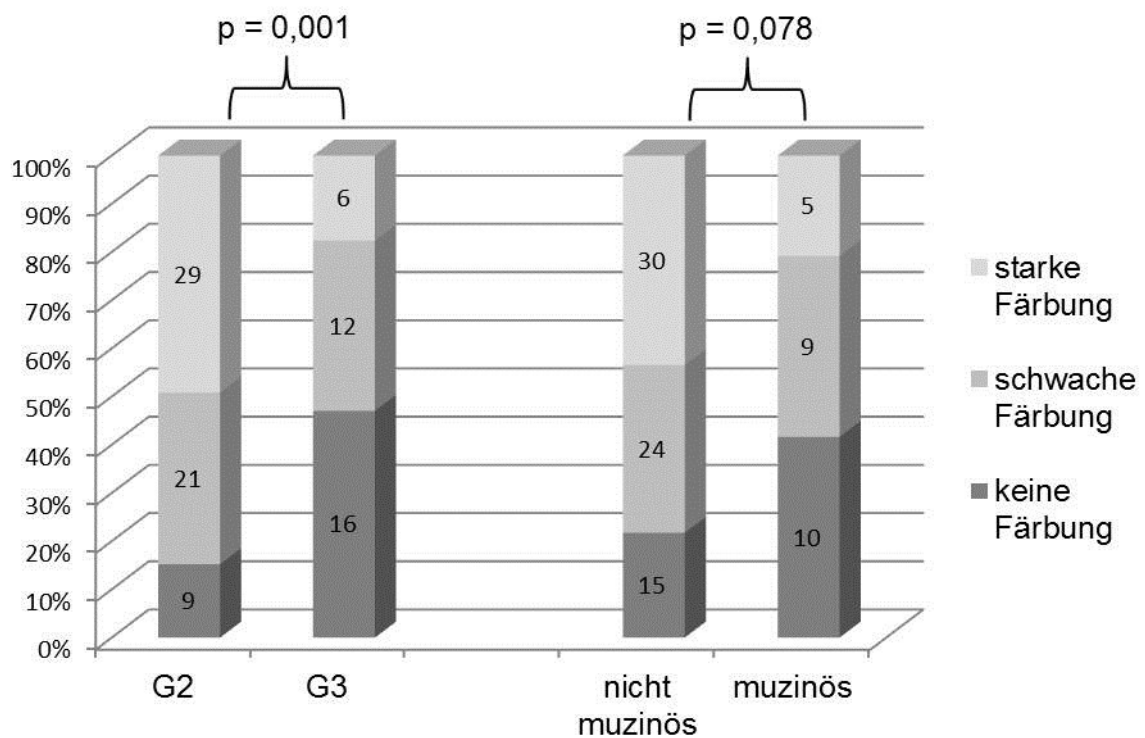


Abbildung 15 Sekundäre Endpunkte  $\beta$ -Catenin: Grading & Muzinöse Histologie

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der  $\beta$ -Catenin-Expression, so zeigt sich trotz der signifikanten Korrelation zum Tumorgrading kein Unterschied beim tumorbedingten Überleben der Patienten. In Gruppe I liegt das 5-Jahres-Überleben bei knapp 75%. Im Vergleich dazu liegen das 5-Jahres-Überleben in Gruppe II knapp darunter, in Gruppe III hingegen bei fast 90%. Auf eine statistische Testung wurde aufgrund sich kreuzender Kurven verzichtet.

Unter den 17 von 98 Patienten, die nukleär c-MYC exprimierten, wiesen 16 Patienten ebenso nukleäres  $\beta$ -Catenin ( $p=0,027$ ) auf. Ferner sind insgesamt 71 der 98 Patienten nukleär positiv für  $\beta$ -Catenin. Weder c-MYC ( $p=0,133$ ) noch  $\beta$ -Catenin ( $0,102$ ) korrelieren mit der Metastasierung. Auch bei den einzelnen Metastasierungswegen ergeben sich keine Signifikanzen.

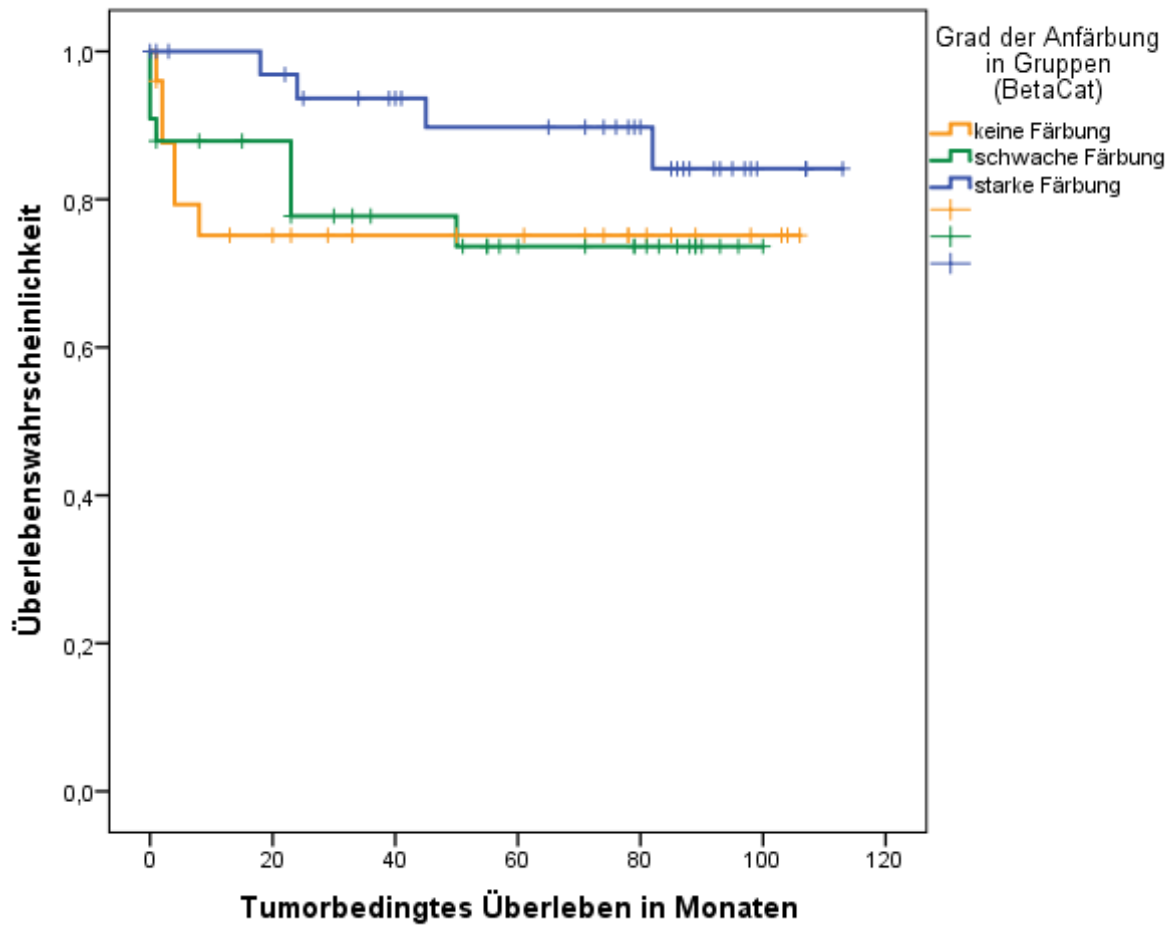


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve  $\beta$ -Catenin

### 3.3.2 c-MYC

Die Expression von c-MYC wurde ausschließlich als nukleär negativ oder positiv gewertet.

Gruppe	Gruppierung	N = 93
I	negativ	76
II	positiv	17

Tabelle 10 Färbegrad c-MYC

In Gruppe I zeigten 46% (35 / 76) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 25% (4 / 16) (FET p=0,166).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich keine Abhängigkeit von der c-MYC-Expression. 24% (18 / 76) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen gegenüber 6% (1 / 17) in Gruppe II.

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte ebenfalls nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 22% (17 / 76) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 19% (3 / 16) in Gruppe II.

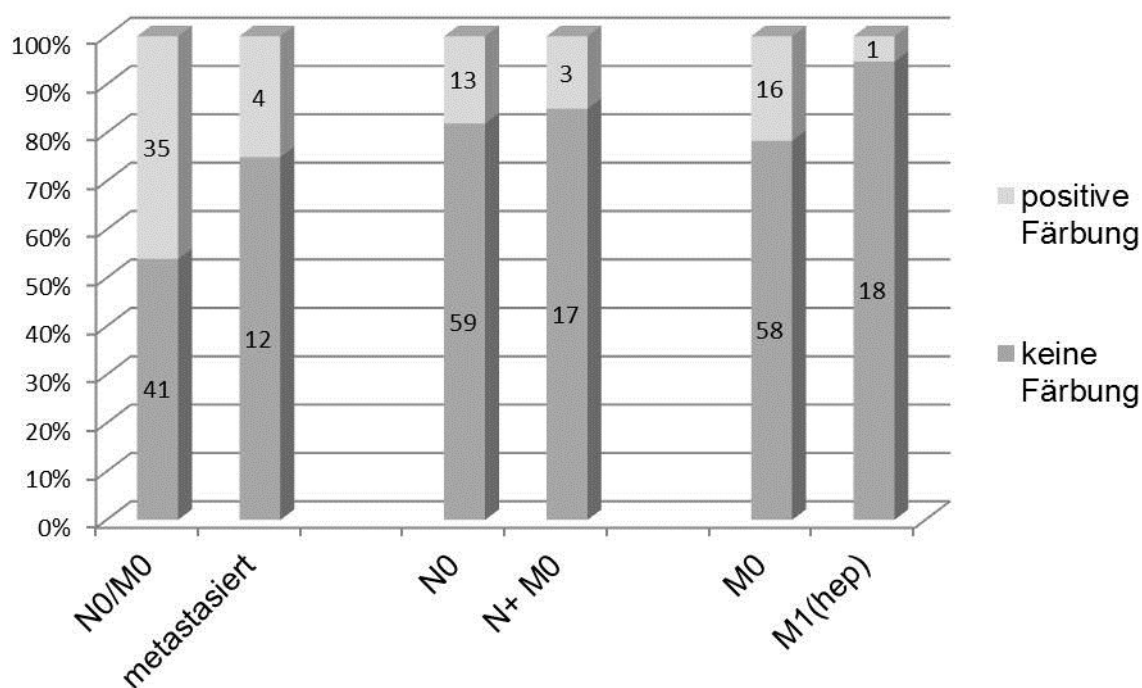


Abbildung 17 Primäre Endpunkte c-MYC

Hinsichtlich der sekundären Endpunkte ergab sich kein statistischer Zusammenhang mit der Expression von c-MYC.

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der c-MYC-Expression, so zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied in der 5-Jahres-Überlebensrate. Die c-MYC positiven Patienten haben ein 5-Jahres-

Überleben von etwas über 90%. Die negativen hingegen eines von knapp unter 80% (LR p=0,160).

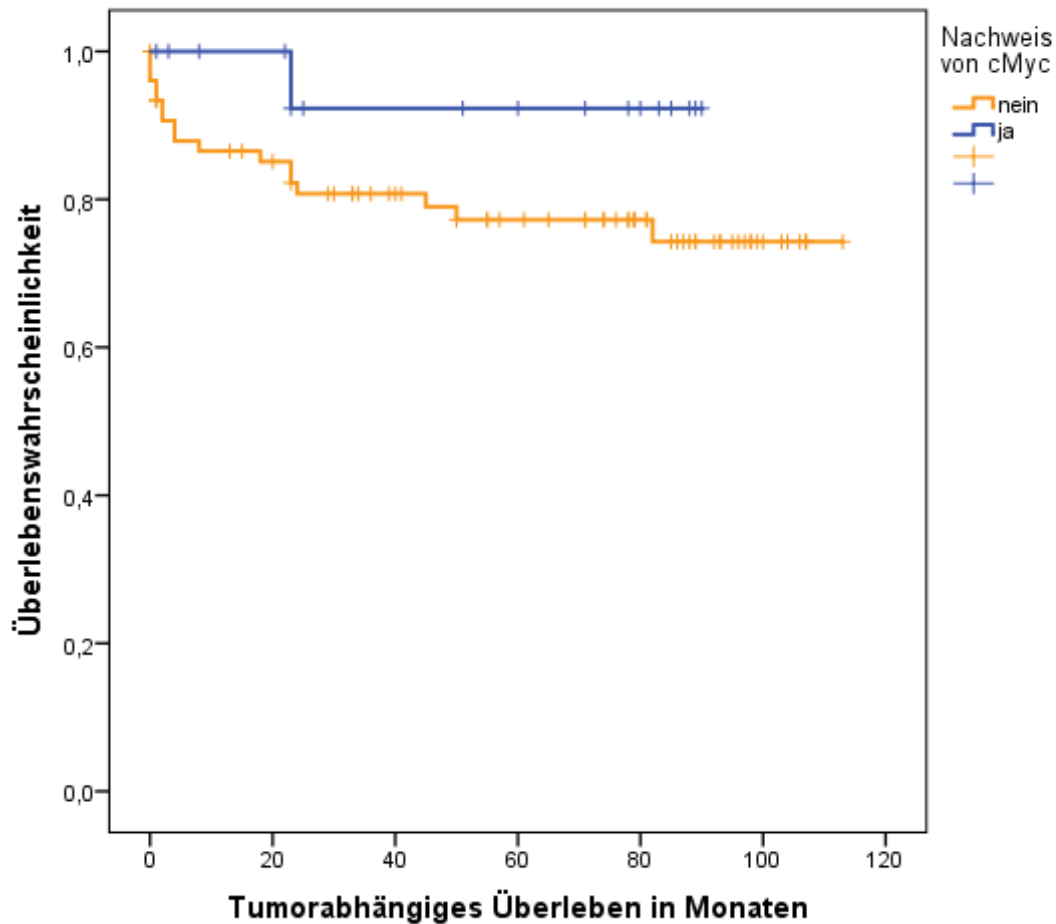


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurve c-MYC

### 3.4 Metalloproteinasen

#### 3.4.1 MMP-9

Die zytoplasmatische Expression von MMP-9 wurde semiquantitativ erfasst. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde mit jeweils null bis drei Punkten bewertet. Die addierte Punktzahl wurde wie folgt eingeteilt:

Gruppe	Gesamtpunktzahl	Gruppierung	N = 93
I	0	negativ	1
II	1 – 3	schwach positiv	29
III	4 – 6	mittel positiv	39
IV	7 – 9	Stark positiv	22

**Tabelle 11 Färbegrad MMP-9**

In Gruppe I zeigten 0% (0 / 1) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 62% (18 / 29), in Gruppe III bei 3% (12 / 39) sowie in Gruppe IV bei 41% (9 / 22) (CQ p=0,058).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten von hepatischer Metastasierung und der MMP-9-Expression. 0% (0 / 1) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen, 41% (12 / 29) in Gruppe II, 5% (2 / 40) in Gruppe III sowie 23% (5 / 22) in Gruppe IV. Anders formuliert, exprimieren über 50% aller lebermetastasierten Patienten nur schwach MMP9 verglichen mit 25% in der nicht metastasierenden Gruppe (CQ p = 0,003).

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 0% (0 / 1) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 21% (6 / 29) in Gruppe II, 26% (10 / 39) in Gruppe III, sowie 18% (4 / 22) in Gruppe IV.

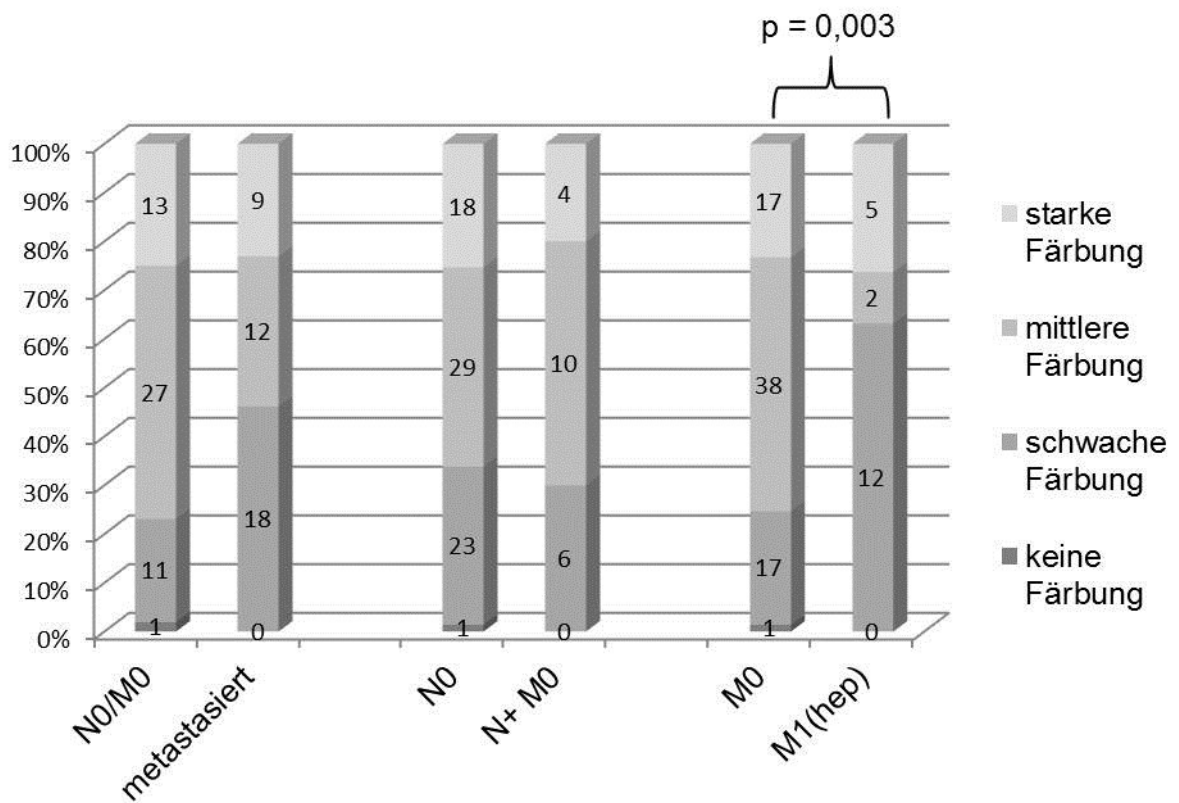


Abbildung 19 Primäre Endpunkt MMP-9

In Gruppe I waren 100% (1 / 1) schlecht differenzierte Tumoren. Demgegenüber stehen 52% (15 / 29) in Gruppe II, 35% (14 / 40) in Gruppe III sowie 18% (4 / 22) in Gruppe IV. Der prozentuale Anteil an schlecht differenzierten Karzinomen nimmt mit steigender MMP9-Expression ab (CQ  $p=0,050$ ).

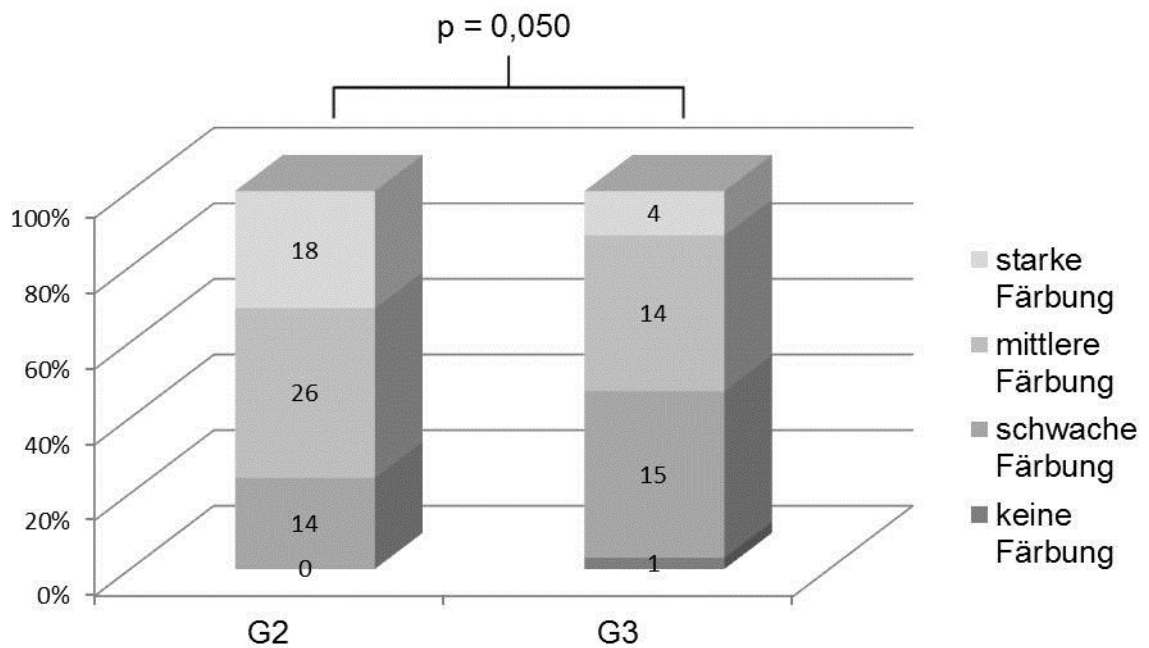


Abbildung 20 Sekundäre Endpunkte MMP-9: Grading

Hinsichtlich der weiteren sekundären Endpunkte zeigte sich kein statistischer Zusammenhang mit der Expression von MMP9.

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der MMP9-Expression, so zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse. In Gruppe I liegt das 5-Jahres-Überleben bei knapp 100%. Im Vergleich dazu liegt das 5-Jahres-Überleben in Gruppe II am niedrigsten bei ca. 60%, in Gruppe III zeigt sich ein 5-Jahres-Überleben von gut 90% und in Gruppe IV von 80%.

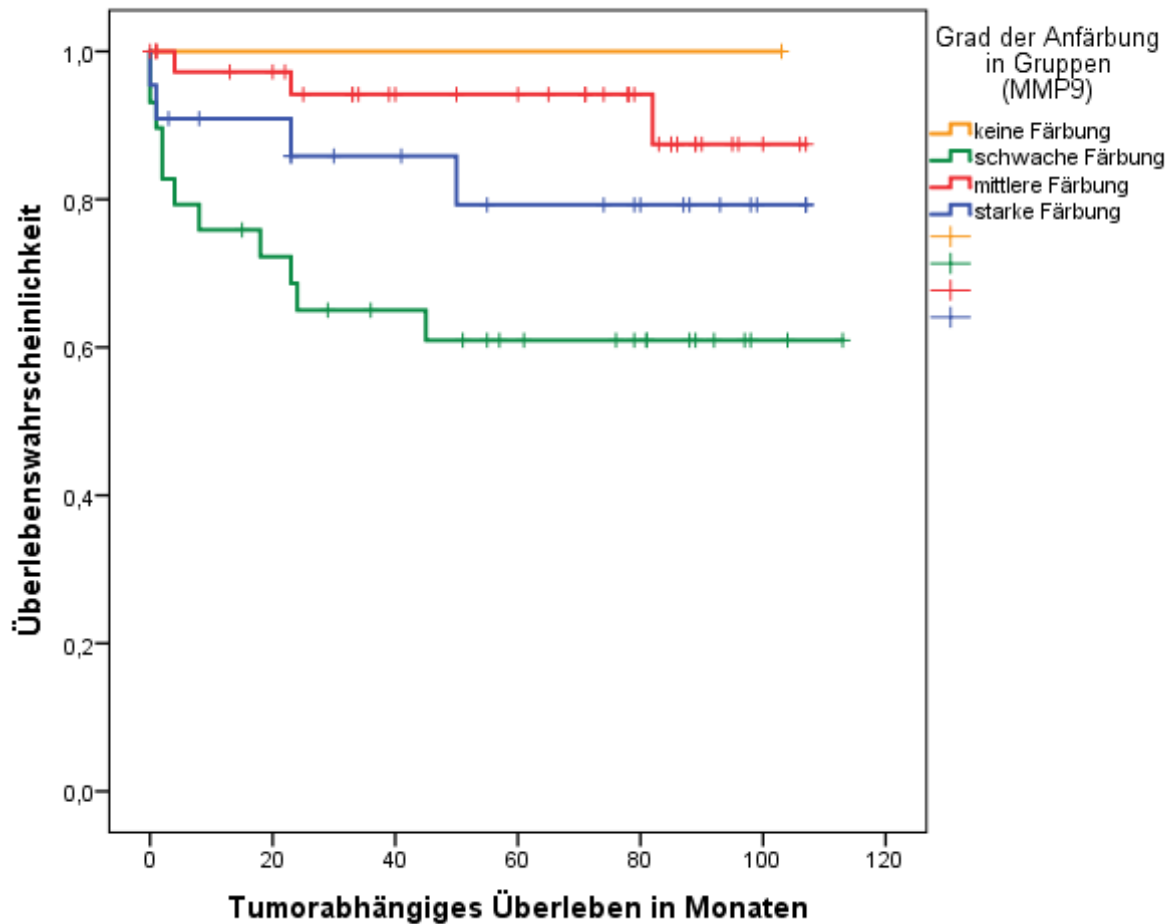


Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurve MMP-9

### 3.5 Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1)

Die zytoplasmatische Expression von PGK-1 wurde semiquantitativ erfasst. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde mit jeweils null bis drei Punkten bewertet. Die addierte Punktzahl wurde wie folgt eingeteilt:

Gruppe	Gesamtpunktzahl	Gruppierung	N = 93
I	0	negativ	8
II	1 – 3	schwach positiv	20



III	4 – 6	mittel positiv	37
IV	7 - 9	stark positiv	28

**Tabelle 12 Färbegrad PGK1**

In Gruppe I zeigten 63% (5 / 8) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 35% (7 / 20), in Gruppe III bei 39% (14 / 35) und in Gruppe IV bei 46% (13 / 28).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich keine Abhängigkeit von der PGK1-Expression. In Gruppe I zeigten 50% (4 / 8) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 10% (2 / 20), in Gruppe III bei 19% (7 / 37) und in Gruppe IV bei 21% (6 / 28).

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 13% (1 / 8) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 25% (5 / 20) in Gruppe II, 19% (7 / 36) in Gruppe III sowie 25% (7 / 28) in Gruppe IV.

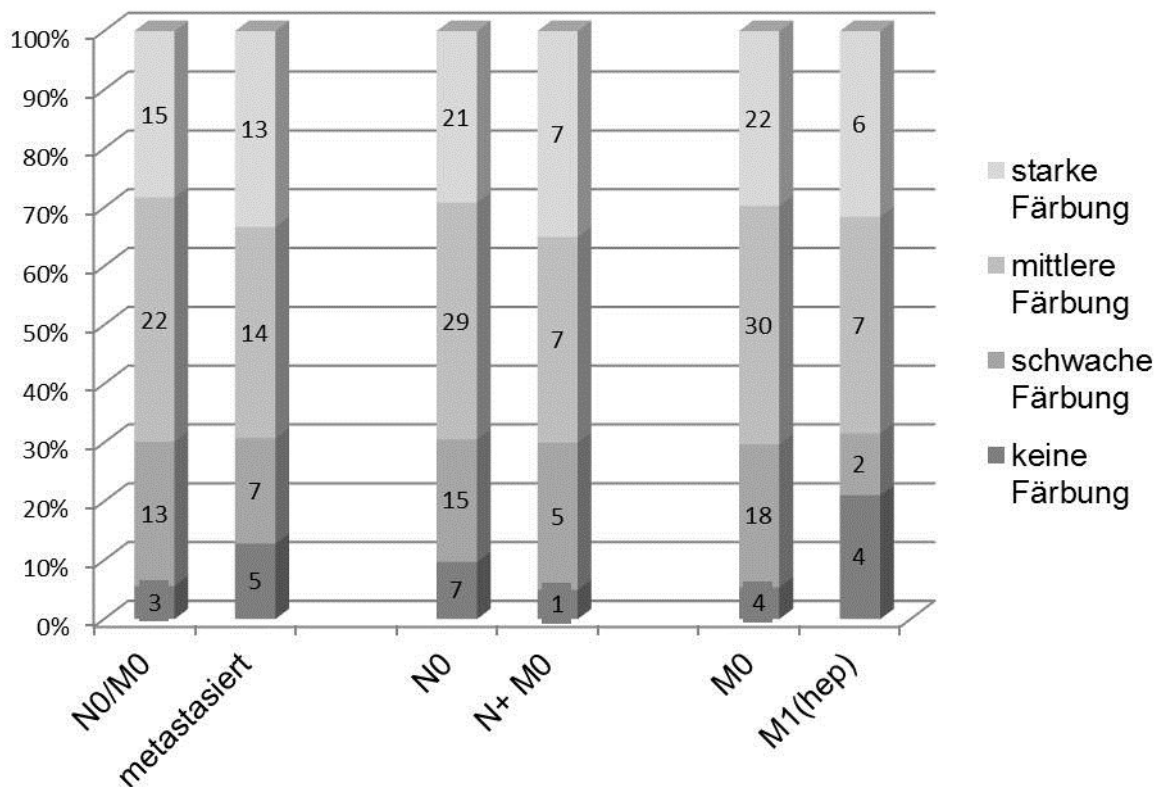


Abbildung 22 Primäre Endpunkte PGK1

Hinsichtlich der sekundären Endpunkte zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Expression von PGK1.

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der PGK1-Expression, so zeigte sich ein Trend zu Gunsten der Patienten, die vermehrt PGK1 exprimierten. In Gruppe I liegt das 5-Jahres-Überleben bei unter 50%. Im Vergleich dazu liegt das 5-Jahres-Überleben in Gruppe II und III bei ca. 80%, in Gruppe IV bei 90%.

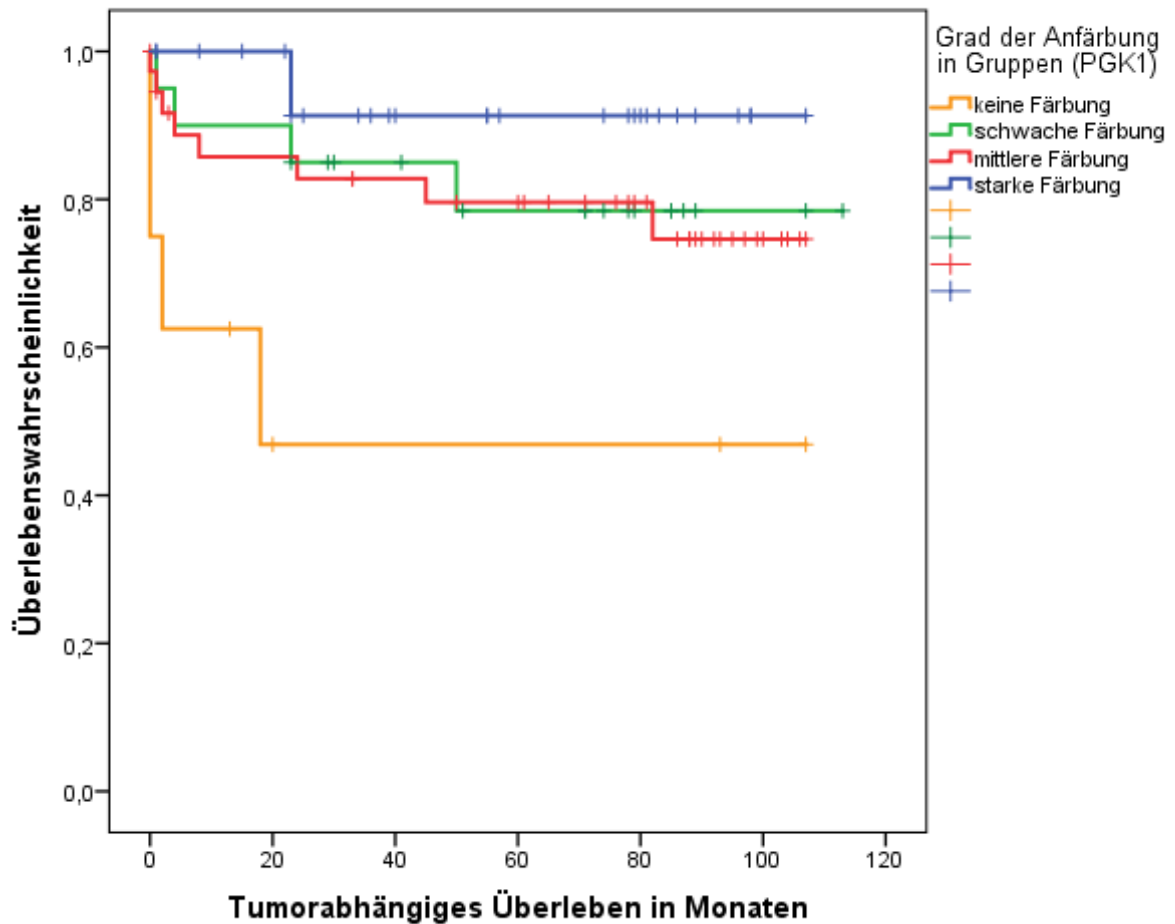


Abbildung 23 Kaplan-Meier-Kurve PGK1

### 3.6 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren Rezeptor 3 (VEGFR3)

Die Expression des VEGFR3 wurde semiquantitativ erfasst. Bis auf einen Patienten waren alle Schnitte auswertbar. Letztlich zeigte sich in jedem der Schnitte ein gewisses Maß an zytoplasmatischer und nukleärer VEGFR3-Expression. Jeder der drei histologischen Schnitte auf dem Tissue-Microarray wurde jeweils hinsichtlich seiner nukleären VEGFR3-Expression daher als schwach oder stark eingestuft.

Gruppe

Gruppierung

N = 92

I	schwach positive Färbung	57
II	stark positive Färbung	35

Tabelle 13 Färbegrad VEGFR3

In Gruppe I zeigten 46% (26 / 56) eine vorliegende Metastasierung zum Untersuchungszeitpunkt. Der prozentuale Anteil lag in Gruppe II bei 34% (12 / 35).

Hinsichtlich der hepatischen Metastasierung zeigte sich keine Abhängigkeit von der VEGFR3-Expression. 23% (13 / 57) der Patienten in Gruppe I zeigten synchrone Lebermetastasen gegenüber 14% (5 / 35) in Gruppe II.

Ein Zusammenhang zur lymphogenen Metastasierung konnte ebenfalls nicht hergestellt werden. In Gruppe I zeigten 23% (13 / 56) eine isolierte lymphogene Metastasierung. Demgegenüber stehen 20% (7 / 35) in Gruppe II.

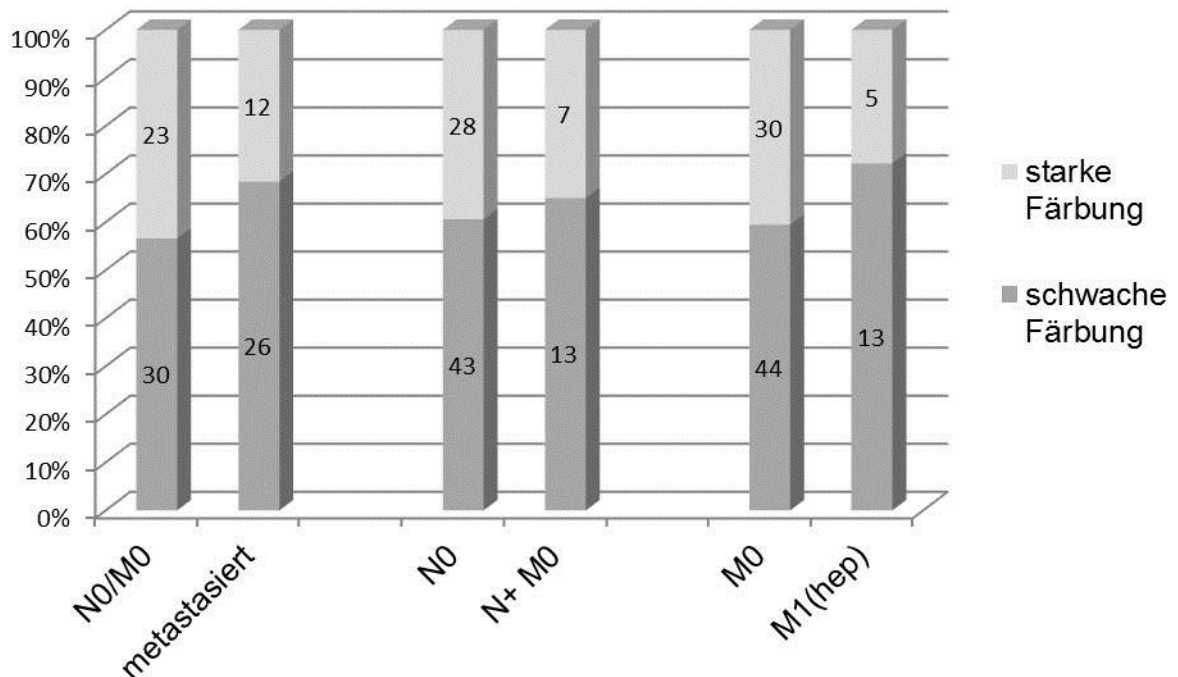


Abbildung 24 Primäre Endpunkte VEGFR3

Die Expression von VEGFR3 ist statistisch unabhängig von der Seitenlokalisierung des Tumors. Allerdings zeigt sich ein Trend, nachdem die

rechtseitig gelegenen Kolonkarzinome in 46% (24 / 52) der Fälle gegenüber nur 27% (11 / 40) eine starke VEGFR3-Expression aufweisen (CQ  $p=0,068$ ).

Hinsichtlich der übrigen sekundären Endpunkte zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Expression von VEGFR3.

Betrachtet man das tumorbedingte Überleben in Abhängigkeit von der VEGFR3-Expression, so zeigt sich kein Unterschied in der 5-Jahres-Überlebensrate. Beide Gruppen liegen bei knapp 80%.

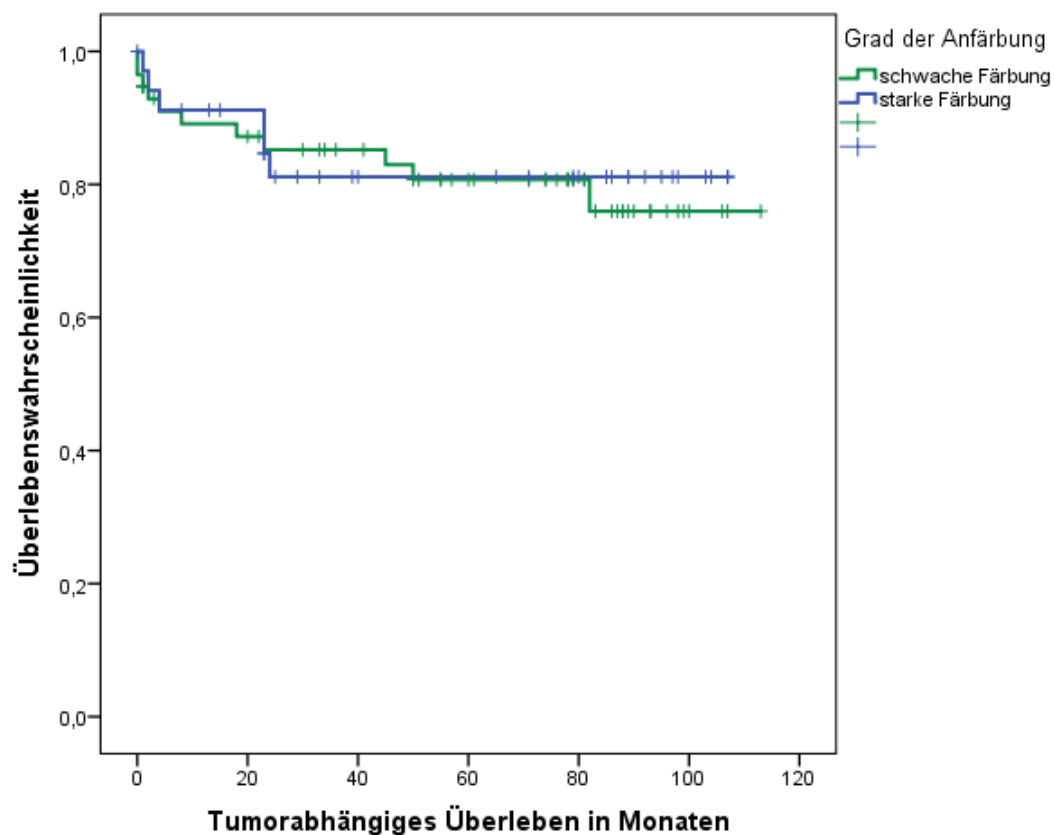


Abbildung 25 Kaplan-Meier-Kurve VEGFR3

## **4 Diskussion**

Zielsetzung unserer Arbeit war die Suche nach prognostischen Markern für das Metastasierungsverhalten sowie das tumorabhängige Überleben lokal limitierter Kolonkarzinome. Besonders hervorzuheben sind die signifikanten Zusammenhänge zwischen der pERK-Expression und dem damit einhergehenden positiv beeinflussten Überleben. Im selben Kontext zeigte sich eine Inverse Häufung der pERK-Färbung mit dem Vorhandensein von Gefäßeinbrüchen. K-Ras hingegen schien in unserer Untersuchung das Überleben nicht zu beeinflussen. Bemerkenswert bleiben hier die signifikant selteneren isolierten Lymphknotenmetastasen. Die übrigen Marker zeigten hinsichtlich der primären und sekundären Endpunkte weniger vielversprechende Ergebnisse.

Unsere Ergebnisse sind aus zweierlei Gründen vorsichtig in die folgende Diskussion zu integrieren. Zum Einen machen die meisten Arbeiten keinen Unterschied zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen. Dies ist aus unserer Sicht so nicht korrekt. Insbesondere da sich die Beweise häufen, dass der embryologische Ursprung eine Rolle für die Tumorbilogie spielt. Des Weiteren werden Rektumkarzinome in Deutschland seit vielen Jahren neoadjuvant vorbehandelt, um einen Kontinenserhalt zu bewirken, was einen großen Eingriff in die Biologie der resezierten Tumoren darstellt. Zum Zweiten nehmen die meisten Arbeiten keine Präselektion hinsichtlich des T-Stadiums vor. Wir sehen hingegen im angeführten Kollektiv die größten offenen Fragen, da unserer Meinung nach vor allem lokal gering fortgeschrittene Tumoren mit synchron vorliegenden Metastasen biologisch nicht verstanden sind.

### **4.1 EGFR-Signalweg**

#### **4.1.1 K-Ras**

In unserem Kollektiv waren 28 (30%) der Patienten K-Ras mutiert. Dies entspricht einer vergleichbaren Mutationsrate zu den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten von 30-45% (Lin et al., 2011). Eine generalisiert

gehäufte Metastasierung zeigte sich anhand unserer Daten nicht. Zwei ältere Arbeiten aus Asien beschreiben jeweils ein vermehrtes Auftreten von (Leber-) Metastasen unter den K-Ras mutierten Patienten (Li et al., 2012) (Tanaka et al., 1994). In der Mehrzahl der Publikationen wird kein Zusammenhang zwischen K-Ras Mutation und clinico-pathologischen Daten gesehen (Akman et al., 2016, Zlobec et al., 2010, Saito et al., 2014, Rimbert et al., 2017). Der Mutationsstatus war unabhängig von der Lokalisation des Tumors in unserem Kollektiv. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Deng et al und der RASCAL-Studie. Hingegen beschrieben Peng et al eine signifikante Mutationshäufung bei Tumoren im embryologisch rechtsseitigen Kolon (Deng et al., 2008) (Andreyev et al., 1998b) (Peng et al., 2017). Eine andere Arbeit ermittelte im rechten Kolon vermehrt Wildtyp-Tumoren (Kodaz et al., 2015). In unserem Kollektiv zeigt sich kein Überlebensunterschied zwischen K-Ras mutierten und Wildtyp-Patienten, wobei die Aussagekraft sicher reduziert ist, da uns keine Daten hinsichtlich der adjuvanten Therapie im Verlauf vorliegen. Ein neues Review aus 2016 von Andreatos et al. zeigt, dass es keinen echten Konsens hinsichtlich einer negativen Prognose für K-Ras mutierte Patienten gibt. Von den in diesem Review angeführten Studien thematisieren 12 von 15 das tumorfreie Überleben. Sieben zeigen eine negative Assoziation zwischen K-Ras und dem tumorfreien Überleben, fünf hingegen nicht (Andreatos et al., 2016). Dieselbe Arbeit fasst ebenfalls den vermeintlichen Überlebensunterschied zwischen den verschiedenen Punktmutationen im K-Ras-Gen zusammen. Dies war bereits in der Vergangenheit mehrfach beschrieben worden (Jones et al., 2017, Sinha et al., 2013). Für eine dezidierte Subgruppenanalyse war unser Kollektiv jedoch zu klein.

Überraschend bleibt die signifikant niedrigere Rate an isolierten Lymphknotenmetastasen bei K-Ras mutierten Patienten sowie der nicht signifikante Trend zu vermehrten soliden Organmetastasen. Dies steht im Widerspruch zu verschiedenen Arbeiten, die hier keinen Zusammenhang zwischen K-Ras-Status und dem N-Stadium sahen (Jauhri et al., 2017, Gorukmez et al., 2016, Ribeiro et al., 2013). Dass von den solide metastasierten Patienten gut zwei Drittel auch lymphogene Metastasen

aufweisen, überrascht hingegen nicht. Es bleibt zu diskutieren, ob und inwiefern eine K-Ras Mutation eine aggressivere Tumorbilologie bedingt und möglicherweise zu einer akzellerierten Metastasierung führt. Ähnlich sehen dies Margonis et al. In deren Analyse von 334 Patienten, welche wegen hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen reseziert worden waren, zeigte sich zunächst kein Überlebensunterschied zwischen K-Ras mutierten und Wildtyp-Patienten. Kam es allerdings zum Rezidiv, war das Überleben der mutierten Patienten signifikant kürzer als das der Wildtyp-Patienten (Margonis et al., 2015). Zwei Metaanalyse von Passiglia et al mit 1000 Patienten sowie von Brudvik et al mit 1800 Patienten zeigen ebenfalls ein schlechteres Outcome für Ras-mutierte Patienten, welche sich im Gegensatz zu operierten Wildtyp-Patienten einer Metastasektomie unterzogen (Passiglia et al., 2016, Brudvik et al., 2015). Bekanntermaßen können Lebermetastasen einen anderen Ras-Status aufweisen als der Primärtumor. Daher betrachteten Nash et al. den Ras-Status der Metastasen, nicht aber des Primarius und zeigten, dass, wenn die Lebermetastasen K-Ras mutiert waren, diese früher und in gehäufte Anzahl auftraten (Nash et al., 2010).

Zuletzt bleibt erwähnenswert, dass diverse Arbeiten einen Zusammenhang mit pulmonalen, nicht aber hepatischen Filiae zeigen, welche hier freilich nicht untersucht worden sind (Kemeny et al., 2014).

## **4.2 MAP-Kinase Signalweg**

### **4.2.1 pERK (phosphoryliertes-ERK)**

Eine Überexpression von pERK lässt sich unabhängig vom K-Ras oder B-Raf Status nachweisen (Levidou et al., 2012) (Davies et al., 2011). Frühere Arbeiten deuten daraufhin, dass ein hoher pERK-Spiegel ein negativer prognostischer Faktor für das Überleben darstellt (Zhuang et al., 2005).

Spezifisch für das kolorektale Karzinom gibt es zwei Arbeiten, die die nukleäre Expression von pERK in einen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Bestrahlung von Rektumkarzinomen bringen. Holck et al zeigten,



dass eine hohe Expression von pERK im Tumorepithel mit einem schlechten Ansprechen auf eine Bestrahlungstherapie einhergeht (Holck et al., 2015). Dazu im Widerspruch steht ein besseres Gesamtüberleben verbunden mit erhöhten pERK-Spiegeln. Dies wurde mit dem besseren Ansprechen auf eine (neoadjuvante) Radiochemotherapie begründet (Davies et al., 2011). In unserem Kollektiv ging ein niedriger pERK-Spiegel mit einer signifikant häufigeren hepatischen Metastasierung einher. Zudem war das Überleben signifikant besser bei hohen pERK-Spiegeln, was sich eher mit Davies et al in Einklang bringen lässt, wenn auch bei unseren Patienten keine Radiotherapie stattgefunden hat.

Das vermehrte Auftreten von Lebermetastasen bei pERK negativen Patienten ist mutmaßlich die Ursache für das schlechtere tumorspezifische Überleben. Ob und inwiefern pERK eine hepatische Metastasierung bedingt, ist bisher nicht bekannt.

Interessanterweise sehen wir eine Häufung zwischen pERK und dem L- und V-Status. Dennoch zeigt sich keine signifikante Häufung zwischen pERK und Lymphknotenmetastasen, weder isoliert noch generell. Davon abgesehen zeigte sich in 4 Fällen ein hepatisches Rezidiv bzw. eine metachrone Metastasierung. Auch diese Patienten waren in 75% der Fälle negativ für pERK und in 25% schwach positiv gefärbt, was einen Zusammenhang vermuten lässt.

Baba et al untersuchten die Rolle der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) in Abhängigkeit von der MAPK und beschrieben in ihrem Kollektiv ein besseres tumorspezifisches Überleben bei Patienten, welche gleichzeitig positiv für AMPK sowie pERK waren (Baba et al., 2010). Auf die Art und Häufigkeit der Metastasierung wird dort leider nicht eingegangen.

Wir stellen die Hypothese auf, dass es sinnvoll wäre pERK in Kolonkarzinome im Rahmen experimenteller prospektiver Studien anzufärben und vor allem die Leberbildgebung in der Nachsorge an den pERK-Wert anzupassen.

#### **4.2.2 mTOR**

Verschiedene Arbeiten zeigen eine im Vergleich zu normaler Kolonschleimhaut und polypösen Kolonveränderungen vermehrte mTOR-Expression in Kolonkarzinomen (Wang et al., 2011) (Zhang et al., 2009). In derselben chinesischen Studie zeigte sich eine Assoziation zwischen mTOR und dem T-Stadium, dem Auftreten von lokoregionären Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen sowie dem Differenzierungsgrad (Wang et al., 2011).

Die Autoren beschrieben eine Expression von mTOR in 61% der untersuchten Kolonkarzinome. Im Vergleich dazu waren bei uns lediglich 5% der Proben negativ für mTOR und knapp 80% zeigten eine mittlere oder stark positive Färbung.

Der Zusammenhang mit lokoregionären und Fernmetastasen konnte an unserem Kollektiv so nicht nachvollzogen werden. Es zeigte sich zu keinem der von Wang et al beschriebenen Faktoren eine signifikante Abhängigkeit. Auch wenn man die Gruppen hinsichtlich der Vergleichbarkeit dem chinesischen Kollektiv ähnlicher einteilt, zeigen sich keine vergleichbaren Ergebnisse, sodass wir mTOR nicht für einen geeigneten prognostischen Marker für die Metastasierung des kolorektalen Karzinomes halten. Unsere Ergebnisse sind damit eher mit denen von Zhang et al vergleichbar, welche ebenfalls keine Zusammenhänge zwischen mTOR-Ergebnissen und Tumorlokalisation, Grading und Lymphknotenmetastasen zeigten (Zhang et al., 2009).

## **4.3 wnt-Signalweg**

### **4.3.1 $\beta$ -Catenin**

Von den bearbeiteten Markern ist  $\beta$ -Catenin neben K-Ras wohl der am besten für das kolorektale Karzinom untersuchte Marker. Dies liegt selbstverständlich nahe, wenn man die bereits früh entdeckte Rolle von  $\beta$ -Catenin und APC in der Entstehung des CRC bedenkt.

Brabetz et al beschrieben bereits 1998 eine inhomogen über den Tumor verteilte Färbintensität vor allem von nukleärem  $\beta$ -Catenin. Sie zeigten

vordergründig nukleäre Färbung und damit Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern an der Invasionsfront der kolorektalen Karzinome (Brabletz et al., 1998). Im selben Jahr veröffentlichte dieselbe Gruppe bei Rektumkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen nukleärer  $\beta$ -Catenin-Expression und einer Fernmetastasierung oder dem Überleben (Gunther et al., 1998) festgestellt zu haben. Im Verlauf der kommenden Jahre wurden widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Teilweise stimmen die Ergebnisse überein mit verschiedenen größeren Kollektiven, welche auch bei über 600 Patienten keinen Überlebensnachteil für nukleär positive Tumoren zeigten (Chung et al., 2001).

Bruun et al zeigten in einer großen Kohortenstudie ( $n > 700$ ) einen Überlebensnachteil für den Verlust membranösen  $\beta$ -Catenins, nicht aber für eine starke nukleäre Färbung (Bruun et al., 2014).

Nukleäre  $\beta$ -Catenin-Expression in der Invasionsfront ist nicht mit einem schlechteren disease-free-survival vergesellschaftet, membranöse Expression aber mit einem besseren (Kamposioras et al., 2013). Im Kontrast hierzu zeigen Gao et al ein höheres Tumorstadium, häufigere Lymphknotenmetastasen und schlechteres Grading bei Patienten mit nukleär positiven Tumoren an der Invasionsfront. Entsprechend war deren Überleben auch negativ korreliert (Gao et al., 2014).

Lee et al berichten über ca. 60% nukleär positive Patienten in ihrem Kollektiv. Ähnliche Raten beschrieben Sie für c-MYC-Expression. Beides war unabhängig aber auch kombiniert mit einem Überlebensvorteil verbunden (Lee et al., 2016). Die Färbehäufigkeit deckt sich mit der Arbeit von Hugh et al. Diese konnten jedoch keinen Zusammenhang zum Überleben oder Grading zeigen (Hugh et al., 1999).

Lugli et al zeigten in einer großen Fallserie ( $n > 1400$ ) für nukleär positive und mikrosatellitenstabile Tumoren im TMA (entfernt von der Invasionsfront entnommen) vermehrte Lymphknotenmetastasen, vaskuläre Invasion sowie ein schlechteres Überleben (Lugli et al., 2007).

Letztlich zeigten mehrere Arbeiten einen prognostischen Nachteil für nukleär positives  $\beta$ -Catenin ((Suzuki et al., 2008, Lugli et al., 2007) (Peker et al., 2013) (Gao et al., 2014)), andere Arbeiten kamen zu dem Schluss, dass es keinen Zusammenhang dazu gab (Brabletz (Brabletz et al., 1998), Hugh (Hugh et al., 1999), Kamposioras (Kamposioras et al., 2013)), manch einer sah sogar einen Überlebensvorteil (Lee et al., 2016)). Zu bemerken ist, dass diese Arbeiten sich teilweise differenziert auf die Proteinexpression in Tumorzentrum und an der Invasionsfront beziehen, was in unserer Arbeit nicht der Fall war. Unsere Proben wurden bewusst aus der Tumormitte entnommen, ähnlich der Arbeit von Lugli et al, welche explizit invasionsfern ihre Proben entnahmen. In unserem Kollektiv ging eine nukleäre Positivität nicht mit einem Überlebensvorteil oder einem bestimmten Metastasierungsverhalten einher. Im Widerspruch zu Peker et al ging bei uns eine schlechtere Differenzierung mit einer geringeren nukleären Anfärbung einher (Peker et al., 2013).

Während diverse Arbeiten keinen Zusammenhang mit dem V-Status beschreiben (Peker et al., 2013), zeigen Suzuki et al in ihrer Arbeit signifikant häufigere Lebermetastasen, wenn die infiltrierten Gefäße des Primarius vermehrt  $\beta$ -Catenin exprimierten (Suzuki et al., 2008).

Ein interessantes – wenn auch kleines – Kollektiv beschreiben ungarische Kollegen. Diese untersuchten 79 Patienten im Stadium T3N0M0 (Kolon- und Rektumkarzinome) und zeigten für nukleär positives bzw. membranös reduziertes  $\beta$ -Catenin signifikant häufigere metachrone Metastasen im 5-Jahres-Follow-Up (Toth et al., 2012).

Zusammenfassend zeigte sich in unserem Kollektiv kein statistisch signifikanter Überlebensnachteil für nukleär positive Tumoren. Eher noch zeigt sich ein Trend zu Gunsten dieser Tumoren. Wie heiß diskutiert diese Sachlage ist, zeigt, dass Chen et al eine Metaanalyse veröffentlichten, die einen prognostischen Nachteil für nukleäres  $\beta$ -Catenin zeigte (Chen et al., 2013), wohingegen Bruun et al in ihrer Arbeit dieselbe Metaanalyse sowie zwei weitere Arbeiten anführen und daraus keinen Überlebensnachteil ableiten können (Bruun et al., 2014).

### 4.3.2 c-MYC

In unserem Kollektiv zeigten 17 Patienten eine Expression von nukleärem c-MYC. Dies ging weder mit einem Überlebensvorteil noch mit einem spezifischen Metastasierungsverhalten einher. Auch die sekundären Endpunkte waren unabhängig von c-MYC. Bereits in den ausgehenden 80ern und frühen 90ern waren ähnliche Analysen mittels c-MYC RNA-Nachweis durchgeführt worden. Im Jahr 1990 postulierten Kollegen aus Österreich und Singapur an jeweils einem kleinen Kollektiv, dass c-MYC als prognostischer Marker ungeeignet sei (Klimpfinger et al., 1990) (Goh et al., 1990). Hiermit scheinen sich die Ergebnisse einer Untersuchung von 1988 von Erisman et al zu bestätigen, die ebenfalls keinen Zusammenhang zum tumorabhängigen Überleben ihres Kollektivs herstellen konnten. Ihnen gelang es in knapp 68% ihrer CRCs eine erhöhte Menge an c-MYC RNA nachzuweisen (Erisman et al., 1988). Ji et al untersuchten eine ähnliche Fragestellung im Jahr 2014 und kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass c-MYC weder als prognostischer Marker diene noch mit dem klinischen Stadium vereinbar war (Ji et al., 2014).

Eine weitere Arbeit untersuchte die Genexpression von c-MYC nicht nur im Primärgewebe, sondern auch in dessen Metastasen. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Amplifikation von c-Myc in den Metastasen, hingegen aber keine vermehrte Überexpression im Vergleich zum Primarius (Rochlitz et al., 1996). Dies bestätigte damit die Ergebnisse einer zwei Jahre älteren ungarischen Arbeit (Kozma et al., 1994). Eine japanische Arbeit hingegen zeigte zwar ebenfalls keine Korrelation zwischen der Expression von c-MYC und dem Tumorstadium bzw. der Metastasierung, jedoch kam es bei überexprimierten Patienten häufiger zum metastatischen Rezidiv und damit einhergehend zu einem schlechteren Gesamtüberleben (Kakisako et al., 1998).

Kugimya et al gingen einen Schritt weiter und zeigten ein vermehrtes Auftreten von Rezidiven in Patienten mit hoher c-MYC Expression nach adjuvanter 5-Fluoruracil Chemotherapie im Vergleich zu Patienten geringer Expression. Entsprechend war auch das rezidivfreie Überleben hier deutlich reduziert

(Kugimiya et al., 2015). Allerdings handelte es sich um ein sehr kleines Kollektiv (n=20). Da wir in unserer Studie primär die synchrone Metastasierung untersuchten, liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten bezüglich der Rezidivrate vor.

Damit erscheint zum jetzigen Zeitpunkt die alleinige Überexpression von c-MYC nicht mit einem prognostischen Vor- oder Nachteil vergesellschaftet zu sein. Eine Metastasierungspräferenz lässt sich ebenfalls nicht ableiten. Ob ein Zusammenhang mit Rezidiven nach bestimmten Chemotherapien besteht, gilt es an größeren Studienkollektiven zu evaluieren.

#### **4.4 Matrixmetalloproteinase-9 (MMP9)**

Eine andere Arbeit, welche 202 Patienten mit einem Stage II kolorektalen Karzinom untersucht, beschreibt knapp 50% der kolorektalen Karzinome als positiv für MMP9. Diese scheint in einer Abhängigkeit zur Differenzierung und der Tumorlokalisation zu stehen. Außerdem zeigte dieselbe Arbeit ein besseres krankheitsfreies Überleben (Buhmeida et al., 2009).

Chu et al beschreiben in ihrer Studie eine signifikante Korrelation zwischen Invasionstiefe, dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie ein deutlich schlechteres tumorfreies und Gesamtüberleben (Chu et al., 2012).

Ein Vergleich fällt hier schwer, da sowohl alle T-Stadien als auch das Rektumkarzinom in die chinesische Population miteingeschlossen wurde. Zudem waren knapp 50% der chinesischen T2/T3 Tumore negativ für MMP9 gegenüber fast ausschließlich positiven Patienten in unserem Kollektiv. Eine Limitation des Tissue-Microarray stellt zudem dar, dass nicht zwangsläufig die Invasionsränder damit abgebildet werden. Werden zentrale Anteile des Tumors entnommen, kann eine veränderte Proteinexpression vorhanden sein, als dort, wo die Matrixmetalloproteinasen mutmaßlich wirken. Kontrovers ist zudem, dass sich in unserem Kollektiv die meisten hepatisch metastasierten Tumoren durch eine verhältnismäßig geringe Expression auszeichnen. Dies spiegelt sich in den Überlebenskurven wieder. Durch die hohe Schnittmenge an

Lebermetastasen und niedriger Expression zeigen diese Patienten das schlechteste Überleben, allerdings folgen dann zunächst die stark und erst dann die mittel exprimierenden Tumoren, so dass hier wohl eher von Zufällen auszugehen ist.

Im Mausmodell konnten Gerg et al zeigen, dass die MMP9-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten variabel ist. Dies konnten wir durch unsere einmalige Messung letztlich nicht rekonstruieren, es könnte aber die Ursache für die schwierige Vergleichbarkeit zur chinesischen Arbeit sein (Gerg et al., 2008).

#### **4.5 Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1)**

Die Expression von PGK-1 lies sich in unserer Arbeit gut mittels der bereits von Zieker et al verwendeten Antikörper reproduzieren. Die semiquantitative Analyse zeigte jedoch weder einen Zusammenhang mit einem spezifischen Metastasierungsort noch mit einem generell gehäuften Auftreten wie bei Ahmad et al beschrieben (Ahmad et al., 2013). Ob der PGK1 Spiegel mit einer peritonealen Metastasierung des Kolonkarzinoms einhergeht, lässt sich an unserem Kollektiv nicht ableiten, da eine peritoneale Metastasierung unter den untersuchten lokalisierten T2/T3 Tumoren äußerst selten ist bzw. diese Patienten die Einschlusskriterien nicht erfüllten. Ebenso lies sich kein unabhängiger Einflussfaktor bzgl. des Überlebens nachweisen, wie dies etwa für die Gallenblasenkarzinome beschrieben wurde (Lu et al., 2015). Bei Neuroblastomen konnte eine Abhängigkeit zwischen CXCR4 und PGK1-Positivität gezeigt werden. PGK1-Überexpression war mit einem schlechten Überleben vergesellschaftet, am ehesten bedingt durch eine Metastasierung ins Knochenmark (Ameis et al., 2013). Metastasen im Knochenmark sind äußerst selten bei CRC.

Entsprechend trat in unserem Kollektiv kein einziger solcher Fall auf. Weitere Daten scheinen für das kolorektale Karzinom und die PGK1 nicht vorzuliegen.

#### 4.6 VEGFR-3

Der VEGFR-3 ist der wichtigste VEGF-Rezeptor für die Lymphangiogenese und damit mutmaßlich involviert in die Bildung einer Lymphangiosis carcinomatosa bzw. einer Lymphangioinvasion mit Lymphknotenmetastasierung. In unserer Färbung zeigten praktisch alle Zellen einen zytoplasmatischen Nachweis des Rezeptors. Dies deckt sich mit vorbeschriebenen Arbeiten (Witte et al., 2002, Simiantonaki et al., 2007). Zunächst verwundert, dass ein ansonsten membranständiger Rezeptor eine nukleäre Färbung bedingt. Der verwendete Antikörper bindet an das C-terminale Ende des Rezeptors. Dieser zeigte in pulmonalen Hämangioendotheliomen und Angiosarkomen dasselbe bemerkenswerte Färbemuster (Stacher et al., 2009). Stacher et al schlussfolgerten in selbiger Arbeit, dass das C-terminale Ende des VEGFR-3 im Zellkern liegen müsse, da weitere, nicht gegen das C-terminale Ende gerichtete Anti-VEGFR-3-Antikörper lediglich zur zytoplasmatischen bzw. membranösen, nicht aber zur nukleären Färbung der Zellen führten. Eine spezifische Färbung der jeweiligen Liganden VEGF-C und D wurde nicht durchgeführt. Zur besseren Einordnung wird Stichpunktartig die Datenlage hierzu dennoch erwähnt. Beide Rezeptoragonisten lassen sich häufig in CRC anfärben. Mehrere Arbeiten Anfang der 2000er zeigten, dass eine erhöhte VEGF-D Proteinexpression mit signifikant mehr Lymphknotenmetastasen einherging, ohne jedoch das Überleben zu beeinflussen (Funaki et al., 2003, Moehler et al., 2008, Duff et al., 2006). Eine simultane Expression von VEGF-C und D ging mit einem schlechteren Überleben einher als doppelt-negative Tumoren (Onogawa et al., 2004).

Im Widerspruch hierzu fanden Kawakami et al bei erhöhtem VEGF-C und/oder erniedrigten VEGF-D mRNA-Spiegeln signifikant gehäuft Lymphknotenmetastasen (Kawakami et al., 2003a). Dieselbe Arbeitsgruppe quantifizierte kurze Zeit später die VEGFR-3 Expression, fand aber keinen Zusammenhang zwischen VEGFR-3 mRNA-Spiegeln und Lymphknotenmetastasen (Kawakami et al., 2003b). Der immunhistochemische Nachweis von starker VEGFR3-Expression geht in unserer Arbeit weder mit Lymphknoten- noch mit Lebermetastasen einher. Diverse Vorarbeiten sahen



ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen VEGFR-3 und dem klinischen Outcome (Hanrahan et al., 2003, Thomaidis et al., 2014) (Zhang et al., 2017). Witte et al. und Kim et al. beschrieben ein schlechteres Überleben in VEGFR-3 positiven Patienten. Allerdings sahen sie ebenfalls keinen Zusammenhang mit der Lymphknotenfilialisierung (Witte et al., 2002) (Kim et al., 2011).

Etwas konträr zur mutmaßlichen Funktion des Rezeptors zeigte sich in einer großen portugiesischen Arbeit mit > 600 Patienten sowie in einer Arbeit von Mainzer Kollegen ein Zusammenhang zwischen VEGFR-3 und dem Vorhandensein von Fernmetastasen, nicht aber von Lymphknotenmetastasen (Martins et al., 2013) (Jayasinghe et al., 2009). Dies konnte an unserer Arbeit so nicht nachvollzogen werden. Es traten keine vermehrten Lebermetastasen auf.

Zusammengefasst scheint VEGFR-3 derzeit kein geeigneter prognostischer Marker für das kolorektale Karzinom zu sein. Erschwerend hinzukommt, dass anders als bei den meisten oben beschriebenen Tumoren die immunhistochemische Auswertung durch die häufige Positivität erschwert ist und viele Kollegen in ihren Arbeiten unterschiedliche Aspekte beschreiben. Teilweise werden nur die tumorassoziierten oder -infiltrierten Gefäße beschrieben.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Bis heute existieren wenige prognostische oder prädiktive Marker für das Metastasierungsverhalten und das tumorspezifische Überleben lokal begrenzter Kolonkarzinome. Es ist nicht hinreichend geklärt, weshalb noch auf die Darmwand begrenzte Tumoren bereits synchrone Lymphknoten- oder Lebermetastasen zeigen können. Ferner erlauben die derzeit verfügbaren immunhistochemischen Färbungen nahezu keine Aussage hinsichtlich der Gesamtprognose zu treffen.

Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Untersuchung bzw. Entdeckung prognostischer und prädiktiver Marker für das Metastasierungsverhalten und das tumorabhängige Überleben lokal begrenzter Kolonkarzinome.

Die molekularbiologische Untersuchung von K-Ras, sowie die immunhistochemischen Färbungen von pERK, mTOR,  $\beta$ -Catenin, c-MYC, MMP-9, PGK1 und VEGFR3 sollen im Kontext des klinischen Verlaufs zu einem besseren Verständnis der metastatischen Prozesse und deren Auswirkungen auf das Überleben beitragen. Während in der Literatur die prognostische Relevanz von K-Ras Mutationen weiterhin diskutiert wird, zeigt sich in unserem Kollektiv kein Zusammenhang mit dem Überleben. Die unter den mutierten Tumoren geringer häufig auftretenden Lymphknotenmetastasen sind eine bisher nicht beschriebene Beobachtung. Dies bleibt daher an einem größeren Kollektiv zu überprüfen. Besonders interessant erscheint der Zusammenhang zwischen pERK und dem häufigeren Auftreten von Lebermetastasen unter den pERK negativen Patienten. Dies ist mutmaßlich auch der Grund für das reduzierte Überleben dieser Patienten. Trotz der Vielzahl an Studien zum kolorektalen Karzinom gibt es abgesehen von wenigen kontroversen Studien zum Rektumkarzinom keinerlei weitere Studien, die Zusammenhänge zwischen der pERK-Expression und der Prognose beim Kolonkarzinom untersuchen. Daher ergibt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie ein breites Spektrum an offenen Fragestellungen. Zunächst steht im Vordergrund die Aufarbeitung der metachronen Metastasen in unserem Patientenkollektiv im

langfristigen Verlauf. Bei pERK klingt exemplarisch bereits an, dass die Expression am Primärtumor möglicherweise auch eine Aussage über das Auftreten metachroner Metastasen erlauben könnte. Gleichmaßen sollten die Ergebnisse an den folgenden Jahrgängen überprüft werden. Ferner gilt es anhand von Biopsien vor neoadjuvanter Radiochemotherapie beim Rektum die derzeit noch widersprüchlichen Ergebnisse zu überprüfen. Sollte sich eine Vergesellschaftung von pERK-Expression und metachroner Metastasierung ergeben, könnte dies ein wichtiger Pfeiler der personalisierten Tumornachsorge bilden.

## 6 Literaturverzeichnis

- AHMAD, S. S., GLATZLE, J., BAJAEIFER, K., BUHLER, S., LEHMANN, T., KONIGSRAINER, I., VOLLMER, J. P., SIPOS, B., AHMAD, S. S., NORTHOFF, H., KONIGSRAINER, A. & ZIEKER, D. 2013. Phosphoglycerate kinase 1 as a promoter of metastasis in colon cancer. *Int J Oncol*, 43, 586-90.
- AKMAN, T., OZTOP, I., BASKIN, Y., UNEK, I. T., DEMIR, N., ELLIDOKUZ, H. & YILMAZ, A. U. 2016. The association of clinicopathological features and survival in colorectal cancer patients with kras mutation status. *J Cancer Res Ther*, 12, 96-102.
- ALITALO, K. & CARMELIET, P. 2002. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1, 219-27.
- AMADO, R. G., WOLF, M., PEETERS, M., VAN CUTSEM, E., SIENA, S., FREEMAN, D. J., JUAN, T., SIKORSKI, R., SUGGS, S., RADINSKY, R., PATTERSON, S. D. & CHANG, D. D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1626-34.
- AMEIS, H. M., DRENCKHAN, A., VON LOGA, K., ESCHERICH, G., WENKE, K., IZBICKI, J. R., REINSHAGEN, K. & GROS, S. J. 2013. PGK1 as predictor of CXCR4 expression, bone marrow metastases and survival in neuroblastoma. *PLoS One*, 8, e83701.
- ANDREATOS, N., RONNEKLEIV-KELLY, S., MARGONIS, G. A., SASAKI, K., GANI, F., AMINI, N., WILSON, A. & PAWLIK, T. M. 2016. From bench to bedside: Clinical implications of KRAS status in patients with colorectal liver metastasis. *Surgical Oncology*, 25, 332-338.
- ANDREYEV, H. J., NORMAN, A. R., CUNNINGHAM, D., OATES, J. R. & CLARKE, P. A. 1998a. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*, 90, 675-84.
- ANDREYEV, H. J. N., NORMAN, A. R., CLARKE, P. A., CUNNINGHAM, D. & OATES, J. R. 1998b. Kirsten ras Mutations in Patients With Colorectal Cancer: the Multicenter "RASCAL" Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90, 675-684.
- APARICIO, T., KERMORGANT, S., DESSIRIER, V., LEWIN, M. J. & LEHY, T. 1999. Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis*, 20, 1445-51.
- ARII, S., ISHIGAMI, S., MORI, A., ONODERA, H. & IMAMURA, M. 1998. [Implication of VEGF and MMPs in hepatic metastasis of human colon cancer]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 99, 436-40.
- BABA, Y., NOSHO, K., SHIMA, K., MEYERHARDT, J. A., CHAN, A. T., ENGELMAN, J. A., CANTLEY, L. C., LODA, M., GIOVANNUCCI, E., FUCHS, C. S. & OGINO, S. 2010. Prognostic significance of AMP-activated protein kinase expression and modifying effect of MAPK3/1 in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 103, 1025-1033.

- BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. U., MOCH, H., HÖFLER, G. & KREIPE, H. H. 2012. *Pathologie*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- BONNI, A., BRUNET, A., WEST, A. E., DATTA, S. R., TAKASU, M. A. & GREENBERG, M. E. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, 286, 1358-62.
- BOS, J. L. 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res*, 195, 255-71.
- BRABLETZ, T., JUNG, A., HERMANN, K., GUNTHER, K., HOHENBERGER, W. & KIRCHNER, T. 1998. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathology Research and Practice*, 194, 701-704.
- BRUDVIK, K. W., KOPETZ, S. E., LI, L., CONRAD, C., ALOIA, T. A. & VAUTHEY, J. N. 2015. Meta-analysis of KRAS mutations and survival after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 102, 1175-83.
- BRUUN, J., KOLBERG, M., NESLAND, J. M., SVINDLAND, A., NESBAKKEN, A. & LOTHE, R. A. 2014. Prognostic Significance of beta-Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series. *Front Oncol*, 4, 118.
- BUCK, E., EYZAGUIRRE, A., BROWN, E., PETTI, F., MCCORMACK, S., HALEY, J. D., IWATA, K. K., GIBSON, N. W. & GRIFFIN, G. 2006. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther*, 5, 2676-84.
- BUHMEIDA, A., BENDARDAF, R., HILSKA, M., COLLAN, Y., LAATO, M., SYRJANEN, S., SYRJANEN, K. & PYRHONEN, S. 2009. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer*, 40, 91-7.
- CHAMBERS, A. F. & MATRISIAN, L. M. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1260-70.
- CHEN, Z., HE, X., JIA, M., LIU, Y., QU, D., WU, D., WU, P., NI, C., ZHANG, Z., YE, J., XU, J. & HUANG, J. 2013. beta-catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 8, e63854.
- CHO, K. R. & VOGELSTEIN, B. 1992a. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer*, 70, 1727-31.
- CHO, K. R. & VOGELSTEIN, B. 1992b. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl*, 16g, 137-41.
- CHU, D., ZHAO, Z., ZHOU, Y., LI, Y., LI, J., ZHENG, J., ZHAO, Q. & WANG, W. 2012. Matrix metalloproteinase-9 is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 19, 318-25.
- CHUNG, G. G., PROVOST, E., KIELHORN, E. P., CHARETTE, L. A., SMITH, B. L. & RIMM, D. L. 2001. Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res*, 7, 4013-20.
- DALY, E. B., WIND, T., JIANG, X. M., SUN, L. & HOGG, P. J. 2004. Secretion of phosphoglycerate kinase from tumour cells is controlled by oxygen-sensing hydroxylases. *Biochim Biophys Acta*, 1691, 17-22.
- DAVIES, J. M., TREMBATH, D., DEAL, A. M., FUNKHOUSER, W. K., CALVO, B. F., FINNEGAN, T., WECK, K. E., TEPPER, J. E. & O'NEIL, B. H. 2011. Phospho-ERK and AKT status, but not KRAS mutation status, are associated with outcomes in rectal cancer treated with chemoradiotherapy. *Radiat Oncol*, 6, 114.
- DE ROOCK, W., CLAES, B., BERNASCONI, D., DE SCHUTTER, J., BIESMANS, B., FOUNTZILAS, G., KALOGERAS, K. T., KOTOULA, V., PAPAMICHAEL, D., LAURENT-PUIG, P., PENAULT-LLORCA, F., ROUGIER, P., VINCENZI, B., SANTINI, D., TONINI, G., CAPPUZZO, F., FRATTINI, M., MOLINARI, F., SALETTI, P., DE DOSSO, S., MARTINI, M., BARDELLI, A., SIENA, S., SARTORE-BIANCHI, A., TABERNERO, J., MACARULLA, T., DI FIORE, F., GANGLOFF, A. O., CIARDIELLO, F., PFEIFFER, P., QVORTRUP, C., HANSEN, T. P., VAN CUTSEM, E., PIESSEVAUX, H., LAMBRECHTS, D., DELORENZI, M. & TEJPAR, S. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*, 11, 753-62.

- DENG, G., KAKAR, S., TANAKA, H., MATSUZAKI, K., MIURA, S., SLEISENGER, M. H. & KIM, Y. S. 2008. Proximal and distal colorectal cancers show distinct gene-specific methylation profiles and clinical and molecular characteristics. *Eur J Cancer*, 44, 1290-301.
- DOUILLARD, J. Y., SIENA, S., CASSIDY, J., TABERNERO, J., BURKES, R., BARUGEL, M., HUMBLET, Y., BODOKY, G., CUNNINGHAM, D., JASSEM, J., RIVERA, F., KOCÁKOVÁ, I., RUFF, P., BŁASIŃSKA-MORAWIEC, M., ŠMAKAL, M., CANON, J. L., ROTHER, M., OLINER, K. S., TIAN, Y., XU, F. & SIDHU, R. 2014. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 25, 1346-1355.
- DUFF, S. E., JEZIORSKA, M., ROSA, D. D., KUMAR, S., HABOUBI, N., SHERLOCK, D., O'DWYER, S. T. & JAYSON, G. C. 2006. Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. *Eur J Cancer*, 42, 112-7.
- DUTTA, P. R. & MAITY, A. 2007. Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett*, 254, 165-77.
- EILERS, M. & EISENMAN, R. N. 2008. Myc's broad reach. *Genes Dev*, 22, 2755-66.
- ERHARDT, P., SCHREMSER, E. J. & COOPER, G. M. 1999. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol*, 19, 5308-15.
- ERISMAN, M. D., LITWIN, S., KEIDAN, R. D., COMIS, R. L. & ASTRIN, S. M. 1988. Noncorrelation of the expression of the c-myc oncogene in colorectal carcinoma with recurrence of disease or patient survival. *Cancer Res*, 48, 1350-5.
- FONG, Y., FORTNER, J., SUN, R. L., BRENNAN, M. F. & BLUMGART, L. H. 1999. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*, 230, 309-18; discussion 318-21.
- FOSTER, D. A. 2009. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1791, 949-55.
- FUNAKI, H., NISHIMURA, G., HARADA, S., NINOMIYA, I., TERADA, I., FUSHIDA, S., TANI, T., FUJIMURA, T., KAYAHARA, M., SHIMIZU, K., OHTA, T. & MIWA, K. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. *Oncology*, 64, 416-22.
- GAO, Z. H., LU, C., WANG, M. X., HAN, Y. & GUO, L. J. 2014. Differential beta-catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett*, 8, 2069-2076.
- GARNETT, M. J. & MARAIS, R. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6, 313-9.
- GEORGIEVA, M., KRASTEVA, M., ANGELOVA, E., RALCHEV, K., DIMITROV, V., BOZHIMIROV, S., GEORGIEVA, E. & BERGER, M. R. 2008. Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients. *Oncol Rep*, 20, 3-11.
- GERG, M., KOPITZ, C., SCHATEN, S., TSCHUKES, A., KAHLERT, C., STANGL, M., VON WEYHERN, C. W., BRUCHER, B. L., EDWARDS, D. R., BRAND, K. & KRUGER, A. 2008. Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases. *Mol Cancer Res*, 6, 341-51.
- GOH, H. S., SOONG, T. W., LEE, Y. S., HO, J. & GOH, C. R. 1990. c-myc Oncogene expression in colorectal cancer: its use in prognosis and role in colorectal carcinogenesis. *Ann Acad Med Singapore*, 19, 139-41.
- GORDEN, D. L., FINGLETON, B., CRAWFORD, H. C., JANSEN, D. E., LEPAGE, M. & MATRISIAN, L. M. 2007. Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int J Cancer*, 121, 495-500.
- GORUKMEZ, O., YAKUT, T., GORUKMEZ, O., SAG, S. O., KARKUCAK, M. & KANAT, O. 2016. Distribution of KRAS and BRAF Mutations in Metastatic Colorectal Cancers in Turkish Patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17, 1175-9.
- GRESS, T. M., MULLER-PILLASCH, F., LERCH, M. M., FRIESS, H., BUCHLER, M. & ADLER, G. 1995. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 62, 407-13.

- GRUNWELLER, A. & HARTMANN, R. K. 2007. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs*, 21, 235-43.
- GUBA, M., VON BREITENBUCH, P., STEINBAUER, M., KOEHL, G., FLEGEL, S., HORNING, M., BRUNS, C. J., ZUELKE, C., FARKAS, S., ANTHUBER, M., JAUCH, K. W. & GEISLER, E. K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*, 8, 128-35.
- GUNTHER, K., BRABLETZ, T., KRAUS, C., DWORAK, O., REYMOND, M. A., JUNG, A., HOHENBERGER, W., KIRCHNER, T., KOCKERLING, F. & BALLHAUSEN, W. G. 1998. Predictive value of nuclear beta-catenin expression for the occurrence of distant metastases in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 41, 1256-61.
- HANRAHAN, V., CURRIE, M. J., GUNNINGHAM, S. P., MORRIN, H. R., SCOTT, P. A., ROBINSON, B. A. & FOX, S. B. 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*, 200, 183-94.
- HERZIG, D. O. & TSIKITIS, V. L. 2015. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J Surg Oncol*, 111, 96-102.
- HOLCK, S., NIELSEN, H. J., PEDERSEN, N. & LARSSON, L. I. 2015. Phospho-ERK1/2 levels in cancer cell nuclei predict responsiveness to radiochemotherapy of rectal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6, 34321-8.
- HUGH, T. J., DILLON, S. A., O'DOWD, G., GETTY, B., PIGNATELLI, M., POSTON, G. J. & KINSELLA, A. R. 1999. beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, 82, 504-11.
- HURWITZ, H. I., FEHRENBACHER, L., HAINSWORTH, J. D., HEIM, W., BERLIN, J., HOLMGREN, E., HAMBLETON, J., NOVOTNY, W. F. & KABBINAVAR, F. 2005. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 23, 3502-8.
- ILLEMANN, M., BIRD, N., MAJEED, A., SEHESTED, M., LAERUM, O. D., LUND, L. R., DANO, K. & NIELSEN, B. S. 2006. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res*, 4, 293-302.
- JASPERSON, K. W., TUOHY, T. M., NEKLASON, D. W. & BURT, R. W. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2044-58.
- JAUHRI, M., BHATNAGAR, A., GUPTA, S., BP, M., MINHAS, S., SHOKEEN, Y. & AGGARWAL, S. 2017. Prevalence and coexistence of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS, TP53, and APC mutations in Indian colorectal cancer patients: Next-generation sequencing-based cohort study. *Tumour Biol*, 39, 1010428317692265.
- JAYASINGHE, C., SIMIANTONAKI, N., MICHEL-SCHMIDT, R. & KIRKPATRICK, C. J. 2009. Endothelial VEGFR-3 expression in colorectal carcinomas is associated with hematogenous metastasis. *Oncol Rep*, 22, 1093-100.
- JI, L., WEI, Y., JIANG, T. & WANG, S. 2014. Correlation of Nrf2, NQO1, MRP1, cmyc and p53 in colorectal cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 1124-31.
- JONES, R. P., SUTTON, P. A., EVANS, J. P., CLIFFORD, R., MCAVOY, A., LEWIS, J., ROUSSEAU, A., MOUNTFORD, R., MCWHIRTER, D. & MALIK, H. Z. 2017. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*, 116, 923-929.
- K. SINGH, S., A. KOSHKIN, A., WENGEL, J. & NIELSEN, P. 1998. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications*, 455-456.
- KAATSCH, P., SPIX, C., KATALINIC, A., HENTSCHEL, S., LUTTMANN, S., STEGMAIER, C., CASPRITZ, S., CHRIST, M., ERNST, A., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KLEIN, S., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., WEG-REMERS, S., WITTENBERG, K., BARAS, N., BARNES, B., BERTZ, J., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., HABERLAND, J., KRAYWINKEL, K., WIENECKE, A. & WOLF, U. 2016. *Cancer in Germany 2011/2012* [Online]. Robert Koch Institute. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/EN/Content/Publications/Cancer\\_in\\_Germany/cancer](https://www.krebsdaten.de/Krebs/EN/Content/Publications/Cancer_in_Germany/cancer)

- [\\_chapters\\_2011\\_2012/cancer\\_germany\\_2011\\_2012.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](#)  
[Accessed 13.12.2017 2017].
- KAKISAKO, K., MIYAHARA, M., UCHINO, S., ADACHI, Y. & KITANO, S. 1998. Prognostic significance of c-myc mRNA expression assessed by semi-quantitative RT-PCR in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep*, 5, 441-5.
- KAMPOSIORAS, K., KONSTANTARA, A., KOTOULA, V., LAKIS, S., KOUVATSEAS, G., AKRIVIADIS, E., VRETTOU, E., DIONYSOPOULOS, D., KRIKELIS, D., PAPADOPOULOU, K., CHARALAMBOUS, E., CHRISAFI, S., KONSTANTARAS, C. & FOUNTZILAS, G. 2013. The prognostic significance of WNT pathway in surgically-treated colorectal cancer: beta-catenin expression predicts for disease-free survival. *Anticancer Res*, 33, 4573-84.
- KARAR, J. & MAITY, A. 2011. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*, 4, 51.
- KAWAKAMI, M., FURUHATA, T., KIMURA, Y., YAMAGUCHI, K., HATA, F., SASAKI, K. & HIRATA, K. 2003a. Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 22, 229-37.
- KAWAKAMI, M., FURUHATA, T., KIMURA, Y., YAMAGUCHI, K., HATA, F., SASAKI, K. & HIRATA, K. 2003b. Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Surgery*, 133, 300-8.
- KEMENY, N. E., CHOU, J. F., CAPANU, M., GEWIRTZ, A. N., CERCEK, A., KINGHAM, T. P., JARNAGIN, W. R., FONG, Y. C., DEMATTEO, R. P., ALLEN, P. J., SHIA, J., ANG, C., VAKIANI, E. & D'ANGELICA, M. I. 2014. KRAS mutation influences recurrence patterns in patients undergoing hepatic resection of colorectal metastases. *Cancer*, 120, 3965-71.
- KHALEGHPOUR, K., LI, Y., BANVILLE, D., YU, Z. & SHEN, S. H. 2004. Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 25, 241-8.
- KIM, J. Y., BAE, B. N., KWON, J. E., KIM, H. J. & PARK, K. 2011. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor in colorectal adenocarcinoma. *Apmis*, 119, 449-59.
- KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-70.
- KLIMPFINGER, M., ZISSER, G., RUHRI, C., PUTZ, B., STEINDORFER, P. & HOFER, H. 1990. Expression of c-myc and c-fos mRNA in colorectal carcinoma in man. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 59, 165-71.
- KOBAYASHI, M., HONMA, T., MATSUDA, Y., SUZUKI, Y., NARISAWA, R., AJIOKA, Y. & ASAKURA, H. 2000. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 82, 1689-93.
- KODAZ, H., HACIBEKIROGLU, I., ERDOGAN, B., TURKMEN, E., TOZKIR, H., ALBAYRAK, D., UZUNOGLU, S. & CICIN, I. 2015. Association between specific KRAS mutations and the clinicopathological characteristics of colorectal tumors. *Mol Clin Oncol*, 3, 179-184.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KOSHKIN, A. A., SINGH, S. K., NIELSEN, P., RAJWANSHI, V. K., KUMAR, R., MELDGAARD, M., OLSEN, C. E. & WENGEL, J. 1998. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54, 3607-3630.
- KOZMA, L., KISS, I., SZAKALL, S. & EMBER, I. 1994. Investigation of c-myc oncogene amplification in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 81, 165-9.
- KUGIMIYA, N., NISHIMOTO, A., HOSOYAMA, T., UENO, K., ENOKI, T., LI, T. S. & HAMANO, K. 2015. The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med*, 19, 1569-81.

- LAY, A. J., JIANG, X. M., KISKER, O., FLYNN, E., UNDERWOOD, A., CONDRON, R. & HOGG, P. J. 2000. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*, 408, 869-73.
- LEBEAU, A., NERLICH, A. G., SAUER, U., LICHTINGHAGEN, R. & LOHRS, U. 1999. Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas. *Anticancer Res*, 19, 4257-64.
- LEE, K. S., KWAK, Y., NAM, K. H., KIM, D. W., KANG, S. B., CHOE, G., KIM, W. H. & LEE, H. S. 2016. Favorable prognosis in colorectal cancer patients with co-expression of c-MYC and ss-catenin. *BMC Cancer*, 16, 730.
- LEVIDOU, G., SAETTA, A. A., GIGELOU, F., KARLOU, M., PAPANASTASIOU, P., STAMATELLI, A., KAVANTZAS, N., MICHALOPOULOS, N. V., AGROGIANNIS, G., PATSOURIS, E. & KORKOLOPOULOU, P. 2012. ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World J Surg Oncol*, 10, 47.
- LI, Z., CHEN, Y., WANG, D., WANG, G., HE, L. & SUO, J. 2012. Detection of KRAS mutations and their associations with clinicopathological features and survival in Chinese colorectal cancer patients. *J Int Med Res*, 40, 1589-98.
- LIN, J. S., WEBBER, E. M., SENGER, C. A., HOLMES, R. S. & WHITLOCK, E. P. 2011. Systematic review of pharmacogenetic testing for predicting clinical benefit to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Am J Cancer Res*, 1, 650-62.
- LIOTTA, L. A. 1986. Tumor Invasion and Metastases—Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, 46, 1-7.
- LITTLE, S. 2001. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 9, Unit 9.8.
- LU, W., GAO, J., YANG, J., CAO, Y., JIANG, L., LI, M., ZHANG, Y., ZHOU, J. & LIU, Y. 2015. Down-Regulated Phosphoglycerate Kinase 1 Expression Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Gallbladder Cancer. *Medicine (Baltimore)*, 94, e2244.
- LUBBE, W. J., ZHOU, Z. Y., FU, W., ZUZGA, D., SCHULZ, S., FRIDMAN, R., MUSCHEL, R. J., WALDMAN, S. A. & PITARI, G. M. 2006. Tumor epithelial cell matrix metalloproteinase 9 is a target for antimetastatic therapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 1876-82.
- LUGLI, A., ZLOBEC, I., MINOO, P., BAKER, K., TORNILLO, L., TERRACCIANO, L. & JASS, J. R. 2007. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis. *Histopathology*, 50, 453-64.
- MAJEK, O., GONDOS, A., JANSEN, L., EMRICH, K., HOLLECZEK, B., KATALINIC, A., NENNECKE, A., EBERLE, A. & BRENNER, H. 2012. Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century. *Br J Cancer*, 106, 1875-1880.
- MARGONIS, G. A., SPOLVERATO, G., KIM, Y., KARAGKOUNIS, G., CHOTI, M. A. & PAWLIK, T. M. 2015. Effect of KRAS Mutation on Long-Term Outcomes of Patients Undergoing Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology*, 22, 4158-4165.
- MARTINS, S. F., GARCIA, E. A., LUZ, M. A., PARDAL, F., RODRIGUES, M. & FILHO, A. L. 2013. Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 10, 55-67.
- MERKEL, S., BIALECKI, D., MEYER, T., MÜLLER, V., PAPADOPOULOS, T. & HOHENBERGER, W. 2009. Comparison of clinical risk scores predicting prognosis after resection of colorectal liver metastases. *Journal of Surgical Oncology*, 100, 349-357.
- MOEHLER, M., FRINGS, C., MUELLER, A., GOCKEL, I., SCHIMANSKI, C. C., BIESTERFELD, S., GALLE, P. R. & HOLTSMANN, M. H. 2008. VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World J Gastroenterol*, 14, 4156-67.
- MOOK, O. R., FREDERIKS, W. M. & VAN NOORDEN, C. J. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1705, 69-89.
- MORRIS, V. K., LUCAS, F. A., OVERMAN, M. J., ENG, C., MORELLI, M. P., JIANG, Z. Q., LUTHRA, R., MERIC-BERNSTAM, F., MARU, D., SCHEET, P., KOPETZ, S. & VILAR, R.



- E. 2014. Clinicopathologic characteristics and gene expression analyses of non-KRAS 12/13, RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 25, 2008-14.
- NASH, G. M., GIMBEL, M., SHIA, J., NATHANSON, D. R., NDUBUISI, M. I., ZENG, Z. S., KEMENY, N. & PATY, P. B. 2010. KRAS mutation correlates with accelerated metastatic progression in patients with colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*, 17, 572-8.
- ONOGAWA, S., KITADAI, Y., TANAKA, S., KUWAI, T., KIMURA, S. & CHAYAMA, K. 2004. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci*, 95, 32-9.
- ORMANNS, S., NEUMANN, J., HORST, D., KIRCHNER, T. & JUNG, A. 2014. WNT signaling and distant metastasis in colon cancer through transcriptional activity of nuclear beta-Catenin depend on active PI3K signaling. *Oncotarget*, 5, 2999-3011.
- PAEZ, J. G., JANNE, P. A., LEE, J. C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F. J., LINDEMAN, N., BOGGON, T. J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M. J., SELLERS, W. R., JOHNSON, B. E. & MEYERSON, M. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304, 1497-500.
- PASSIGLIA, F., BRONTE, G., BAZAN, V., GALVANO, A., VINCENZI, B. & RUSSO, A. 2016. Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 99, 150-7.
- PEKER, K., BASOGLU, M. & GURSAN, N. 2013. Relationship between beta-catenin expression and prognostic parameters of colorectal carcinomas. *Turk Patoloji Derg*, 29, 87-93.
- PENG, J., HUANG, D., POSTON, G., MA, X., WANG, R., SHENG, W., ZHOU, X., ZHU, X. & CAI, S. 2017. The molecular heterogeneity of sporadic colorectal cancer with different tumor sites in Chinese patients. *Oncotarget*, 8, 49076-49083.
- POWELL, S. M., ZILZ, N., BEAZER-BARCLAY, Y., BRYAN, T. M., HAMILTON, S. R., THIBODEAU, S. N., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359, 235-7.
- RIBEIRO, K. B., RIBEIRO, K. B., FERES, O., DA ROCHA, J. J. R., RAPATONI, L., GARCIA, S. B., SILVA, A. R., DA SILVA CASTRO PERDONA, G., DE SOUZA, H. C. C., SANTILLAN, S. I. G., DE OLIVEIRA, H. F., DA CUNHA TIRAPELLI, D. P. & PERIA, F. M. 2013. Clinical-Pathological Correlation of KRAS Mutation Status in Metastatic Colorectal Adenocarcinoma. *World J Oncol*, 4, 179-187.
- RIMBERT, J., TACHON, G., JUNCA, A., VILLALVA, C., KARAYAN-TAPON, L. & TOUGERON, D. 2017. Association between clinicopathological characteristics and RAS mutation in colorectal cancer. *Mod Pathol*.
- ROCHLITZ, C. F., HERRMANN, R. & DE KANT, E. 1996. Overexpression and amplification of c-myc during progression of human colorectal cancer. *Oncology*, 53, 448-54.
- ROSKOSKI, R., JR. 2012. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66, 105-43.
- SAITO, N., TOMITA, S., ICHIKAWA, K., MITOMI, H., IMURA, J. & FUJIMORI, T. 2014. Analysis of KRAS mutations in cases of metastatic colorectal cancer at a single institution in Tochigi, Japan. *Pathobiology*, 81, 133-7.
- SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-8.
- SHAW, R. J. & CANTLEY, L. C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441, 424-30.
- SHIBUYA, M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, 2, 1097-1105.
- SIMIANTONAKI, N., TAXEIDIS, M., JAYASINGHE, C. & KIRKPATRICK, C. J. 2007. Epithelial expression of VEGF receptors in colorectal carcinomas and their relationship to metastatic status. *Anticancer Res*, 27, 3245-50.
- SINHA, R., HUSSAIN, S., MEHROTRA, R., KUMAR, R. S., KUMAR, K., PANDE, P., DOVAL, D. C., BASIR, S. F. & BHARADWAJ, M. 2013. Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and

- metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One*, 8, e60142.
- STACHER, E., GRUBER-MOSENBACHER, U., HALBWEDL, I., DEI TOS, A. P., CAVAZZA, A., PAPOTTI, M., CARVALHO, L., HUBER, M., ERMERT, L. & POPPER, H. H. 2009. The VEGF-system in primary pulmonary angiosarcomas and haemangioendotheliomas: new potential therapeutic targets? *Lung Cancer*, 65, 49-55.
- SUZUKI, H., MASUDA, N., SHIMURA, T., ARAKI, K., KOBAYASHI, T., TSUTSUMI, S., ASAO, T. & KUWANO, H. 2008. Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*, 28, 1821-30.
- TANAKA, M., OMURA, K., WATANABE, Y., ODA, Y. & NAKANISHI, I. 1994. Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J Surg Oncol*, 57, 57-64.
- THOMAIDIS, T., MADERER, A., FORMENTINI, A., BAUER, S., TRAUTMANN, M., SCHWARZ, M., NEUMANN, W., KITNER, J. M., SCHAD, A., LINK, K. H., REY, J. W., WEINMANN, A., HOFFMAN, A., GALLE, P. R., KORNMANN, M. & MOEHLER, M. 2014. Proteins of the VEGFR and EGFR pathway as predictive markers for adjuvant treatment in patients with stage II/III colorectal cancer: results of the FOGT-4 trial. *J Exp Clin Cancer Res*, 33, 83.
- TOTH, L., ANDRAS, C., MOLNAR, C., TANYI, M., CSIKI, Z., MOLNAR, P. & SZANTO, J. 2012. Investigation of beta-catenin and E-cadherin expression in Dukes B2 stage colorectal cancer with tissue microarray method. Is it a marker of metastatic potential in rectal cancer? *Pathol Oncol Res*, 18, 429-37.
- VARNER, J. A. & CHERESH, D. A. 1996. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 724-30.
- VOGELSTEIN, B., FEARON, E. R., HAMILTON, S. R., KERN, S. E., PREISINGER, A. C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A. M. & BOS, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319, 525-32.
- WALLER, A., FINDEIS, S. & LEE, M. J. 2016. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*, 5, 78-83.
- WANG, D., CHEN, J., GUO, F., CHEN, H., DUAN, Z., WEI, M. Y., XU, Q. M., WANG, L. H. & ZHONG, M. Z. 2011. Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 2581-4.
- WITTE, D., THOMAS, A., ALI, N., CARLSON, N. & YOUNES, M. 2002. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 22, 1463-6.
- WITTEKIND, C., MEYER, HJ. 2010. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- YOON, S. & SEGER, R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24, 21-44.
- ZENG, Z. S. & GUILLEM, J. G. 1995. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br J Cancer*, 72, 575-82.
- ZHANG, X. M., HAN, W. X., WANG, H. Y. & HE, Q. 2017. Correlation between lymphatic endothelial markers and lymph node status or N-staging of colorectal cancer. *World J Surg Oncol*, 15, 204.
- ZHANG, Y. J., DAI, Q., SUN, D. F., XIONG, H., TIAN, X. Q., GAO, F. H., XU, M. H., CHEN, G. Q., HAN, Z. G. & FANG, J. Y. 2009. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 16, 2617-28.
- ZHUANG, L., LEE, C. S., SCOLYER, R. A., MCCARTHY, S. W., PALMER, A. A., ZHANG, X. D., THOMPSON, J. F., BRON, L. P. & HERSEY, P. 2005. Activation of the extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway in human melanoma. *J Clin Pathol*, 58, 1163-9.
- ZIEKER, D., KONIGSRAINER, I., TRAUB, F., NIESELT, K., KNAPP, B., SCHILLINGER, C., STIRNKORB, C., FEND, F., NORTHOFF, H., KUPKA, S., BRUCHER, B. L. & KONIGSRAINER, A. 2008. PGK1 a potential marker for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Cell Physiol Biochem*, 21, 429-36.
- ZIEKER, D., KONIGSRAINER, I., TRITSCHLER, I., LOFFLER, M., BECKERT, S., TRAUB, F., NIESELT, K., BUHLER, S., WELLER, M., GAEDCKE, J., TAICHMAN, R. S., NORTHOFF, H., BRUCHER, B. L. & KONIGSRAINER, A. 2010a. Phosphoglycerate

- kinase 1 a promoting enzyme for peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Cancer*, 126, 1513-20.
- ZIEKER, D., KONIGSRÄINER, I., WEINREICH, J., BECKERT, S., GLATZLE, J., NIESELT, K., BUHLER, S., LOFFLER, M., GAEDCKE, J., NORTHOFF, H., MANNHEIM, J. G., WIEHR, S., PICHLER, B. J., VON WEYHERN, C., BRUCHER, B. L. & KONIGSRÄINER, A. 2010b. Phosphoglycerate kinase 1 promoting tumor progression and metastasis in gastric cancer - detected in a tumor mouse model using positron emission tomography/magnetic resonance imaging. *Cell Physiol Biochem*, 26, 147-54.
- ZLOBEC, I., BIHL, M. P., SCHWARB, H., TERRACCIANO, L. & LUGLI, A. 2010. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer*, 127, 367-80.
- ZUCKER, S. & VACIRCA, J. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 23, 101-17.

## 7 Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 EGFR Signalweg nach Dutta et al (Dutta and Maity, 2007) .....	14
Abbildung 2 exemplarische LightCycler-Kurve.....	29
Abbildung 3 Übersichtsfotos Tissue-Microarray (H.E. Färbung) .....	32
Abbildung 4 Sekundäre Endpunkte K-Ras: Nodalstatus.....	37
Abbildung 5 Sekundäre Endpunkt K-Ras: Muzinöse Histologie .....	38
Abbildung 6 Kaplan-Meier-Kurve K-Ras .....	39
Abbildung 7 Färbebeispiel pERK.....	40
Abbildung 8 Primäre Endpunkt pERK.....	41
Abbildung 9 Sekundäre Endpunkte pERK: L- & V-Status.....	42
Abbildung 10 Kaplan-Meier-Kurve pERK.....	43
Abbildung 11 Färnebeispiel mTOR.....	45
Abbildung 12 Primäre Endpunkte mTOR .....	45
Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurve mTOR .....	46
Abbildung 14 Primäre Endpunkte $\beta$ -Catenin .....	48
Abbildung 15 Sekundäre Endpunkte $\beta$ -Catenin: Grading & Muzinöse Histologie .....	49
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve $\beta$ -Catenin .....	50
Abbildung 17 Primäre Endpunkte c-MYC.....	51
Abbildung 18 Kaplan-Meier-Kurve c-MYC.....	52
Abbildung 19 Primäre Endpunkt MMP-9 .....	54
Abbildung 20 Sekundäre Endpunkte MMP-9: Grading.....	55
Abbildung 21 Kaplan-Meier-Kurve MMP-9 .....	56
Abbildung 25 Primäre Endpunkte PGK1.....	58
Abbildung 26 Kaplan-Meier-Kurve PGK1 .....	59
Abbildung 27 Primäre Endpunkte VEGFR3 .....	60
Abbildung 28 Kaplan-Meier-Kurve VEGFR3 .....	61

Tabelle 1 UICC-Stadien .....	13
Tabelle 2 Baseline Charakteristika Patientenkollektiv .....	23
Tabelle 3 Histopathologische Befunde.....	24
Tabelle 4 Herstellerangaben Schmelztemperatur .....	29
Tabelle 5 Mutationstypen K-Ras .....	35
Tabelle 6 primäre Endpunkte K-Ras .....	36
Tabelle 7 Färbegrad pERK .....	40
Tabelle 8 Färbegrad mTOR.....	44
Tabelle 9 Färbegrad $\beta$ -Catenin.....	47
Tabelle 10 Färbegrad c-MYC .....	50
Tabelle 11 Färbegrad MMP-9.....	53
Tabelle 13 Färbegrad PGK1 .....	57
Tabelle 14 Färbegrad VEGFR3 .....	60
Tabelle 15 Hersteller Antikörper & Färbemodus .....	84
Tabelle 16 Hersteller Primer, Sonden, Detektions-KITs.....	88

## 8 Anhang

### 8.1 Antikörper Immunhistochemie

Name	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung	Protokoll
B-Catenin	Zytomed	03-2264	1:400	#485
c-MYC	Abcam	Ab23072	1:200	#485
MMP-9	Thermo Scientific	RB-9234-R7		#468
mTOR	Cell Signaling	#2983	1:50	#317
pERK	Cell Signaling	#9101	1:200	#456
PGK1	Santa Cruz Biotechnoly Inc	sc-48342	1:200	#317
VEGFR-3	Santa Cruz Biotechnoly Inc	sc-321	1:200	externe Färbung s.u.

Tabelle 14 Hersteller Antikörper & Färbemodus

### 8.1.1 Färbeprotokolle

Die unten aufgelisteten Protokolle wurden alle Standardmäßig mit dem Ventana BenchMark XT gefärbt. Die jeweilige Protokollnummer entspricht dem Standard des Instituts für allgemeine Pathologie Tübingen und kann daher in anderen Labors abweichen.

#317

Nachweissystem: Ultra View DAB Detection Kit (Roche)

Vorbehandlung: cc1 Standard (cc1 = EDTA Puffer; Standard = Kochdauer 64')

Inkubationsdauer 1.AK: 32'

Inkubationstemperatur 1.AK: Raumtemperatur

#456

Nachweissystem: Ultra View Red (Roche)

Vorbehandlung: cc1 Standard (cc1 = EDTA Puffer; Standard = Kochdauer 64')

Inkubationsdauer 1.AK: 32'

Inkubationstemperatur 1.AK: Raumtemperatur

#468

Nachweissystem: iView DAB Detection Kit (Roche)

Blocker: Avidin / Biotin Block (Roche) eingeschaltet (Inkubationsdauer autom.)

Vorbehandlung: cc1 Standard (cc1 = EDTA Puffer; Standard = Kochdauer 64')

Inkubationsdauer 1.AK: 32'

Inkubationstemperatur 1.AK: 37°C

#485

Nachweissystem: iView DAB Detection Kit (Roche)

Vorbehandlung: cc1 Standard (cc1 = EDTA Puffer; Standard = Kochdauer 64')

Inkubationsdauer 1.AK: 32'

Inkubationstemperatur 1.AK: 37°C

VEGFR-3

Durchführung der Färbung nach Herstellerangaben mit dem Ventana Färbeautomaten am pathologischen Institut der Universität Graz (Prof. Dr. Helmut Popper).

Nachweissystem iView DAB Detection Kit (Roche)

Vorbehandlung: cc1 mild

## **8.2 Geräte**

Roche LightCycler II Thermal Cycler Model 1.5 (32 Lots)

Beckman Coulter GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Ver. 10.2.3)

Ventana Färbeautomat Benchmark TX, Discovery TX

Carl Zeiss Mirax Desk

PCR Applied Biosystems GeneAMP PCR System 9700

## **8.3 Molekularbiologische Protokolle und Verbrauchsmittel**

### **8.3.1 PCR-Protokoll**

Denaturierung      60sec 95°C

55 Zyklen:

45sec 95°C

75sec 58°C

60sec 72°C

Abschließend: 10min 72°C

### 8.3.2 PCR-Mix (Mastermix)

H<sub>2</sub>O = 36,7µl

Puffer (10x) = 5,0µl

dNTPs = 2,0µl (10mmol) (desoxy-Nukleotidtriphosphate)

Primer Forward = 1,0µl (10nmol)

Primer Backward = 1,0µl (10nmol)

LNA = 1,0µl (1nmol / 2nmol)

Taq Gold = 0,3µl (1,5 Unit) (Termophilus aquaticus  
Polymerase)

### 8.3.3 PCR-Primer Sequenz

Primer 1 Forward 5'-AAggCCTgCTgAAAATgACTg-3'

Primer 2 Reverse 5'-AgAATggTCCTgCaCCAgTAA-3'

### 8.4.1 Light-Cycler Mix

H<sub>2</sub>O = 6,4µl

MgCL<sub>2</sub> = 1,6µl

Sonde Anchor = 1,0µl (1nmol)

Sonde Sensor = 1,0µl (2nmol)

### 8.4.2 LightCycler-Analyse-Sonden

Anchor: CACAAATgATTCTgAATTAgCTgTATCgTCAAaggCAC..FL

Sensor 12Cys: LC640-TTgCCTACgCCACAAgCTCCAA--PH

LNA

CCTACgCCACCAgCTCC-PH

**8.5 Hersteller Verbrauchsmaterialien**

Name	Hersteller	Referenznummer
AmpliTaqGold Polymerase	Applied Biosystems / ThermoFisherScientific	N8080244
Proteinase K	Qiagen	19157
dNTP Mix	Applied Biosystems / ThermoFisherScientific	R0193
Primer 1 „Forward“ K-Ras F	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH	
Primer 2 „Reverse“ K12R2	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH	
LNA	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH	
Anchor Sonde (Anchor-12)	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH	
Sensor Sonde 12-Cys Sensor	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH	
iVIEW DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems, Inc. (Roche)	05266157001
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit	Ventana Medical Systems, Inc. (Roche)	05269814001
ultraView Universal DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems, Inc. (Roche)	05269806001

Tabelle 15 Hersteller Primer, Sonden, Detektions-KITs



## **Erklärung des Eigenanteils**

Die Studie wurde konzipiert von Herrn Dr. med. Claudius Falch und Herrn Prof. Dr. med. Björn Brücher.

Unter Supervision von Herrn Falch wurde im Vorfeld des Projektes von Frau Jennifer Finck und Frau Tanja Skibnewski das Patientenkollektiv eine klinische Datenbank inklusive des onkologischen Follow-Ups erstellt, welche das klinische Korrelat der statistischen Analysen bzw. Überlebenskurven darstellt. Die Daten wurden nach Abschluss der Versuche von Herrn Falch zur Verfügung gestellt.

Die histologischen Schnitte wurden von mir, Jens Strohäker, gesichtet, ausgewählt und von den jeweiligen Blöcken mehrere Paraffinschnitte erstellt, aus welchen die DNA Extraktion erfolgte. Nach Einweisung von Frau Seba Colak (leitende medizinisch technische Assistentin im Bereich Molekularbiologie am Institut für allgemeine Pathologie) führte ich die DNA Extraktion, Vervielfältigung sowie die Schmelzpunktanalysen durch und wertete diese selbstständig aus.

Die Gensequenzierungen wurden durch Frau Seba Colak durchgeführt und durch Sie und mich ausgewertet.

Der Tissue Microarray wurde von Frau Claudia Beschorner, medizinisch technische Assistentin am Institut für Pathologie, erstellt. Die Schnitte vom TMA wurden vordergründig von Frau Anne Adam und Frau Claudia Hermann (jeweils leitende medizinisch technische Assistentinnen im Fachbereich Immunhistochemie) des Instituts für Pathologie geschnitten und mittels Färbeautomaten gefärbt. Die VEGFR-3-Färbung wurde extern im Pathologischen Institut der Universität Graz nach Maßgaben von Herrn Prof. Dr. H. Popper durchgeführt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte durch mich nach klinischer Einarbeitung durch Herrn Dr. Claus Hann von Weyhern und Prof. Dr. Patrick Adam. Letzterer verifizierte stichprobenartig meine Bewertung der Schnitte.

Die statistische Auswertung wurde von mir selbstständig durchgeführt. Dies erfolgte nach entsprechender Beratung durch das Institut für medizinische Biometrie (vertreten durch Frau Dr. Aline Naumann). Die Ergebnisse wurden auch im Nachgang mit Frau Dr. Naumann diskutiert.

Die Arbeit wurde zunächst durch Herrn Brücher betreut. Nach dessen Weggang aus Tübingen wurde diese Rolle durch Herrn Prof. Dr. Falko Fend übernommen. Dieser betreute die Arbeit bis zu deren Abschluss.

Das Projekt wurde durch das IZKF-Promotionskolleg finanziell und auch beratend unterstützt. Dort wurden zudem unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Rodemann Kenntnisse über die gute wissenschaftliche Praxis nach Standard der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) erworben.

Ich versichere das Manuskript eigenständig verfasst und keine weiteren als die aufgeführten Quellen verwendet zu haben.

Tübingen den 26.04.2018,

Jens Strohäker

## Danksagung

Nach nunmehr siebenjähriger Arbeit an diesem Projekt ist die Zahl der beteiligten Mitarbeiter und Kollegen enorm gewachsen. Jeder von ihnen hat auf ganz besondere Weise zu dieser Arbeit beigetragen. Ohne der Reihenfolge eine Wertigkeit zukommen zu lassen, danke ich

Herrn Prof. Dr. Björn Brücher und Herrn Dr. Claudius Falch für die konstante Ermunterung und Unterstützung darin meine Ergebnisse national und international vorzustellen,

Frau Sema Colak für ihre unermessliche Geduld darin mir den molekularbiologischen Versuchsaufbau näher zu bringen,

Frau Christine Beschorner für die Erstellung der 6 TMA Blöcke,

Dem Team der Immunhistochemie um die beiden Chef-MTAs Anne Adam und Claudia Hermann für die Austestung der korrekten Vorbehandlung und Verdünnungsgrade, sowie die anschließenden Färbungen

Herrn Dr. Claus Hann von Weyhern und Herrn Prof. Dr. Patrick Adam, welche allzeit ein offenes Ohr für meine immerwährenden Fragen hatten,

Herrn Prof. Dr. Helmut Popper für seine Expertise in der Durchführung der VEGFR-3-Färbung,

Herrn Prof. Dr. Falko Fend für die Übernahme der Betreuung und seine Korrekturvorschläge, die den Abschluss der Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben,

Herrn Lukas Kösel für seine Lektorenarbeit,

Dem IZKF-Promotionskolleg der medizinischen Fakultät für die Finanzierung des Projekts im Rahmen des Promotionsstipendiums,

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat.

