

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und
Thoraxchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. K.-W. Jauch

Die Rolle von Biomarkern beim kolorektalen Karzinom und seinen Lebermetastasen

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Andreas Georg Bogner
aus München

2014

mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Barbara Mayer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Prechtel

Prof. Dr. Philip Bufler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2014

Die vorliegende Dissertation wurde von Oktober 2008 bis Februar 2013 in der Abteilung für chirurgische Forschung der Klinik und Poliklinik für Chirurgie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt (Direktor Prof. Dr. Dr. med. K.-W. Jauch).

Die Arbeit wurde betreut von Frau PD Dr. rer. nat. Barbara Mayer

Danksagung

Ich möchte Allen danken, die mich beim Erstellen dieser Dissertation unterstützt haben:

Allen voran Fr. PD Dr. Barbara Mayer, die mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat, mir mit Rat und Tat immer zur Seite stand und mir diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat. Sie hat meine ersten Schritte in der Forschung stets begleitet und mir die wissenschaftliche Sichtweise nähergebracht. Auch durch Ihren unermüdlichen Einsatz war es möglich unsere Ergebnisse auf Kongressen zu präsentieren und so wunderbare Erfahrungen zu sammeln.

Herr Prof. Dr. Dr. Jauch für die Aufnahme in seiner Abteilung und die Möglichkeit in der chirurgischen Forschung zu promovieren.

Frau Dr. Mareile Joka für die fachliche und persönliche Unterstützung in Bezug auf die Nachsorge und die Datenakquise zur Erstellung der Datenbank, sowie die persönliche Betreuung, Motivation und Hilfestellung im klinischen Teil der Dissertation.

Herr PD Dr. Andreas Jung vom pathologischen Institut der LMU für die Einarbeitung in die Pyrosequenzierung und die zur Verfügung gestellten Gerätschaften.

Herr Dr. Daniel Kloß für die freundliche Einarbeitung in die Methoden. Er hat mich mit steter Motivation und seinem gesunden Humor durch diese sehr intensive Zeit geführt.

Thomas Singer, Melanie Zoller und Jakob Gülden für die Hilfe bei sämtlichen immunhistologischen Techniken und der Verwendung von Ihnen generierter Daten. Ohne euch wäre die Zeit im Labor nur halb so schön gewesen.

Kathrin Halfter für die freundschaftliche und äußerst kompetente Hilfe bei Nachsorge und Pflege der Datenbank.

Fr. Hanisch für die Erstellung der Grafiken zur Zellsignalgebung.

Dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie für Ihre Unterstützung in Fragen der Statistik und Datenauswertung.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch allen Mitarbeitern der chirurgischen Forschung, der Verwaltung des Klinikums Großhadern und besonders allen Mitarbeitern und Doktoranden der AG-Metastasierung. Ohne euch wäre die Laborzeit niemals so spannend und erfreulich verlaufen: Cornelia Ludwig, Laura Rava, Karoline Weiler, Maximilian Beier, Karin von den Rotfelser, Francesca Weller, Christian Ilmberger, Veronika Geigenberger.

Widmung

Ich widme diese Doktorarbeit meiner Familie, meinen Eltern und Schwestern, auf die ich sehr stolz bin und auf die ich mich immer hundertprozentig verlassen kann. Für eure Unterstützung - gleich welcher Art - werde ich euch auf ewig dankbar sein.

Des Weiteren möchte ich diese Arbeit einer Person widmen, die mir unglaublich viel bedeutet:

Frau Architektin Karla Perezyera Benoit

Nur durch deine seelische, moralische, intellektuelle und motivierende Unterstützung ist es mir möglich gewesen diese Arbeit zu vollenden.

Danke!

Ergebnispräsentation:

Vorträge:

- 1) 29. Deutscher Krebskongress, Berlin 24.-27. Februar 2010, A. Bogner, KRAS/BRAF Mutationsstatus als prädiktiver Biomarker für die Anti-EGF-R Antikörpertherapie beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom
- 2) Doktorandenkolloquium der chirurgischen Klinik und Poliklinik, Großhadern, 24. Februar 2010, A. Bogner, KRAS/BRAF Mutationsstatus als prädiktiver Biomarker für die Anti-EGF-R Antikörpertherapie beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom

Posterpräsentation:

Doktorarbeitstage Medizin, 24. & 25. Juni 2009, München, Großhadern; A. Bogner, Identification of predictive molecular biomarkers in colorectal carcinoma.

Abstracts:

- 1) B. Mayer, A. Bogner, K.-W. Jauch, T. Singer, Onkologie 2010;33(suppl 2):1-228; KRAS/BRAF Mutationsstatus als prädiktiver Biomarker für die Anti-EGF-R Antikörpertherapie beim primären und metastasierten kolorektalen Karzinom
- 2) B. Mayer, T. Singer, A. Bogner, K.-W. Jauch, Onkologie 2010;33(suppl 2):1-228; Prädiktive Biomarker für chemotherapeutische und molekulare Therapiestrategien beim primären kolorektalen Karzinom und resektablen Lebermetastasen

Erklärung:

Von der Vielzahl der aufgeführten Methoden hat Herr Bogner folgende unter Anleitung alleine durchgeführt: Die Etablierung der Methodik von der Mikrodissektion bis zur DNS-Isolation über die PCR und Gelelektrophorese bis zur Pyrosequenzierung in unserer Arbeitsgruppe und aller hierzu erforderlichen Arbeitsschritte. Des Weiteren die Erhebung aller histopathologischen Daten, sowie die Erstellung der Datenbanken und die statistische Auswertung.

Bei folgenden Schritten hat er mit wesentlichem Anteil mitgewirkt: Erhebung der Nachsorgedaten.

Um auf eine höhere statistische Aussagekraft der Daten zu gelangen, musste die Patientenzahl erhöht werden, weswegen $n = 51$ Patientenproben - unter molekulargenetischen Aspekten von Jakob Gülden untersucht - hinzugefügt wurden.

Die immunhistochemischen Daten wurden freundlicherweise von Thomas Singer und Melanie Zoller zur Verfügung gestellt.

Die DNS-Sequenzierung mit der Methode nach Sanger wurde, nach Isolation der genomischen Patienten-DNS, vom pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München von der AG Jung durchgeführt.

Die verwendeten Grafiken zur Zellsignalgebung wurden im Auftrag der AG Metastasierung freundlicherweise von Fr. Hanisch, chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern, erstellt.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	III
WIDMUNG	IV
ERGEBNISPRÄSENTATION:	V
INHALTSVERZEICHNIS	VII
DAS KOLOREKTALE KARZINOM	1
1.1 THERAPIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS	1
1.1.1 <i>Allgemeines</i>	1
1.1.2 <i>Kolonkarzinom</i>	1
1.1.3 <i>Rektumkarzinom</i>	2
1.2 ADJUVANTE THERAPIE.....	3
1.2.1 <i>Chemotherapie</i>	3
1.2.1.1 5-Fluorouracil.....	3
1.2.1.2 Oxaliplatin	4
1.2.1.3 Irinotecan.....	4
1.3 LEBERMETASTASEN	5
1.3.1 <i>Allgemeines</i>	5
1.3.2 <i>Chemotherapie</i>	6
1.3.2.1 Bevacizumab.....	6
1.3.2.2 Cetuximab/Panitumumab.....	6
1.3.2.2.1 EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor)	7
1.3.2.2.2 Ras	7
1.3.2.2.3 Raf.....	8
1.3.2.3 Zweit-/Drittlinientherapie.....	9
2 DIE ROLLE VON GENEN UND WACHSTUMSFAKTOREN IN DER KARZINOGENESE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS: DIE ADENOM/DYSPLASIE- KARZINOM-SEQUENZ	10
2.1 TUMORBIOLOGISCHE MARKER MIT MÖGLICHER THERAPIERELEVANZ	11
2.1.1 <i>Her2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2)</i>	11
2.1.2 <i>IGF1-R (Insulin-like growth factor1 receptor)</i>	12
2.1.3 <i>c-Met (HGFR hepatocyte growth factor receptor)</i>	12
2.1.4 <i>CD44v6</i>	13
2.1.5 <i>Ki67 - Proliferationsindex</i>	14

2.1.6	<i>CD45-Aktivierungsstatus (PTPRC Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type C)</i>	14
2.1.7	<i>MHC Klasse II Protein HLA-DR</i>	14
2.2	ZIELSETZUNGEN	15
3	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	MATERIAL	17
3.1.1	<i>Geräte</i>	17
3.1.2	<i>Chemikalien und Material</i>	18
3.1.2.1	Allgemein	18
3.1.2.2	Molekularbiologie.....	20
3.1.3	<i>Software</i>	23
3.1.4	<i>Zelllinien</i>	24
3.1.5	<i>Patientenproben</i>	24
3.2	METHODEN	26
3.2.1	<i>Anfertigung von Gefrierschnitten</i>	26
3.2.2	<i>Hämalaun – Eosin – Färbung</i>	27
3.2.3	<i>Nilblau-Färbung</i>	28
3.2.4	<i>Mikrodissektion</i>	29
3.2.5	<i>DNS-Isolation aus Zellpellets</i>	31
3.2.6	<i>Photometrische DNS-Analyse</i>	32
3.2.7	<i>DNS-Isolation aus mikrodisseziertem Gewebe</i>	32
3.2.8	<i>Herstellung von Lösungen</i>	34
3.2.8.1	TAE – Puffer	34
3.2.8.2	HEPES – Puffer	34
3.2.8.3	Primerlösungen	34
3.2.8.4	Orange G Ladepuffer	35
3.2.8.5	2%-ige Eosin Lösung.....	35
3.2.9	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	36
3.2.10	<i>Gelelektrophorese</i>	38
3.2.11	<i>Pyrosequenzierung</i>	41
3.2.11.1	Funktionsweise.....	41
3.2.11.2	Durchführung	42
3.2.12	<i>DNS-Sequenzierung mit der Methode nach Sanger</i>	43
3.2.13	<i>Erstellung einer Datenbank</i>	44
3.2.14	<i>Statistische Auswertung</i>	44
3.2.14.1	Datenbank in SPSS	44
3.2.14.2	Skalierung und Prüfung auf Normalverteilung.....	44
3.2.14.3	Univariate Analyse	46
3.2.14.4	Kaplan-Meier-Schätzer	46

3.2.14.5	Cox-Regressionsanalyse	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	ZELLINIEN	48
4.1.1	<i>Quantitative DNS-Analyse</i>	48
4.1.2	<i>Molekulare Analyse</i>	49
4.2	PATIENTENKOLLEKTIVBESCHREIBUNG	51
4.2.1	<i>Übersicht Primaria</i>	51
4.2.2	<i>Übersicht Lebermetastasen</i>	55
4.2.3	<i>Klinisch-pathologische Daten</i>	59
4.2.3.1	Primärtumoren	59
4.2.3.2	Lebermetastasen	62
4.2.4	<i>Patientenauswertung</i>	64
4.2.4.1	BRaf	64
4.2.4.2	KRas	65
4.2.4.3	Graphische Darstellung KRas Mutationsanalyse.....	67
4.2.4.4	Graphische Darstellung Pyrosequenzierung BRaf Mutationsanalyse.....	70
4.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	71
4.3.1	<i>Univariate Analyse</i>	71
4.3.1.1	Skalierung, Verteilung und Verbundenheit.....	71
4.3.1.2	Übersicht.....	71
4.3.1.3	Primärtumoren	72
4.3.1.4	Lebermetastasen	75
4.3.2	<i>Überleben</i>	77
4.3.2.1	Kaplan-Meier-Kurven Primärtumoren.....	77
4.3.2.2	Kaplan-Meier-Kurven Lebermetastasen.....	82
4.3.2.3	Cox-Regressionsmodell.....	85
4.3.2.3.1	Primärtumoren	85
4.3.2.3.2	Lebermetastasen	86
5	DISKUSSION	88
5.1	KLINISCH-PATHOLOGISCHE FAKTOREN	88
5.1.1	<i>Primärtumoren</i>	88
5.1.1.1	Alter, Geschlecht, BMI, ASA.....	88
5.1.1.2	TNM.....	89
5.1.1.3	Grading	90
5.1.1.4	Histologie	90
5.1.1.5	Tumormarker	90
5.1.1.6	Tumorlokalisation.....	91
5.1.2	<i>Lebermetastasen</i>	92
5.1.2.1	Alter, Geschlecht, BMI, ASA.....	92

5.1.2.2	Lokalisation, UICC-Primärtumor.....	93
5.1.2.3	Histologie	93
5.1.2.4	Tumormarker	93
5.1.2.5	Fong Score	94
5.2	MOLEKULARE MARKER	94
5.2.1	<i>KRas</i>	94
5.2.2	<i>BRaf</i>	96
5.2.3	<i>Zelllinien</i>	97
5.2.4	<i>Bevacizumab und VEGF</i>	98
5.3	METASTASIERUNG.....	98
5.4	KONVENTIONELLE CHEMOTHERAPIE.....	100
5.5	SIGNALTRANSDUKTION.....	100
5.6	INDIVIDUELLE THERAPIESTRATEGIE UND AUSBLICK.....	102
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	104
7	ANHANG.....	107
7.1	TABELLEN ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN	107
7.1.1	<i>ASA-Klassifikation</i>	107
7.1.2	<i>TNM-Klassifikation</i>	107
7.1.3	<i>UICC-Stadium</i>	108
7.1.4	<i>Grading</i>	108
7.2	STATISTIK.....	109
7.2.1	<i>Tabelle Skalierung, Verteilung und Verbundenheit</i>	109
7.2.2	<i>Statistische Algorithmen</i>	111
7.2.3	<i>Tabelle univariate Analyse nicht signifikante Ergebnisse</i>	113
7.2.4	<i>Kreuztabellen für Chi²-Tests der Univariateanalyse</i>	129
7.2.5	<i>Tabelle Überleben nichtsignifikante Ergebnisse Primaria</i>	136
7.2.6	<i>Tabelle Überleben nichtsignifikante Ergebnisse Lebermetastasen</i>	137
7.3	IMMUNHISTOCHEMIE	139
7.3.1	<i>Material</i>	139
7.3.2	<i>Methodik</i>	139
7.3.2.1	Antikörper	140
7.3.2.2	Auswertung	143
7.3.3	<i>Festlegung der Schwellenwerte</i>	144
7.3.4	<i>Ergebnisse der Immunhistochemie</i>	144
7.4	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	147

7.5	TABELLENVERZEICHNIS.....	148
7.6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	150
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	158
	LITERATURVERZEICHNIS	163

Das kolorektale Karzinom

1.1 Therapie des Kolorektalen Karzinoms

1.1.1 Allgemeines

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in Europa und der westlichen Welt hat seit den 60er Jahren stetig abgenommen[1, 2]. Aktuelle Daten des Robert Koch-Instituts beziffern die Inzidenz auf etwa 17-18 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr[3]. Dies ist sicherlich auch auf die stetige Verbesserung der Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms zurückzuführen. So können Patienten heutzutage nicht nur von verbesserten chirurgischen Therapiekonzepten, Neuerungen auf dem Gebiet der Chemotherapie und von molekularen Therapeutika profitieren. Die onkologische Behandlung hat sich zu einem interdisziplinären Behandlungskonzept entwickelt, bei dem in sog. „Tumorboards“ die optimale Behandlungsstrategie für den Patienten erarbeitet wird.

Die Therapie des KRK muss in die Therapie des Kolonkarzinoms und des Rektumkarzinoms unterteilt werden, da beide Entitäten unterschiedlich behandelt werden.

Die hier vorgestellten Therapieempfehlungen sind der S3-Leitlinie zum KRK von Schmiegel, W. et al. 2008[4] entnommen. Da im Laufe des Jahres 2013 eine neue Leitlinie zum KRK erscheinen soll, konnten deren Ergebnisse nicht mehr berücksichtigt werden. Der Goldstandard in der Therapie des kolorektalen Karzinoms ist weiterhin die operative Entfernung des Tumors. Nur so kann eine definitive Heilung ermöglicht werden. Die Ergebnisse der laparoskopischen Tumorresektion sind derzeit wegen fehlender onkologischer Langzeitergebnisse nicht abschließend zu beurteilen, sodass dieses Verfahren nur im Rahmen von qualifizierten Studien mit langfristiger Verlaufsbeobachtung zur Anwendung kommen sollte[5]. Auch bezüglich der Vorteile der Lebensqualität nach laparoskopischen Resektionen sind keine überzeugenden Vorteile erkennbar[6]. Jedoch legen aktuelle Meta-Analysen vergleichbare Ergebnisse beider Techniken nahe, sodass laparoskopische Techniken gleichwertige Alternativen zur offenen Operation darstellen können[7, 8].

1.1.2 Kolonkarzinom

Kolorektale Karzinome wachsen vorwiegend zirkulär und metastasieren weitgehend konstant in die lokoregionären Lymphknoten. Unter dem Gesichtspunkt des intramuralen mikroskopischen Tumorwachstums wäre ein Sicherheitsabstand von zwei cm ausreichend. Die Lymphknoten-Metastasen breiten sich jedoch zentral entlang der versorgenden Gefäße, primär entlang der perikolischen Gefäßbarkaden bis zu zehn cm vom makroskopischen Tumorrand entfernt, aus. Das Ausmaß der Darmresektion wird durch die Resektion der versorgenden Gefäße und das hierdurch definierte Lymphabflussgebiet vorgegeben. Liegt der Primärtumor zwischen zwei zentralen Gefäßen, werden beide mit entfernt, sodass mindestens zehn cm beidseits des Tumors resiziert werden[4]. Bei Kar-

zinomen des Zökum und des Kolon ascendens ist die Regeloperation eine Hemikolektomie rechts. Bei Karzinomen der rechten Flexur und des proximalen Kolon transversum wird aufgrund der Gefäßversorgung eine erweiterte Hemikolektomie rechts durchgeführt. Bei Tumoren in der Mitte des Kolon transversum erfolgt die Transversumresektion unter Mitresektion der Flexuren. Das Vorgehen bei Karzinomen des distalen Transversumdrittels und der linken Kolonflexur ist analog zur rechten Flexur die erweiterte Hemikolektomie links. Beim Vorliegen von Tumoren des Kolon descendens und proximalen Sigmas ist eine Hemikolektomie links indiziert. Liegen Karzinome im Bereich des mittleren und distalen Sigma vor, erfolgt eine (radikale) Sigmaresektion[4].

Entscheidend für die Prognose und die weitere Therapieentscheidung ist im operativen Zusammenhang der Resektionsstatus. Hier ist nach Möglichkeit eine R0-Resektion anzustreben. Im Patienten verbleibende mikroskopisch (R1) oder makroskopisch (R2) sichtbare Tumorreste bestimmen maßgeblich das weitere Vorgehen, das Risiko ein Lokalrezidiv zu erleiden, sowie Prognose und Überleben[4, 9, 10].

Die Einteilung in linkes und rechtes Kolon erfolgt aus chirurgischer Sicht entlang der anatomischen Gefäßversorgung. Im Bereich der Riolan-Anastomose geht die Gefäßversorgung des Kolons von der A. colica media in die A. colica sinistra über. Dort im Bereich der linken Kolonflexur endet das rechte und beginnt das linke Kolon[11]. Tumoren im rechten Kolon sind häufig größer, von fortgeschrittenerem Stadium, häufiger gering differenziert und Muzin-produzierend. Zusätzlich haben sie häufiger ein peritumorales Lymphozyteninfiltrat und hohe Level an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, sowie seltener einen Infiltrationssaum als Tumoren im linken Kolon und Rektum. Dies lässt den Schluss zu, dass möglicherweise unterschiedliche Karzinogenese-Mechanismen an der Tumorentstehung in linkem und rechtem Kolon beteiligt sind[12].

1.1.3 Rektumkarzinom

Nach dem internationalen Dokumentationssystem[13] gelten als Rektumkarzinome Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist. Gemäß UICC 2003 werden die Rektumkarzinome entsprechend ihrem Abstand von der Anokutanlinie in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12 – 16 cm), des mittleren Rektumdrittels (6 – < 12 cm) und des unteren Rektumdrittels (< 6 cm) unterteilt[14]. Demgegenüber gelten in den USA[15] als Kolonkarzinome Tumoren, die mehr als 12 cm und als Rektumkarzinome Tumoren, die 12 cm und weniger von der Linea anocutanea entfernt sind. Begründet wird dies mit der deutlich höheren Lokalrezidivrate bei Tumoren unterhalb von 12 cm[16].

Bei Tumoren des oberen Rektumdrittels erfolgt die Durchtrennung des Rektums mit partieller Mesorektumexzision 5 cm distal des makroskopischen Tumorrands, gemessen in vivo mittels einer anterioren Rektumresektion.

Eine lokale komplette chirurgische Tumorexzision (R0) beim Rektumkarzinom (Vollwandexzision) kann bei strenger Indikationsstellung gelegentlich bei pT1-Karzinomen mit

einem Durchmesser bis zu 3 cm, guter oder mäßiger Differenzierung, ohne Lymphgefäß-Binvasion (Low-Risk-Histologie) indiziert sein[4, 17].

1.2 Adjuvante Therapie

Grundlage für die Indikation zur adjuvanten Therapie nach Tumorresektion ist die pathohistologische Stadienbestimmung, insbesondere die Bestimmung des pN-Status. Hierzu sollen 12 oder mehr regionäre Lymphknoten durch einen Pathologen untersucht werden (UICC 2002)[14]. Aktuell besteht für UICC-Stadium I keine und für IIA (keine Risikofaktoren) die mögliche Indikation zur adjuvanten Therapie (Evidenz IB). In Stadium IIB mit Risikofaktoren und in Stadium III/IV sollte eine adjuvante Therapie durchgeführt werden (Evidenz II). Risikofaktoren sind Stadium T4, Tumorperforation/-einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering, positive Lymphgefäß-, Gefäß- oder Perineuralscheideninfiltration. Die Identifikation derjenigen Patienten in Stadium II, welche nachhaltig von einer adjuvanten Chemotherapie im Sinne einer reduzierten Rückfallquote profitieren, ist nach wie vor eine große Herausforderung. Hier stellen neue genetische Analysen wie der ColoPrint® in Zusammenschau mit klinischen Parametern eine neue Möglichkeit dar, diese Lücke eventuell zu schließen[18].

Die hier beschriebenen Empfehlungen zur adjuvanten Therapie beziehen sich auf die 2009 überarbeitete S3-Leitlinie[19]. Neu ist ein eher zurückhaltender Einsatz von Oxaliplatin und Irinotecan bei Patienten im Alter von über 70 Jahren[19].

Der Stellenwert der Strahlentherapie des Rektumkarzinoms im oberen Drittel wird kontrovers diskutiert. Es kann eine adjuvante Therapie wie beim Kolonkarzinom oder eine perioperative Radio(Chemo-)Therapie wie beim Rektumkarzinom durchgeführt werden.

1.2.1 Chemotherapie

Voraussetzung für eine adjuvante Therapie ist die R0-Resektion des Primärtumors. Für die adjuvante Chemotherapie des Kolonkarzinoms soll eine Oxaliplatin-haltige Therapie oder ein gleichwertiges Irinotecan-basiertes Regime eingesetzt werden. Im Stadium IIB besteht die Möglichkeit eine adjuvante Chemotherapie mit Fluoropyrimidinen als Monotherapie (z.B. Capecitabin) zu erwägen[4].

1.2.1.1 5-Fluorouracil

5-FU wird entweder als Monotherapie oder in Kombination angewendet und gehört zu den Basis-Chemotherapeutika, da es sowohl im FOLFOX als auch im FOLFIRI – Regime zur Anwendung kommt (s. 1.2.1.2. + 1.2.1.3.). Es kann sowohl in intravenösen Schemata als auch als orales Capecitabin® verabreicht werden. 5-FU ist ein Fluoropyrimidin, ein Analogon der Pyrimidin-Base Uracil. 5-Fluoruracil wirkt als Anti-Metabolit, der aufgrund der Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin (DNS-Nukleotide) bzw. Uracil (RNA-Nukleotid) anstatt dieser in die DNS und RNS eingebaut wird. Dieses

führt zur Synthese fehlerhafter RNS, die so das Wachstum des Tumors hemmt[20]. In der Verstoffwechslung von 5-FU sowie als Zielmoleküle spielen mehrere Enzyme eine wichtige Rolle und tragen wahrscheinlich auch zu einer möglichen Resistenz gegen 5-FU bei. 5-FU hemmt die Thymidilat-Synthase, ein Enzym der Biosynthese, welches notwendig ist für die DNS-Reparatur und ihre Replikation. Die Rolle von TS als Biomarker für eine 5-FU-Resistenz bleibt fragwürdig, aber dennoch nicht abschließend geklärt[21]. Die Umwandlung von Capecitabin zu 5-FU erfolgt durch das Enzym Thymidinphosphorylase, das in besonders hoher Konzentration im Tumorgewebe auftritt und daher bei niedriger Expression mit einem Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU eng verknüpft ist[22-24]. Die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase ist ein Enzym aus der Gruppe der Oxidoreduktasen, das am Abbau von körpereigenen Pyrimidinen wie Uracil und Thymin beteiligt ist. Zusätzlich katalysiert es die Verstoffwechslung von 5-Fluoruracil. Daher könnten niedrige DPD-Aktivitäten mit besserem Ansprechen und stärkeren Nebenwirkungen korrelieren[25-27]. Alle diese Enzyme sind eng mit dem Ansprechen auf eine Therapie mit 5-FU verknüpft und könnten als Biomarker klinisch zukünftig eine Rolle spielen.

1.2.1.2 Oxaliplatin

Oxaliplatin wird in der Erstlinientherapie in Kombination mit 5-FU (intravenös oder oral) verwendet (FOLFOX bzw. FUFOX, CAPOX etc.) und ist der Monotherapie deutlich überlegen. Oxaliplatin gehört zur Klasse der Platinkomplexen, bei denen das Platin Ion mit einem 1,2-Diaminocyclohexyl-Liganden und einem Oxalat Ion komplexiert ist. Oxaliplatin bewirkt, dass im Körper entstehende Stoffwechselprodukte, mit der DNS interagieren und Quervernetzungen in und zwischen den DNS-Strängen bilden. Dadurch hemmt es die Trennung des DNS-Doppelstrangs, was die DNS-Synthese hemmt[28]. Durch den Mechanismus der DNS-Schädigung ist eine Resistenz gegen eine Therapie mit Oxaliplatin am ehesten in einem erhöhten DNS-Reparaturmechanismus zu suchen. Die Effektivität von Oxaliplatin wird hauptsächlich über den Nukleotid-Exzisions-Reparatur-Mechanismus reguliert. Deshalb dienen Gene wie excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1) und xeroderma pigmentosum group D (XPD) als potentielle Biomarker. Den aktuell besten Toxizitätsmarker für Oxaliplatin stellt Glutathion-S-Transferase (GST) dar[27].

1.2.1.3 Irinotecan

Irinotecan wird ebenfalls in der Erstlinientherapie in Kombination mit 5-FU (intravenös oder oral) verwendet, als FOLFIRI-Regime. Bei der Entscheidung ob Oxaliplatin oder Irinotecan-basierte Regime eingesetzt werden, spielt das Nebenwirkungsprofil eine entscheidende Rolle. Bei Vorliegen keiner Kontraindikationen wird mit FOLFOX begonnen. [4]. Irinotecan ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer. Es bewirkt einen „programmierten Zelltod“ (Apoptose), indem es das Enzym DNS-

Topoisomerase I hemmt. Irinotecan und sein aktiver Metabolit SN-38 lagern sich dem Komplex aus DNS-Topoisomerase I und DNS an und verhindern die Reparatur des zuvor erfolgten DNS-Einzelstrangbruchs, was zu einem Abbruch der DNS-Replikation führt[29]. Als Biomarker für ein erhöhtes Toxizitätsprofil hat sich das Enzym Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase 1A etabliert (Zulassung durch die FDA), das für die Glukoronidierung und damit Elimination von Metaboliten (u.a. auch Irinotecan) verantwortlich ist. Genetische Unterschiede in TA-Tandem-Repeats führen zu einer niedrigeren Enzym-Aktivität und damit verbundenen, stärkeren Nebenwirkungen von Irinotecan[30, 31].

1.3 Lebermetastasen

1.3.1 Allgemeines

Lebermetastasen sind die häufigsten hämatogen entstandenen Tumorabsiedelungen des KRK und entstehen wenn der Primärtumor Anschluss an das portal-venöse System bekommt. Zusätzlich spielen noch eine Reihe bisher nicht ausreichend verstandener Faktoren im Mikromilieu der Leber eine Rolle, weswegen sich die malignen Zellen so häufig in der Leber ansiedeln[32]. Ca. 25% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom weisen bei Diagnosestellung Lebermetastasen auf. Über 50% aller KRK-Patienten entwickeln Lebermetastasen im Verlauf[33, 34].

Bei primär irresektablen Lebermetastasen besteht die Möglichkeit, mit einer systemischen Chemotherapie eine Verkleinerung (Downsizing) und so eine sekundäre Resektabilität und potenzielle Heilung zu erreichen[4]. Die Wahl des Chemotherapieregimes hängt dabei entscheidend vom Therapieziel ab. Hierfür sollten Wünsche und Bedürfnisse des Patienten, sowie ggf. umfangreiche palliative Therapiekonzepte mit berücksichtigt und gegeneinander abgewogen werden. Die Ergebnisse der chirurgischen Metastasenresektion variieren in Metaanalysen z.T. erheblich und sind im Schnitt bei etwa 40% der Patienten mit einem 5-Jahresüberleben anzusetzen, bei einer starken Schwankungsbreite von 16%-74%[34, 35]. Eine gute Einschätzung der Prognose bietet der FONG-Score[36]. Hierbei kann mittels klinischer Parameter ein präoperativer Prognosewert erstellt werden. Als prognostisch ungünstige Kriterien haben sich dabei erwiesen:

- 1) nodal positiver Primärtumor
- 2) Krankheitsfreies Intervall < 12 Monate
- 3) Metastasengröße > 5cm
- 4) Anzahl der Metastasen > 1
- 5) CEA präoperativ > 200 ng/dl

Patienten, bei denen ein Wert von bis zu maximal 2 Punkten vorliegt, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit auf Langzeitüberleben nach primärer Leberresektion.

1.3.2 Chemotherapie

Nach R0-Resektion synchroner oder metachroner Lebermetastasen sollte eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Ist das Therapieziel die Remissionsinduktion mit sekundärer Metastasenresektion, dann soll primär die effektivste jeweils verfügbare systemische Kombinationstherapie angewandt werden (intensivierte Therapie)[4].

Für die systemische Chemotherapie des metastasierten KRK stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, welche leitliniengemäß[4] als Erst-/Zeit- oder Drittlinientherapie eingesetzt werden können. Basis-Therapie bilden Oxaliplatin- und Irinotecan-basierte Schemata in Kombination mit 5-FU/Capecitabin. Darüber hinaus stehen monoklonale Antikörper zur Verfügung:

1.3.2.1 Bevacizumab

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline IgG₁. Bevacizumab ist gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gerichtet und hemmt dadurch die für Tumorwachstum wichtige Gefäßneubildung[37].

Die Kombination von 5-FU und Bevacizumab ist vor allem geeignet für Patienten die sich für ein oxaliplatinhaltiges/irinotecanhaltiges Protokoll nicht qualifizieren[38]. Zudem kann Bevacizumab additiv zu FOLFOX oder FOLFIRI gegeben werden.[4] Ein Stratifizierungsmarker für ein Ansprechen auf eine Therapie mit Bevacizumab hat sich bisher jedoch nicht gefunden. Die Verwendung von VEGF-A als Biomarker hat sich nicht bestätigt[39]. Neuere Studien bezweifeln den zusätzlichen Wert von Bevacizumab und empfehlen es nicht in der adjuvanten Therapie bei Patienten mit UICC-Stadium III Tumoren zu verwenden[40]. Dennoch ist der VEGF-Signalweg ein wichtiger Angriffspunkt für die Entwicklung neuer, effektiver Therapeutika[41].

1.3.2.2 Cetuximab/Panitumumab

Cetuximab ist ein therapeutischer, chimärer, monoklonaler Antikörper ebenfalls vom Typ IgG₁ und ist gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) gerichtet (Details s. 1.3.2.2.1.)[42]. Panitumumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline IgG_{2k}. Er bindet an den Rezeptor des Proliferationsfaktors EGF (Epidermal Growth Factor) und hemmt wie Cetuximab über diesen das Tumorwachstum[43]. Cetuximab wird in der Erstlinientherapie des metastasierten KRK additiv zu den Kombinationsschemata FOLFOX, FOLFIRI u.a. verwendet und zeigte bei Wildtyp KRas-Patienten eine deutliche Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit und des progressionsfreien Überlebens[44-46]. Zudem können beide auch als Monotherapie in der Zweit- und Drittlinientherapie angewendet werden[47].

1.3.2.2.1 EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor)

EGF-R gehört wie Her2/neu, Her3 und Her4 der ErbB-Familie der transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptoren an und wird als eine zentrale Rolle spielendes Zielmolekül für Tumorentstehung und -wachstum angesehen. Traditionell wird der EGF-R immunhistochemisch nachgewiesen[48]. Hierbei wird einer Überexpression von EGF-R eine schlechte Prognose, kürzeres Überleben und eine erhöhte Metastasierungsrate beigemessen. Beim KRK ist die Überexpression mit 25%-82% angegeben. Es hat sich gezeigt, dass eine Überexpression mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Metastasierung einhergeht[49], der Einfluss auf das Überleben bleibt jedoch kontrovers diskutiert[50]. EGF-R ist jedoch mit der Zulassung von Antikörpern gegen EGF-R (Cetuximab und Panitumumab) stark in den Fokus gelangt, da Faktoren für ein Ansprechen auf eine Antikörpertherapie gesucht werden. Hier hat sich der EGF-R, nachgewiesen in der IHC, als nicht geeignet erwiesen. In Studien konnte keine Korrelation zwischen einer EGF-R – Expression und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab nachgewiesen werden[51]. Sogar Tumoren mit nicht detektierbarem EGF-R haben auf eine Therapie mit EGF-R-Antikörpern angesprochen[52] und die Ansprechraten für EGF-R-negative Patienten waren gleich der EGF-R-positiver[53]. Dennoch bleiben in der Interaktion und Funktion des EGF-R mit anderen Zielmolekülen und Signalwegen weiterhin viele Zusammenhänge ungeklärt.

1.3.2.2.2 Ras

In menschlichen Zellen gibt es drei Proteine der onkogenen Ras-Familie: H-Ras, N-Ras und K-Ras. Ras-Proteine sind Guanin-Austauscher, also Proteine, die GDP im inaktiven Zustand binden und von SOS-Protein aktiviert, GDP gegen GTP austauschen und so im aktiven Zustand Serin/Threonin-Kinasen wie Raf und MAPPK aktivieren können. Damit können sie die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalkaskade anstoßen[54] (s. Abbildung 1). Zudem haben Ras-Proteine über andere Kinasen wie PI3Kinase, welche sie ebenfalls aktivieren können, Einfluss auf andere Signalwege.

Mutationen im KRas-Onkogen treten bei etwa 35-45% der Patienten auf[55] und führen zu sog. „gain of function“-Mutationen. So haben Mutationen im Exon 2 auf Codon 12, 13, 61, 146 Veränderungen der Tertiärstruktur zur Folge, die dazu führen, dass das Ras-Protein immer im GTP gebundenen, aktiven Zustand vorliegt. Dies bedingt, dass ein permanenter Stimulus auf die Signalkaskade ausgeübt wird und ein dauerhaftes Signal für Zellproliferation, Zellwachstum und letztlich Tumorprogression vorliegt. Diese Mutationen und ihre Detektion sind in den letzten Jahren zunehmend bedeutender geworden, da sie im Hinblick auf eine Therapie mit EGF-R-mAk mit einem Nichtansprechen korrelieren. Dies hat dazu geführt, dass die beiden häufigsten Lokalisationen von „gain of function“-Mutationen, Codon 12 und 13 bei jeder beabsichtigten Therapie mit Cetuximab oder Panitumumab vorab getestet werden müssen. Nur ein Patient mit K-Ras Wildtyp sollte

dann mit EGF-R-mAk therapiert werden, da dadurch das Überleben verlängert und die Rückfallrate verbessert werden kann[45, 56-58]. Zudem gilt eine KRas-Mutation als potentiell die Prognose verschlechternder Faktor[59]. Trotzdem gibt es unter den Patienten mit KRas-Wildtyp noch einen hohen Prozentsatz bei denen ebenfalls kein Ansprechen auf eine Antikörper-Therapie erfolgt. Neueste Datenauswertungen legen zudem nahe, dass sich bestimmte Mutationen in Codon 13 (G13D) analog zum K-Ras Wildtyp verhalten und Patienten dementsprechend mit Cetuximab/Panitumumab behandelt werden könnten[60].

1.3.2.2.3 Raf

Bei den Raf-Proteinen handelt es sich um eine Familie von Proteinkinasen, welche die Isoformen ARaf, BRaf und CRaf umfasst und zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen zählt. Raf-Proteine werden von Ras aktiviert und sind ebenfalls in den Ras/Raf/MAPK-Signalweg eingebunden. Mutationen im Raf-Gen können bei vielen Tumoren nachgewiesen werden[61]. Hierbei sind die häufigsten in B-Raf in Exon 11 und 15 lokalisiert. Es handelt sich ebenfalls um „gain of function“-Mutationen in der Kinase-Domäne, welche zu einer Tertiärstrukturänderung des Proteins führen, wodurch dieses ein viel höheres Aktivitätslevel aufweist und die Signalkaskade weitaus aktiver ist, als in nicht mutiertem Zustand. BRaf-Mutationen treten in 10-20% aller Patienten mit sporadischem KRK auf[59]. Unklar bleibt weiterhin die klinische Relevanz von BRaf-Mutationen. Zunächst wurde für BRaf mutierte Tumoren ebenfalls die Ablehnung einer Therapie mit EGF-R-Ak postuliert[57]. Aktuelle Studien zeigen jedoch lediglich, dass BRaf-Mutationen im Exon 15 starke prognostische Relevanz besitzen und mit einer schlechten Prognose einhergehen[62-64]. Eine Auswirkung auf eine Therapieentscheidung lässt sich daraus allerdings bisher nicht ableiten.

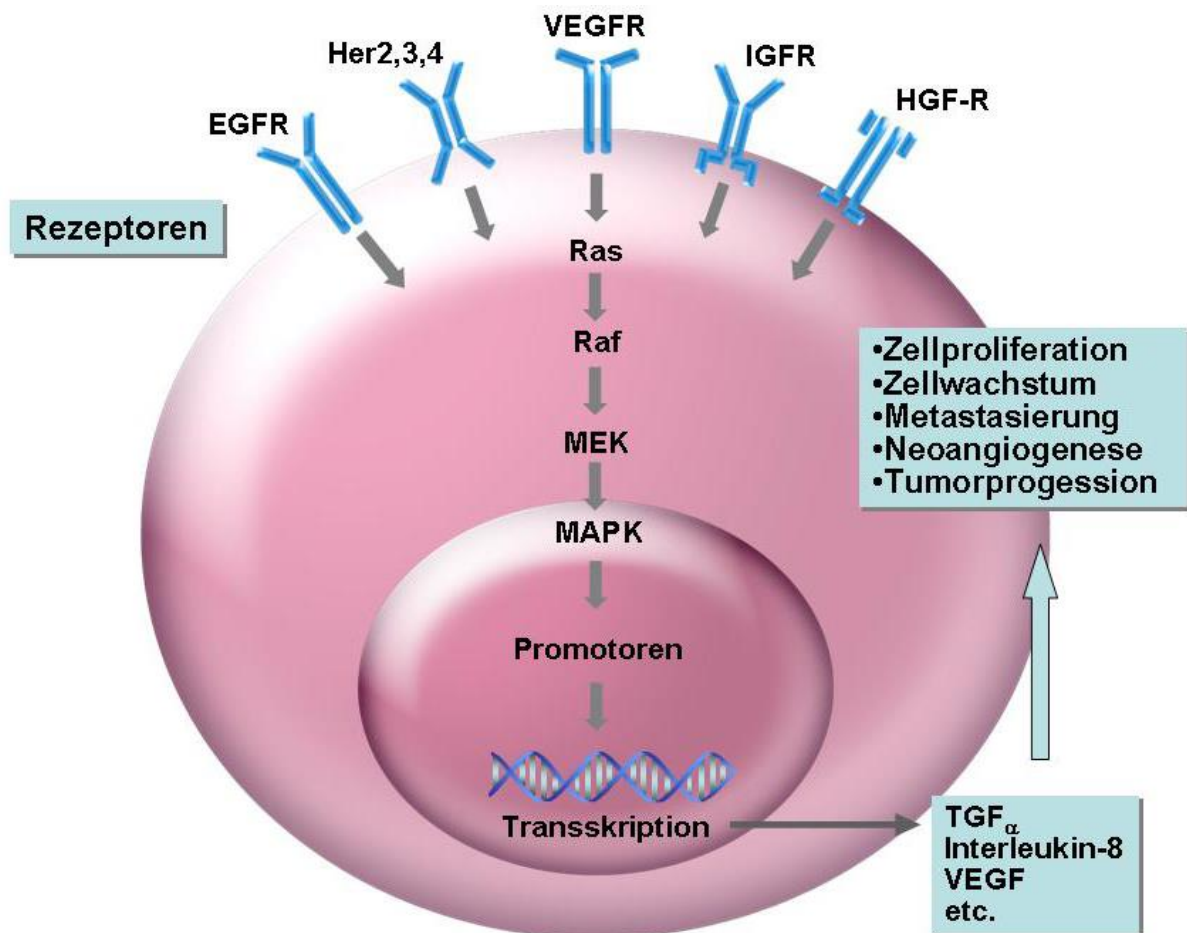


Abb. 1: Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Signalweiterleitung über den RAS/RAF/MAPK-Signalweg, zur Verfügung gestellt durch Fr. Hanisch, chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern

1.3.2.3 Zweit-/Drittlinientherapie

Die Wahl der Zweit- und Drittlinientherapie hängt sowohl von vorangegangenen Therapien und der therapiefreien Zeit als auch von der individuellen Patientensituation und dem jeweiligen Therapieziel ab. Es kommen sowohl Kombinationsschemata, als auch Monotherapien in Frage. Aufgrund unzureichender Evidenz soll mit Ausnahme der Fluoropyrimidine oder der Gabe von Irinotecan in Kombination mit Cetuximab nach Versagen einer irinotecanhaltigen Therapie keines der oben beschriebenen Therapeutika nach dokumentiertem Progress unter Therapie weiter appliziert werden. Dies gilt auch für Cetuximab und Bevacizumab[4]. Im Rahmen von Studien wird derzeit eine Vielzahl von weiteren Therapeutika v.a. beim metastasierten KRK untersucht.

2 Die Rolle von Genen und Wachstumsfaktoren in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms: Die Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz

Die Entstehung maligner Tumoren wird heute mit Hilfe der so genannten Multihit-Hypothese erklärt. Hierbei wird Krebs klassischerweise durch drei Schritte generiert. Eine einzelne genetische Mutation ist dabei aber nicht ausreichend um Krebs zu generieren. Es braucht dafür eine Aneinanderreihung mehrerer Mutationen in sogenannten Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen oder DNS-Reparaturgenen[65]. Protoonkogene sind Gene, welche durch eine somatische Mutation in Onkogene umgewandelt werden. Das Proteinprodukt dieser Gene hat verglichen mit dem normalen Protein gesteigerte Aktivität oder bewirkt den Regulierungsverlust oder eine erhöhte Konzentration. Beispiele für Protoonkogene sind RAS, RAF, WNT und ERK. Tumorsuppressorgene sind Gene, deren Proteine eigentlich protektive Funktionen auf dem Weg zur Tumorentwicklung für die Zelle darstellen. Durch Mutationen werden diese Kontrollmechanismen ausgeschaltet. Beispiele hierfür sind APC, TP53, und DCC.

DNS-Reparaturgene sind an der Reparatur der auftretenden DNS-Defekte beteiligt. Sind diese Funktionen durch genetische Mutationen selbst gestört, können auftretende Schäden nicht mehr repariert werden und eine Häufung von Mutationen ist die Folge, welche, wenn sie in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen auftreten, zur Karzinogenese beitragen[54].

Durch die Aneinanderreihung von sporadischen Mutationen kommt es in normaler Kolonschleimhaut zur Bildung von zunächst noch benignen Dysplasien oder Adenomen, welche sich durch zusätzliche Akquirierung von Mutationen zu einem Karzinom entwickeln. In Abbildung 2 ist die Adenom-Karzinom-Sequenz nach der Theorie von Fearon und Vogelstein[66] unter Einbindung oben genannter und nachfolgender Biomarker erweitert[67], abgebildet.

Diese Karzinome zeichnen verschiedene Fähigkeiten aus:

- 1) anhaltende Wachstumssignale
- 2) ausgeschaltete Wachstumsunterdrückung
- 3) invasives Wachstum und Metastasierung
- 4) Fähigkeit fortwährender Replikation
- 5) Einleitung einer Angiogenese
- 6) Umgehung selbstinduzierter Apoptose

Nur wenn diese Aspekte zusammenkommen, kann ein Karzinom entstehen[68]. Aus diesem Grunde ist es von enormer Wichtigkeit Signalwege und Zellinteraktionen zu kennen, zu verstehen und weiter zu untersuchen und zu entschlüsseln.

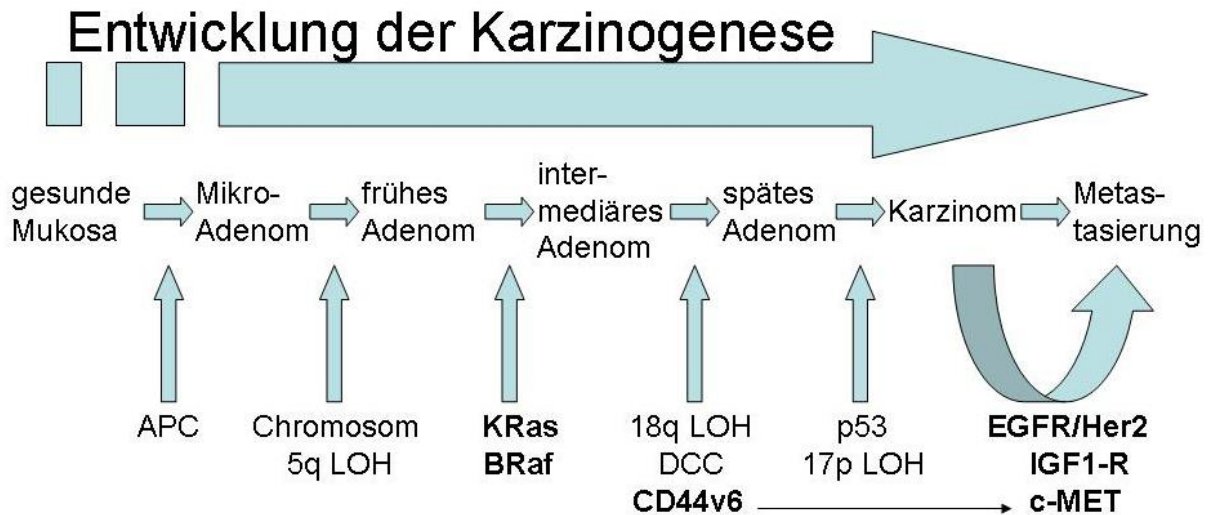


Abb. 2: gezeigt ist die Tumorentwicklung nach Fearon und Vogelstein von der gesunden Schleimhaut über Adenomentwicklung zum Karzinom mit anschließender Metastasierung. In der unteren Zeile sind die jeweiligen Mutationsereignisse gemäß ihrem zeitlichen Auftreten im Ablauf der Karzinogenese dargestellt. Fett die jeweiligen untersuchten Marker

2.1 Tumorbilologische Marker mit möglicher Therapierelevanz

Bei der Suche nach neuen Therapieoptionen beim KKR sind die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormone wichtige Zielstrukturen. Es handelt sich um Proteine mit Transmembrandomäne und intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Durch Dimerisierung der Rezeptoren kommt es zur Autophosphorylierung dieser Rezeptoren, wodurch Nachbarproteine aktiviert werden, welche wiederum eine Signalkaskade anstoßen, an deren Ende die Transkription von Zielgenen steht, deren Proteinprodukte in den Zellzyklus eingreifen, für Zellproliferation, Zellwachstum, Metastasierung, Neoangiogenese und Tumorprogression verantwortlich sind. Aber auch andere tumorbilologisch relevante Eigenschaften wie Zella-dhäsion, Chemotaxis und immunvermittelte Inflammation sind an der Karzinogenese beteiligt. Im Folgenden wird eine Auswahl von Zielstrukturen aus den o.g. Bereichen vorgestellt.

2.1.1 Her2/neu (Human epidermal growth factor receptor 2)

Her2/neu (auch erb-B2, c-erbB2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGF-R). HER2/neu stimuliert die Zellproliferation ebenfalls über den RAS-RAF-MAP-Kinase-Weg und hemmt die Apoptose über den mTOR-Signalweg (s. Abbildung 1 und 37), zu dem es Querverbindungen aufweist. In der Behandlung und Diagnostik des

Mammakarzinoms spielt Her2/neu eine entscheidende Rolle. Bei Überexpression von Her2/neu kann eine Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab erwogen werden[69]. Für die Therapie des metastasierten Her2/neu-positiven Magenkarzinoms ist Trastuzumab seit 2010 zugelassen und wird seitdem erfolgreich dafür eingesetzt[70]. Auch für das kolorektale Karzinom wird ein möglicher Therapieerfolg bei Her2/neu-Überexpression, welche in etwa 10% aller Tumoren auftritt[71], angenommen. Vor allem für diejenigen Her2/neu-positiven Patienten, welche auf eine Therapie mit Cetuximab/Panitumumab nicht ansprechen, könnte Trastuzumab eine Alternative darstellen[72]. Zudem wird gemäß aktueller Untersuchungen ein Einfluss der Her2/neu-Genkopien für ein Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie postuliert[73].

2.1.2 IGF1-R (Insulin-like growth factor1 receptor)

Ein weiterer Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosin-Kinaseaktivität ist der heterotetramere IGF1-Rezeptor. Für gewöhnlich führt die Aktivierung des IGF1-Rezeptors zu Proliferation und Differenzierung in mitosefähigen Zellen oder zu Hypertrophie in Muskelgewebe. Darüber hinaus ist ein starker Effekt während der Schwangerschaft auf das Wachstum der weiblichen Brustdrüse, sowie eine Interaktion mit dem zu 60% identischen Insulin-Rezeptor bekannt. In den meisten malignen Geweben ist er überexprimiert und kann das Zellüberleben steigern[74]. Der Hauptsignalweg über den IGF1-R seine anti-apoptotische Wirkung entfaltet ist über PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und über Akt/PKB (Proteinkinase B) (s. Abbildung 37) gesteuert. Allerdings werden auch alternative Signalwege für den Schutz vor Apoptose aktiviert, so wird u.a. der MAPK-Signalweg (s. Abbildung 37) und Kalziummobilisierung innerhalb der Zelle getriggert. Die Vielfalt der an der Signalübertragung beteiligten Wege könnte erklären warum der Rezeptor so eine starke anti-apoptotische Aktivität aufweist[75, 76]. Klinisch gibt es Hinweise darauf, dass die IGF1-R-Expression, welche in 60-70% der KRK auftritt, mit der Tumorgroße zunimmt[77]. Zudem geht sie mit einer schlechteren Prognose einher[78] und die IGF1-R-Signalwege sind möglicherweise an einer Resistenz gegen eine Cetuximab/Panitumumab-Therapie beteiligt [79].

2.1.3 c-Met (HGFR hepatocyte growth factor receptor)

MET ist ein weiteres Protoonkogen, das als Transmembranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität zur Gruppe der Wachstumsfaktorrezeptoren zählt. Aktives Met aktiviert Tumorstrom, Neoangiogenese und Metastasierung. C-Met ist in vielen Tumorgeweben dysreguliert. Normalerweise kommt es nur in Stammzellen und Progenitorzellen vor, was den Zellen invasives Wachstum erlaubt um im Embryo neues Gewebe zu bilden oder in Erwachsenen geschädigtes Gewebe zu regenerieren. Karzinomzellen machen sich diese Eigenschaft zu Nutze, exprimieren Met und werden so langlebiger und metastasierfreudiger. Met aktiviert Signalwege, die in der Entwicklung von Krebs eine wichtige Rolle spie-

len (siehe Abbildung 37). Neben dem RAS-RAF-MAPK-Signalweg, werden auch PI3Kinase, Wnt-, STAT- und Notch-Signalwege aktiviert[80]. C-Met Überexpression könnte ein möglicher negativer prognostischer Faktor bei metastasiertem KRK sein und eine Rolle bei der Resistenz gegen anti-EGF-R Therapie spielen[81]. In Metastasen ist c-Met im Vergleich zum Primärtumor häufig geringer exprimiert[82]. Zusätzlich trägt in Her2/neu-überexprimierenden Mammakarzinomzellen Met zu einer Resistenz gegen Trastuzumab bei[83]. Darüber hinaus könnte c-Met als Zielmolekül für Tyrosinkinase-Inhibitoren eine therapeutische Relevanz besitzen[84].

2.1.4 CD44v6

CD44 ist ein Glykoprotein an der Zelloberfläche, das an Zell-Zell-Interaktionen, Zelladhäsion und Zellmigration beteiligt ist. Es ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, kann aber auch mit anderen Liganden interagieren. Das Protein ist an Funktionen wie der Lymphozytenaktivierung, der Rezirkulation und dem Homing von Lymphozyten, sowie der Hämatopoese, der Tumormetastasierung und sogar der Chemoresistenz, beteiligt. Gentranskripte von CD44 werden alternativem Splicing unterzogen, weshalb es in vielen funktionell verschiedenen Isoformen auftreten kann. Aus den 9 variablen Exons (v2-v10) können hunderte verschiedene Splice-Varianten entstehen. Diese funktionelle Vielfalt des Proteins mag ein Grund sein, weswegen es mit Tumormetastasierung assoziiert wird[85]. Die meisten Gewebearten epithelialen Ursprungs weisen CD44s (Standard-Form) an ihrer Zellmembran auf. Kolorektale Mukosazellen exprimieren es nur in basalen Abschnitten der Krypten, also in dem Bereich in dem Proliferation stattfindet. In den oberen Bereichen der Krypten, den ausdifferenzierten Mukosazellen findet man keine CD44-Expression. Dies erscheint umso interessanter, wenn man beachtet, dass in malignen Zellen ein anderes Expressionsmuster als in Mukosazellen vorliegt. Zudem wird CD44 von einigen auch als Stammzellmarker angesehen. Beim KRK sind am häufigsten die Exons v3 und v6 im Protein enthalten. CD44v3 kann verschiedene Heparin-bindende Wachstumsfaktoren binden, wie VEGF, HGF, β FGF, Amphiregulin etc. In der Aktivierung von c-Met durch HGF interagiert CD44v6 als essentieller Cofaktor[86], ist Teil einer positiven Feedback-Schleife zur KRas Aktivierung und ist in etwa 60-70% aller KRK exprimiert[87]. Auch in der Aktivierung von VEGF-R agiert CD44v6 als Cofaktor und ist daher stark mit Gefäßneubildung und Metastasierung assoziiert[88]. Diese Isoformen werden in Metastasen deutlich höher exprimiert und hohe Level von v3/v6-Coexpression könnten an der frühen Metastasierungskaskade beteiligt sein[89]. Bereits seit Langem wird ein Zusammenhang von CD44v6-Expression mit erhöhter Tumorprogression und reduzierter Überlebenswahrscheinlichkeit postuliert[90]. Der gegen CD44v6 gerichtete Antikörper AM001 hemmt VEGF/VEGF-R und HGF/c-Met, befindet sich gerade in klinischer Testung und könnte ein vielversprechender Neoangiogenese-/Metastasierungs-Inhibitor sein[91].

2.1.5 Ki67 - Proliferationsindex

Ki67 ist ein nukleäres Protein das vom MKI67-Gen kodiert wird und das mit Zellproliferation in Zusammenhang steht und wohl auch dafür notwendig ist. Darüber hinaus ist es an der Transkription von ribosomaler RNA beteiligt. Das KI67-Protein ist ein Marker für Proliferation und eng damit verbunden[92]. Im klinischen Gebrauch wird der sog. „MIB-1 labelling index“ als Marker für Zellproliferation erstellt [93], welcher die Fraktion der Ki-67 positiven Tumorzellen, die „Wachstumsfraktion des Tumors“, widerspiegelt[94]. Dieser Index korreliert häufig mit dem klinischen Verlauf. Für Mammakarzinome und Prostatakarzinome liegen hierzu die besten Ergebnisse vor und es konnte mehrfach ein prognostischer Wert für Überleben und Progression gezeigt werden[95, 96]. Auch beim KRK ist hierbei ein Zusammenhang mit UICC-Stadium und der Tumorhistologie bekannt. Auch ein Einfluss auf das Überleben wird diskutiert[97].

2.1.6 CD45-Aktivierungsstatus (PTPRC Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type C)

Das Protein CD45 ist ein Enzym, das beim Menschen vom PTPRC-Gen kodiert wird und ursprünglich „leukocyte common antigen“ genannt wurde, da es zunächst auf Leukozyten identifiziert wurde. Es kommt allerdings außer auf Erythrozyten und Plasmazellen auf allen differenzierten Zellen der Hämatopoese vor. Da es ebenfalls bei Tumorzellen des hämatopoetischen Systems (z.B. Lymphome, Leukämie) nachgewiesen werden kann, dient sein immunhistochemischer Nachweis der Differenzierung zwischen Lymphomen und soliden Karzinomen. Darüber hinaus hat es sich als essentiell in der Regulation von T- und B-Zellrezeptor Signalen erwiesen. Dies funktioniert entweder direkt über Interaktion mit dem Antigen-Rezeptor-Komplex oder über die Aktivierung von verschiedenen Kinasen der Src-Familie. Zudem unterdrückt CD45 JAK-Kinasen, wodurch es regulierende Funktion in der Signalgebung von Cytokin-Rezeptoren gewinnt[98]. Eine hohe Anzahl Tumor infiltrierender CD8-positiver T-Lymphozyten, welche gleichzeitig CD45 exprimieren, korreliert mit einem besseren klinischen Resultat für Patienten mit KRK[99].

2.1.7 MHC Klasse II Protein HLA-DR

HLA-DR gehört zu den MHC Klasse II-Proteinen, welche auf dem Human leukocyte Antigen-Komplex codiert werden und die zusammen mit ihrem Liganden wiederum einen Liganden für den T-Zell-Rezeptor darstellen[100]. Darüber hinaus zeigen einige Krankheiten eine häufige Assoziation mit Subtypen des HLA-DR-Oberflächenrezeptors. So ist z.B. für die rheumatoide Arthritis oder die antibiotika-resistente Lyme-Borreliose eine Korrespondenz mit einem höheren Risiko einer Erkrankung verbunden, wenn sie die HLA-DRB1 und HLA-DRB5 Epitope aufweisen[101]. Durch Studien an Lymphozytenpopulationen, die mit kolorektalen Tumoren in Verbindung gebracht werden, konnten auch MHC-Klasse II Re-

zeptoren, die nur von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden, auf Ihre Rolle in der Tumorgenese hin untersucht werden. Um den CD4-positiven T-Zellen Antigene präsentieren zu können, benötigen diese Zellen u.a. auch den HLA-DR-Rezeptorkomplex. Es wird angenommen, dass eine effektive Immunantwort auf kolorektale Tumorzellen davon abhängt, ob Tumorantigene im Lymphknoten oder an der Tumorfront von den Antigen-präsentierenden Zellen internalisiert und den CD-4 positiven T-Helferzellen präsentiert werden können. Daraus resultierend können dann CD8-positive zytotoxische T-Zellen entwickelt werden um die Tumorzellen zu bekämpfen. Denn die Anwesenheit von zytotoxischen T-Zellen ist vergesellschaftet mit einer besseren Prognose der Erkrankung für die Patienten und einer höheren Apoptoserate unter den Tumorzellen[102, 103]. Auch kann für den immunhistochemischen Nachweis von HLA-DR eine bessere Prognose für die Patienten nachgewiesen werden[104]. Diese Ergebnisse sind jedoch diskrepant[105].

2.2 Zielsetzungen

In den letzten Jahren hat die Biomarker-Forschung dank neuer molekularer Methoden eine rasante Entwicklung erlebt. Durch die Entwicklung neuer genetischer Testverfahren und die Erforschung immer neuer Zielmoleküle ist es möglich geworden das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren und Signalwege innerhalb der Zelle besser zu verstehen. Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit immer mehr Biomarker testen zu können und mit der klinischen Anwendung zu verknüpfen. Die Entwicklung immer neuer Therapieansätze und v.a. der Therapie mit Antikörpern und Enzymblockern konnte durch das bessere Verständnis der Prozesse innerhalb von Tumorzellen, deutliche Fortschritte machen. Trotzdem lag die Mortalität des KRK im Jahre 2008 in Deutschland bei 34,1% bei Männern und 30,9% bei den Frauen[3].

- Es ist weiterhin eine weit verbreitete Meinung dass die Entscheidung für eine Therapie sich durch genau einen Biomarker definieren muss. So wie es bei einer Therapie mit Cetuximab/Panitumumab der Fall ist. Hier basiert die Entscheidung für oder gegen eine Therapie mit dem mAk auf der Testung auf Mutationen im KRas-Gen. Dies ist jedoch absehbar nicht haltbar, da sich die KRas-mutierten Patienten in Codon 12 und 13 heterogen verhalten[59]. Zudem ist die Quote derjenigen KRas-Wildtyp Patienten die unter Therapie mit Cetuximab/Panitumumab einen Progress erleiden mit etwa 40-50% deutlich zu hoch[106, 107]. Dazu sollten weitere Marker für eine mögliche Resistenz evaluiert werden.
- Die Wertigkeit einer BRAF-Mutation im Hinblick auf eine Therapie mit mAk gegen EGF-R ist weiterhin nicht gesichert. Aus Korrelationen und Interaktionen mit ande-

ren Signaltransduktionswegen könnten sich mögliche alternative Therapieoptionen ergeben.

- Vor dem Hintergrund, dass für Bevacizumab als Therapeutikum gegen VEGF-R kein Stratifizierungsmarker zur Verfügung steht (VEGF-A gescheitert), sollten mögliche Interaktionen im Bereich der Neoangiogenese und Metastasierung aufgezeigt werden.
- Die Metastasenentwicklung im Verlauf nach R0-Resektion ist nach wie vor prognostisch sehr ungünstig. Es ist daher wünschenswert Metastasierung möglichst frühzeitig zu unterbinden. Hierzu bedarf es Markern, einzeln oder Kombination, die das Metastasierungsrisiko evaluieren. Zudem existieren keine etablierten Biomarker welche den Nutzen oder Nichtnutzen einer adjuvanten Chemotherapie, v.a. von Hochrisikopatienten (UICC Stadium II/III) abbilden.
- Auch für das Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie nach R0-Resektion im M0-Status gibt es kaum Möglichkeiten über Stratifizierungsmarker ein Ansprechen, Versagen oder toxische Nebenwirkungen zu evaluieren.
- Auch aufgrund der Komplexheit der beteiligten Signaltransduktionswege, welche untereinander stark verflochten sind, war das Ziel daher nicht nur ausgesuchte Zielmoleküle zu testen, sondern auch auf mögliche Verbindungen und Verflechtungen in der Zellsignalgebung zu testen und über Zusammenhänge mögliche Ursachen für Resistenzen in der Anwendung von Chemotherapeutika und mAk aufzuzeigen.
- Wir entschlossen uns daher zur Durchführung eines ausgesuchten Multi-Biomarker-Panels, das sowohl molekulare als auch immunhistochemische Zielstrukturen aus dem Bereich der Wachstumsfaktoren, der Proliferation und der Entzündung/Immunmodulation enthält. Darüber könnte sich die Möglichkeit eine individuelle Therapiestrategie zu entwickeln, ergeben. All dies sollte sowohl am Primärtumor als auch an Lebermetastasen erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Cryostat Jung Frigocut 2800 E	Leica Microsystems, Bensheim
BioPhotoMeter	Eppendorf AG, Hamburg
DPU-414 Thermal Printer	Seico Instruments USA Inc.
Mikroliter Zentrifuge	Hettich GmbH, Tuttlingen
Mikro Zentrifuge II für 1,5 ml Tubes	neoLab Migge, Heidelberg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Power supply PowerEase 500	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Elektrophoresekammer 40-1214	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
DNA-Workstation	UniEquip, Planegg
Werkbank Hera safe	Thermo Fischer Scientific, USA
PyroMark Q24 Instrument	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden
Magnetschüttler Monoshake	Roth; Karlsruhe
Heizplatte mit thermostatischer Regelung und Leistungssteller	neoLab Migge, Heidelberg
pH-Meter – WTW pH530	WTW, Weilheim i.OB
PatchMan NP2	Eppendorf AG; Hamburg
Schüttler Infors HAT TR-125	Infors AG, Bottmingen
Vortexer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Gel-Pro Imager (System)	Weiss, Günding/ Bergkirchen
1. Dual Light Transilluminator	Weiss, Günding/Bergkirchen

2. Ethidium Bromide Filter

Roper Scientific, USA

Mikroskope

Olympus BX 40

Olympus Microscopy, Hamburg

Zeiss Mikroskop HB 50 J-AC

Carl Zeiss, Jena

Zeiss Axiovert 40 CFL

Carl Zeiss, Jena

Axio-Cam MRc5

Carl Zeiss, Jena

Pipetten

Eppendorf research 0,5 – 10 µl

Eppendorf AG; Hamburg

Eppendorf research 2 – 20 µl

Eppendorf AG; Hamburg

Eppendorf research 20 – 200 µl

Eppendorf AG; Hamburg

Eppendorf research 100 - 1000 µl

Eppendorf AG; Hamburg

3.1.2 Chemikalien und Material

3.1.2.1 Allgemein

Verbrauchsmaterialien

Tipone Filtertips/DNase-, RNase frei, 0.5-10 µl , steril

Star Lab GmbH, Hamburg

Tipone Filtertips/DNase-, RNase frei, 101-1000 µl , steril

Star Lab GmbH, Hamburg

Tipone Filtertips/DNase-, RNase frei, 1-100 µl , steril

Star Lab GmbH, Hamburg

Tipone Filtertips/DNase-, RNase frei, 1-20 µl , steril

Star Lab GmbH, Hamburg

Tipone Filtertips/DNase-, RNase frei, 1-200 µl , steril

Star Lab GmbH, Hamburg

0,2 ml PCR Gefäße, farblos, 1000 St.

Eppendorf AG; Hamburg

Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5 ml

Eppendorf AG; Hamburg

Reaktionsgefäße Safe Lock 1,5 ml

Eppendorf AG; Hamburg

Reaktionsgefäße Safe Lock 2 ml

Eppendorf AG, Hamburg

8-Well real time PCR-Gefäße, klar mit Einzeldeckel

B. Braun AG, Melsungen

Anfertigung von Gefrierschnitten

C-Messer für Gefriermikrotom	Leica Microsystems, Bensheim
Schnittstreckerplatte aus Glas 50mm	Leica Microsystems, Bensheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Schubert & Weiß GmbH, München
Korkplättchen 20mm	Slee medical GmbH, Mainz
Objektträgerbox	Milian SA, Genf, Schweiz
Mayer's Hämalaun	Merck, Darmstadt
OCT Einfriermedium 125ml	VWR International GmbH, Darmstadt

HE-Färbung

Eindeckgläser 32 x 50mm Menzel	Menzel-Gläser, Braunschweig
Glaskasten 105x85x70	Roth, Karlsruhe
Färbegestell 85x60x45	Roth, Karlsruhe
Drahtbügel	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter 270mm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Mayer's Hämalaun	Merck, Darmstadt
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Eosin Y disodium salt	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%, 80%, 70% vergällt mit MEK	Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol Absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt

Nilblau-Färbung

Aceton Emprove® exp	Merck, Darmstadt
Nile Blue A	Sigma Aldrich, Deisenhofen
100% Essigsäure zur Analyse	AppliChem, Gatersleben

3.1.2.2 Molekularbiologie

Mikrodissektion:

ATL Puffer aus QiaAmp DNA Mikrokit	Qiagen GmbH, Hilden
Eppendorf Tubes 1,5 ml, autoklaviert	Eppendorf AG, Hamburg
Skalpell Nummer 11	Feather Safety Razor Co., Japan

DNS-Isolation aus Zellpellets

peqGOLD TriFast™	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ethanol 75% und 100%	Apotheke Klinikum Großhadern
Natriumcitrat 0,1M in 10% Ethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid 8mM	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
0,1M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) siehe Lösungen	

PhotoMetrische DNA-Bestimmung

UVette 220-1600nm	Eppendorf AG, Hamburg
-------------------	-----------------------

DNA-Isolation aus mikrodiseziertem Gewebe

Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
QiAmp DNA Mikro Kit bestehend aus:	Qiagen GmbH, Hilden

QIAamp MinElute™ Columns	50x
Reaktionsgefäße (2 ml)	200x
Puffer ATL	50 ml
Puffer AL*	33 ml
Puffer AW1* (Konzentrat)	19 ml
Puffer AW2** (Konzentrat)	13 ml
Puffer AE	12 ml
Carrier RNA	310 µg
Proteinase K	1.25 ml
Handbuch	1x

Tab. 1: Zusammensetzung des DNA Mikro Kits; *) Enthält ein Guanidin - Salz. Nicht kompatibel mit Bleichmittel enthaltenden Desinfektionsmitteln. **) Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Herstellung Orange G Lade-Puffer

0,1% Orange G (M = 452,37 g/mol)	Roth, Karlsruhe
50% Saccharose, DNase/RNase frei	Roth, Karlsruhe
50x TAE-Puffer	Eppendorf AG, Hamburg

Polymerase Kettenreaktion:

Wasser für Molekularbiologie, DEPC-behandelt	Roth, Karlsruhe
HotStarTaqDNS Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
Primer (siehe Lösungen)	Metabion International AG, Martinsried
10x PCR-Puffer incl. 15mM Mg ²⁺	Qiagen GmbH, Hilden
Roti-Mix PCR1 (dNTPs 2mM)	Roth, Karlsruhe
Humane männliche DNS (100ng/μl)	Promega, Madison, Wisconsin, USA

Gelelektrophorese:

250ml Flasche	Duran Group GmbH, Mainz
Ethidiumbromid Lösung. 10mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PeqGold Universal Agarose	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
50 x TAE -Puffer	Eppendorf AG, Hamburg
H ₂ O destilliert	Eppendorf AG, Hamburg
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
GeneRuler ultra low range DNA ladder 10-300Bp	Fermentas, St.-Leon-Rot
Kämme 20 well, 1,5mm	PeqLab Biotechnologie, Erlangen

Pyrosequenzierung:

PyroMark Gold Q24 Reagents bestehend aus: Qiagen GmbH, Hilden

Enzyme Mixture*	1 Flakon
Substrate Mixture**	1 Flakon
dATPaS	1180 µl
dGTP	1180 µl
dCTP	1180 µl
dTTP	1180 µl
Handbuch	1x

Tab. 2: Übersicht der für die Pyrosequenzierung benötigten Substanzen; *) Enthält Dithiothreitol, DNS-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferin, Apyrase, SSB; **) Enthält Dithiothreitol, Tris(hydroxyMethyl)aminoMethan, Adenosin-5'-Phosphosulfat

Sequenzierungsprimer, siehe 3.2.8.3	Metabion International AG, Martinsried
PyroMark Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Wash Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden
Streptavidin-coated Sepharose™ beads	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
70% Ethanol	Apotheke Klinikum Großhadern
PyroMark Q24 Plate	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Q24 Plate Holder	Qiagen GmbH, Hilden
24 Well Platte ohne Deckel	B. Braun AG, Melsungen
USB-Stick 4GB	Verbatim GmbH, Eschborn

3.1.3 Software

Gelelektrophorese:

Gel Pro Analyzer v4.0

Media Cybernatics, L.P., USA

Datenbank:

FileMaker Pro 9.0v3

FileMaker, Inc., Santa Clara, USA

Statistische Auswertung:

PASW Statistics 20

SPSS Inc.

Microsoft Windows XP home Edition

Microsoft

Microsoft Office 2003

Microsoft

Acrobat Writer

Adobe

Adobe Photoshop 4.0

Adobe

Endnote X4

Thomson

Firefox

Mozilla

PyroMark Q24 Software 2.0

Biotage

PyroMark PSQ Assay Design

Biotage

3.1.4 Zelllinien

Tumorzelllinien	Ursprung	Bezug
SW480 Wt*	KRK	LGC Standards, London, UK
SW480 Oxaliplatin resistent	KRK	Interdisz. Labor, Frankfurt*
SW480 Irinotecan resistent	KRK	Interdisz. Labor, Frankfurt*
RKO Wt*	KRK	LGC Standards, London, UK
RKO Oxaliplatin resistent	KRK	Interdisz. Labor, Frankfurt*
RKO Irinotecan resistent	KRK	Interdisz. Labor, Frankfurt*
HT-29	KRK	LGC Standards, London, UK
DLD-1	KRK	LGC Standards, London, UK
HCT116	KRK	LGC Standards, London, UK
GEO	KRK	LGC Standards, London, UK
SKRC-29	Nieren-CA	LGC Standards, London, UK
TCC SUP (Blasen-CA)	Blasen-CA	LGC Standards, London, UK
RT-112 (Blasen-CA)	Blasen-CA	LGC Standards, London, UK
OVCAR-3 (Ovarial-CA)	Ovarial-CA	LGC Standards, London, UK

Tab. 3: Verwendete Tumorzelllinien und ihre Herkunft; *) mit freundlicher Unterstützung Hr. Dr. Michaelis, interdisziplinäres Labor, Frankfurt

3.1.5 Patientenproben

In unserer Studie haben wir retrospektiv ein Patientenkollektiv von n=167 im Zeitraum von November 2003 bis Dezember 2011 konsekutiv analysiert. Bei den Patienten wurde entweder eine alleinige operative Entfernung eines kolorektalen Primärtumors (n=131) und einer synchronen Lebermetastase (n=10) oder eine metachrone Lebermetastasenentfernung (n=54) durchgeführt. Für die Erreichung einer ausreichend hohen Anzahl an Primärtumoren wurden zu den im Klinikum Großhadern gesammelten Patienten zusätzliche Zentren in die Studie mit aufgenommen (s. Tabelle 4). Hierbei wurden Tumorproben aus dem Städtischen Klinikum Neuperlach, München, aus dem Klinikum Kaufbeuren, aus dem Klinikum Landshut und dem Klinikum rechts der Isar, München entgegengenommen und der Aufarbeitung zugeführt.

Zentrum
1. Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München
2. Städt. Klinikum Neuperlach, München
3. Klinikum Kaufbeuren
4. Klinikum Landshut
5. Klinikum rechts der Isar, Technische Universität, München

Tab. 4: beteiligte Kliniken zur Rekrutierung der Patientenproben

Die Tumorproben wurden konsekutiv gesammelt und gemäß standardisierter Ablaufverfahren für die Asservierung sowie für Ischämiezeiten aufbereitet. Die Proben wurden im Operationssaal in Empfang genommen und auf direktem Wege auf Eis gelagert in die Pathologie gebracht. Dort wurden die Proben umgehend bearbeitet. Anschließend wurden die Proben weiter verarbeitet und in N₂ schockgefrostet. Von der Entnahme bis zur Lagerung in Stickstoff verging so meist weniger als eine Stunde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich das Gewebe in einwandfreiem und durch Ischämie- und Lagerzeiten in nicht affektiertem Zustand befand[108].

Insgesamt wurden n=195 unselektionierte Patientenproben untersucht, davon n=131 Primärtumoren und n= 64 Lebermetastasen. Für den Einschluss in unsere Studie wurden folgende Ausschlusskriterien wie folgt definiert:

1. Tod innerhalb von 30 Tagen nach Operation (n=4)
2. Hereditärer Tumor wie HNPCC, FAP (n=1)
3. maligner Zweittumor < 5 Jahre vor Auftreten des kolorektalen Primärtumors (n=16)
4. Rektumkarzinom < 10 cm ab ano (n=7)

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien blieben noch n= 167 Patienten mit n=108 Primaria und n=59 Lebermetastasen für die statistische Auswertung in unserem Kollektiv erhalten. Die mediane Überlebenszeit im Beobachtungszeitraum betrug für die Patienten mit Primärtumoren 29,7 Monate (2,2 – 68,7 Monate) und die Patienten mit Lebermetastasen 28,8 Monate (2,7 – 87,4 Monate). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Nachsorgezeit bei einem Großteil der Patienten bei Auswertung noch keine 60 Monate betrug (Einschluss bis Dezember 2011).

3.2 Methoden

3.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Der Cryostat wurde zunächst auf die entsprechende Temperatur bei ca. -23°C eingestellt, Messer und Streckerplättchen in die entsprechenden Vorrichtungen eingespannt und mindestens 30 Minuten vorgekühlt.

Die zu schneidenden Proben wurden mittels Transportgefäß mit Stickstoff zügig vom Gefrierschrank (-80°C) in den Cryostat überführt.

Dann wurde auf Korkplättchen im Cryostat etwas OCT aufgetropft und das zu schneidende Gewebestück mit einer kalten Pinzette auf Korkplättchen mit OCT in Position gebracht. Das Korkplättchen (mit Gewebe und OCT) wurde nun mit einer Pinzette in Stickstoffdampf gehalten bis der OCT ausgehärtet war (Farbumschlag des OCT nach weiß). Anschließend wurde das Korkplättchen auf dem Objektisch mit einem Wassertropfen befestigt.

Der Objektisch wurde nun in den Objekthalter eingespannt, der Messerwinkel auf 5° und die Schnittdicke auf $5\mu\text{m}$ eingestellt. Nachdem der Objekthalter positioniert, sowie Messer und Streckerplättchen aufeinander abgestimmt waren, konnte das Gewebe gemäß Gebrauchsanweisung gleichmäßig geschnitten werden.

Die Gewebeschnitte sind anschließend auf einen Objektträger aufgebracht worden, dazu wurde der Objektträger leicht auf den Schnitt gedrückt, bis er auf dem zimmertemperaturwarmen Objektträger haften blieb.

Vor Beginn der endgültigen Schnittreihenfolge wurde zunächst ein Schnitt 30 Sekunden in Mayer's Hämalaun gefärbt und unter fließendem Leitungswasser abgespült. Anschließend erfolgt eine Schnittkontrolle unter dem Mikroskop. Nur bei ausreichendem Ergebnis wurde mit der Anfertigung von Serienschnitten fortgesetzt. Ein zufrieden stellendes Ergebnis lag vor, wenn ausreichend Tumorareale bzw. bei Mukosaschnitten möglichst viele Krypten im Längsschnitt abgebildet waren. Pro Gewebe für Tumor und Metastase waren je zwei Objektträger vorzubereiten und zu beschriften, für Mukosaschnitte wurde nur ein Objektträger benötigt.

Anschließend wurden in alternierenden Serienschnitten die beiden Objektträger abwechselnd mit Gewebe bestückt, bis sich eine Anzahl von mindestens vier Schnitten auf jedem Objektträger befindet. Für Mukosaschnitte gilt diese Anordnung nicht, da hier nur auf einen Objektträger möglichst viele Gewebeschnitte aufgetragen werden. Dies ist möglich, da für Mukosaschnitte keine HE-Färbung erstellt wurde.

Der Objektträger für die HE-Färbung wurde an der Luft getrocknet und anschließend mit HE-gefärbt. Der für die Mikrodissektion nativ belassene Objektträger konnte nun direkt

mittels Mikrodissektion weiter bearbeitet oder in 70% - Ethanol zur späteren Bearbeitung, zwischengelagert werden.

3.2.2 Hämalaun – Eosin – Färbung

Zunächst waren neun Glaskästen bereit zu stellen und mit Mayer's Hämalaun, mit Leitungswasser(zweimal), destilliertem Wasser, 80%igem Ethanol, 96%igem Ethanol, Ethanol absolut, Eosin – 2%-Lösung und Xylol zu befüllen.

Dann wurden die zu färbenden Objektträger in einem Färbegestell aufgereiht und in Leitungswasser gespült.

Mit Mayer's Hämalaun wurde das Gewebe zunächst 30 Sekunden angefärbt und anschließend mindestens 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Sollte eine Überfärbung der Schnitte vorgelegen haben, erfolgte eine Differenzierung mit 1%HCL – 70% Ethanol - Lösung um das Bläuen unter Mikroskopkontrolle zu stoppen. Anschließend erfolgte eine 10 Sekunden lange Spülung in Leitungswasser und eine 90 Sekunden lange Färbung in Eosin – 2% - Lösung.

Dann konnte mit der Alkoholreihe begonnen werden. Zunächst wurde in 80% Ethanol kurz gespült. Der Vorgang wurde mit 96%igem Ethanol und Ethanol absolut wiederholt. Zur vollständigen Entwässerung sind die Schnitte zweimal je fünf Minuten in Xylol getaucht worden. Zum Fertigstellen der Präparate mussten 1-2 Tropfen Glyceringelatine auf den Objektträger gegeben und um Luftblasenbildung zu vermeiden das Eindeckglas schräg auf den Objektträger abgesenkt werden.

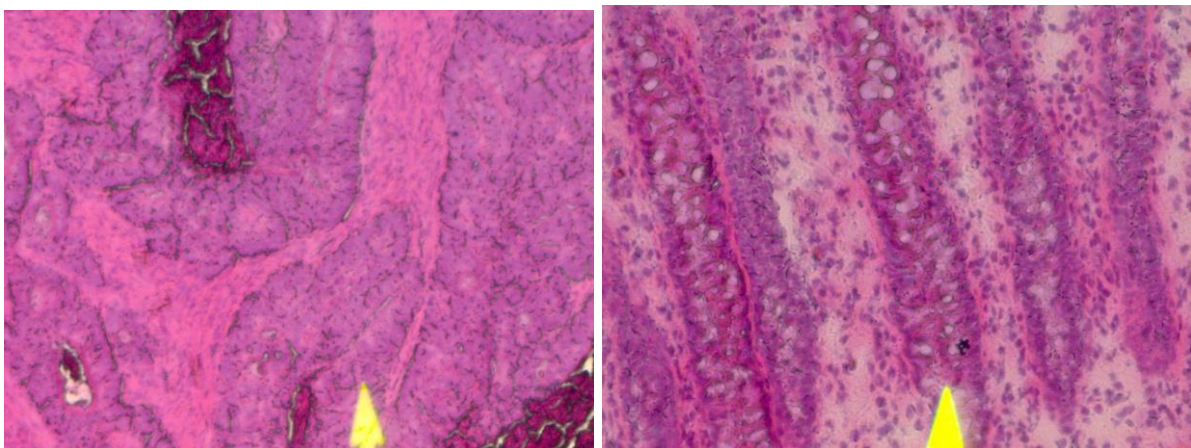


Abb. 3: HE-Färbung eines Tumorareals (Patient #3729) mit zentralen Nekrosen (intensiv rote Areale), 100-fach vergrößert; Pfeil: Tumorareal

Abb. 4: HE-Färbung Mukosa mit Krypten(Patient #3729), 200-fach vergrößert; Pfeil: einzelne Krypte

3.2.3 Nilblau-Färbung

Die Nilblau-Färbung wurde durchgeführt um auf den 5µm dicken Gefrierschnitten einzelne Zellen und deren Kerne besser differenzieren zu können, als dies in der gewöhnlichen HE-Färbung der Fall ist, da Nilblau sowohl Nukleinsäuren, als auch die Zellmembran aufgrund seiner Fettsäure-Affinität anfärbt[109, 110]. Zunächst wurden 100mg Nilblau A abgewogen und in 200ml Aceton gelöst[111]. Dazu ist eine 10-minütige Durchmischung durch den Schüttler erfolgt und anschließend wurde die Lösung in eine Glasküvette zur Färbung gegeben. Die Gefrierschnitte wurden dazu nach dem Schneiden für mindestens fünf Minuten in Aceton fixiert und anschließend für 20 Minuten in die Nilblau A/Aceton Lösung getaucht.[112]

In einer zweiten Glasküvette wurde eine 1%ige Essigsäure-Lösung erstellt. Dazu wurden 2 ml Eisessig in 200 ml destilliertes Wasser gegeben und die Gefrierschnitte für weitere 20 Minuten in die Essigsäurelösung gestellt. Die Betrachtung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop unter UV-Licht Anregung (FITC). Die Absorption λ_{\max} liegt in Aceton bei 499 nm, die Emission λ_{\max} bei 596 nm.

Anschließend wurden je 10 Tumor und Mukosaproben auf diese Weise gefärbt und die Zellzahl in einem definierten Tumorareal bzw. pro Mukosakrypten ausgezählt. Hiervon

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

wurde gemäß der Formel

das arithmetische Mittel abgebildet[113]. So konnte auf die durchschnittliche Zellzahl und damit die Zahl der DNS-Kopien, unter Berücksichtigung der Schnittdicke von 5µm, ein Rückschluss gezogen werden.

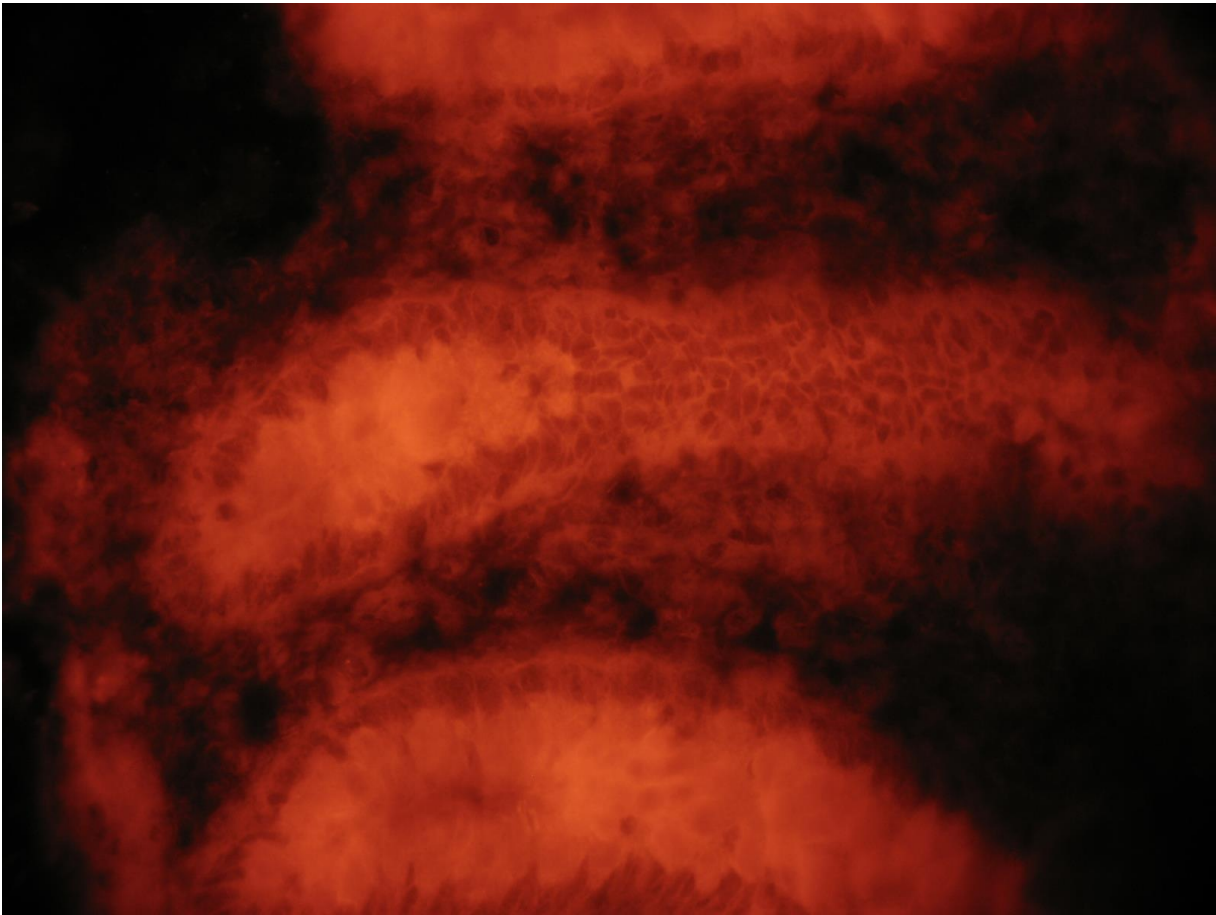


Abb. 5: Nilblau-Färbung einer Mukosa-Krypte (Patient #4175); 200-fach vergrößert unter UV-Anregung

3.2.4 Mikrodissektion

Etablierung

Um für das jeweilige Gewebe (Tumor/Lebermetastase, Mukosa) eine ausreichende Menge an DNS zur Verfügung zu haben, wurde die Menge der DNS über die Fläche der Mikrodissektion bestimmt. Dies wurde nötig, da die durch die DNS-Isolation erhaltene DNS-Konzentration pro Volumen photometrisch nicht quantifiziert werden konnte. Hierzu wurde ein Gitternetzokular für das Zeiss Axiovert 40 CFL verwendet und bei 200-facher Vergrößerung die korrespondierende Fläche für 1, 4, 8, 16, 32, 64 Gitternetzflächen an Tumorareal einer Patientenprobe (#4028) mikrodisseziert, anschließend DNS isoliert (20µl Gesamtvolumen) und hiervon jeweils 2µl in einem PCR – Ansatz (siehe unten) verwendet. Für die Mukosaproben erfolgte ein ähnlicher Ansatz. Hierzu wurden allerdings nicht Flächenareale, sondern die Anzahl der Krypten (1, 2, 3, 5, 10 Krypten) als Korrespondenz gewählt. Die anschließende Gelelektrophorese ergab für die Proben 32 Gitternetzflächen, was einer Fläche von 2 mm² bei Tumorproben entspricht, und 5 Krypten für Mukosaproben lieferten das quantitativ und qualitativ beste Ergebnis. Daraus abgeleitet erfolgte eine zukünftige Mikrodissektion von Patientenproben unter diesen Bedingungen.

Vorbereitungen

Zunächst wurden je Gewebetyp 1,5ml Reaktionsgefäße beschriftet und mit jeweils 15µl Buffer ATL (aus QiaAmp DNA Micro Kit) befüllt, die mit Gefrierschnitten bedeckten Objektträger aus 70% Ethanol entnommen und 2-3 min luftgetrocknet.

Durchführung

Unter dem Mikroskop wurden im Phasenkontrast relevante Bereiche (ausreichend Tumoreale bzw. bei Mukosaschnitten möglichst viele Krypten im Längsschnitt) des Gewebeschnittes identifiziert, dazu erfolgte ein Vergleich mit der zuvor angefertigten HE-Färbung. Eine spitze Skalpell (Feather® No. 11) wurde in PatchMan® eingespannt, mit Isopropanol desinfiziert (nur Nadel) und mittels Joystick unter Sicht an den gewünschten Ort des zu dissezierenden Bereiches gefahren. Das Skalpell wurde auf dem OT aufgesetzt und die Zellen möglichst präzise (Trennung von Tumor, Bindegewebe, Mukosa) zu Zellhaufen aufgeschoben und diese anschließend mit dem Skalpell aufgesammelt, ggf. nach vorheriger elektrostatischer Aufladung (Desinfektion der Nadel unter Reiben an einem mit Isopropanol getränkten Stofftuch).

Zur Überführung der Zellen in die Reaktionsgefäße musste zunächst der Schwenkarm des PatchMan® vorsichtig zur Seite geklappt werden.

Das Skalpell wurde nun mit den an der Spitze haftenden Zellhaufen unter Sicht in die vorbereiteten Reaktionsgefäße ausgestrichen, und ca. 15 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit in der Mikro Zentrifuge unter Raumtemperatur zentrifugiert.

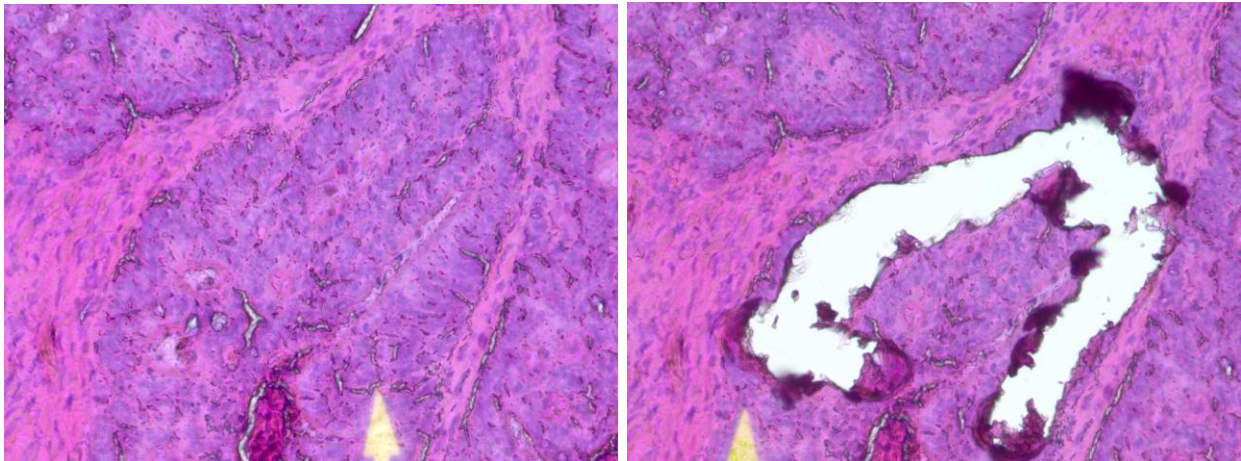


Abb. 6: Tumoreal vor Mikrodissektion (Patient #3729), 200-fach vergrößert; Pfeil: Tumoreal; HE

Abb. 7: Tumoreal nach Mikrodissektion (Patient #3729), 200-fach vergrößert; Pfeil: einzelne Krypte; HE

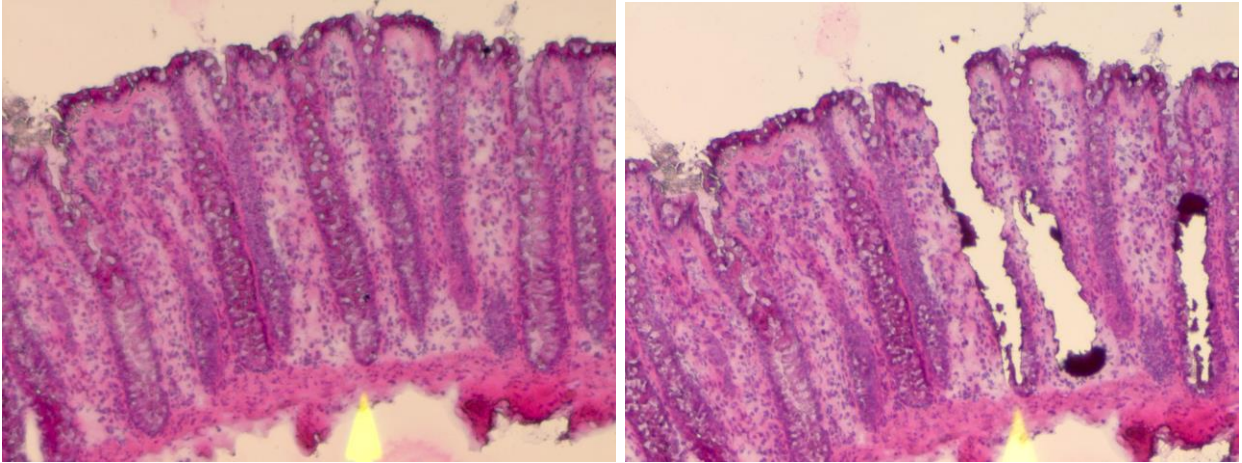


Abb. 8: Mukosakrypten vor Mikrodissektion (Patient #3729), 100-fach vergrößert; HE

Abb. 9: Mukosakrypten nach Mikrodissektion (Patient #3729), 100-fach vergrößert; HE

3.2.5 DNS-Isolation aus Zellpellets

Um für die PCR geeignete Positivkontrollen zu gewinnen, mussten zunächst sich in Kultur befindliche Tumorzelllinien (siehe Tabelle 1) zu Zellhaufen (Pellets) abzentrifugiert und anschließend ihre DNS isoliert werden.

Phasentrennung

Zu dem Zellpellet wurde zuerst 1ml TriFast (enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, für 15 Sekunden geschwenkt und erneut für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Probe bei $<12.000 \times g$ für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere farblose Phase, vorwiegend aus RNS bestehend wurde entfernt.

DNS-Präzipitation

Zunächst wurden 0.3 ml 100 % Ethanol zur Probe hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde der Ansatz gut gemischt. Im nächsten Schritt wurde wieder für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei $2.000 \times g$ für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Waschen der DNS

Der Überstand bestehend aus Ethanol/Phenolphase wurde entfernt, das DNS-Pellet zweimal mit 1ml 0.1M Natriumcitrat in 10% Ethanol gewaschen und je Waschschrift für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend für 5 Minuten bei $2.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die DNS wurde in 1 ml 75 % Ethanol überführt und für 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Hierbei empfahl es sich die Lösung wiederholt zu schütteln und dann erneut für 5 Minuten bei 2.000 x g und 4°C zu zentrifugieren. Der Überstand wurde anschließend verworfen.

Lösen der DNS

Das DNS-Pellet wurde für ca. 10 Minuten getrocknet und durch wiederholtes vorsichtiges Aufziehen mit einer Pipette in 500µl 8mM NaOH gelöst. Nach dem Lösen der DNS musste der pH-Wert mit 50µl 0.1M HEPES auf pH = 8.0 eingestellt werden[114].

3.2.6 Photometrische DNS-Analyse

Die Bestimmung der Konzentration von DNS erfolgte durch Analyse einer Lösung aus 10 mM Tris-HCl-Puffer (995 µl) und 5µl der zu analysierenden Probe. Diese Lösung wurde nun jeweils in eine UVette pipettiert und anschließend wurden im BioPhotoMeter, einem Zweistrahlenspektrophotometer, die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Messung erfolgte jeweils zweimal und anschließend wurde ein Mittelwert aus beiden Messergebnissen gebildet[115]. Am Anfang und Ende der Bestimmung erfolgte jeweils die Messung einer Leerprobe zur Qualitätskontrolle. Nach folgender Formel wurde die Konzentration der Lösung berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = E_{260} \times V \times f$$

V= Verdünnungsfaktor

f= Faktor für DNS: 50 µg/ml

Aussagen über die Reinheit der Lösung erhielt man durch Einsetzen der Extinktionswerte in die Gleichung:

$$\text{Reinheit} = E_{260} / E_{280}$$

Abschließend konnten mithilfe der Konzentration die DNS der Tumorzelllinien zunächst auf 100ng/ml verdünnt werden und anschließend wurden Aliquots von 20ng/ml hergestellt.

3.2.7 DNS-Isolation aus mikrodissiziertem Gewebe

Vorbereitungen

Hierzu wurden alle dafür benötigten Puffer (AL- + ATL-Puffer, AW1- + AW2-Puffer) bei Raumtemperatur gelagert. Sollten die Puffer AL oder ATL Ausfällungen enthalten, dann wurden diese durch vorsichtiges Erhitzen auf 70°C (im Wasserbad) gelöst.

Zu Puffer AW1 und AW2 mussten vor Inbetriebnahme 25ml (AW1-Puffer) bzw. 30ml (AW2-Puffer) Ethanol absolut zur Analyse hinzugefügt werden.

Es wurden ausschließlich mit Filter versehene, DNase- & RNase-freie Pipettenspitzen benutzt.

Pro Patient mussten sechs 2ml-Reaktionsgefäße (drei pro Probe) in Ständern bereitgestellt, sowie zwei beschriftete PCR-only, autoklavierte 1,5ml-Eppendorf Reaktionsgefäße vorbereitet werden. Zudem wurden pro Patient zwei bei 4°C gelagerte „QIAmp MinElute Columns“ benötigt.

Durchführung

Zur mikrodisszezierten Gewebeprobe im 1,5-ml Reaktionsgefäß wurden 15 µl ATL-Puffer und 10 µl Proteinkinase K hinzugefügt und anschließend für 15 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt.

Jetzt wurde das 1,5-ml Reaktionsgefäß in den Thermomixer gestellt und bei 56°C für 3 Stunden im Intervall-Mix (450 UpM für 10 Sekunden alle 5 Minuten) inkubiert. Hierzu wurde der Aufsatz für 1,5-ml Reaktionsgefäße benutzt. Dann wurden 25 µl ATL-Puffer und 50 µl AL-Puffer hinzu gegeben und für 15 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt. Anschließend wurde kurz mit der Handzentrifuge abzentrifugiert.

In diesem Stadium war eine Unterbrechung der DNS-Isolation möglich. Die Probe konnte dazu im -20°C-Kühlschrank gelagert und wenn nötig mit der Isolation zu einem späteren Zeitpunkt fortgefahren werden.

Bei Fortsetzung der DNS-Isolation wurden 50 µl Ethanol absolut zur Probe hinzugefügt, für 15 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem kurzen Schritt Zentrifugieren mit der Handzentrifuge, wurde das gesamte Lysat in eine Säule „QIAmp® MinElute Column“ übertragen ohne dabei den Rand zu befeuchten und bei 8.000 UpM für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein sauberes 2ml-Reaktionsgefäß gestellt, 500µl AW1 Puffer hinzugefügt und bei 8.000 UpM für eine Minute zentrifugiert. Derselbe Schritt erfolgte mit AW2 Puffer. Dann wurde die Säule noch einmal in ein sauberes 2ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 11.000 UpM für sechs Minuten zentrifugiert.

Die Säule wurde anschließend vorsichtig in ein autoklaviertes PCR-only 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und 30µl AE-Puffer in die Mitte der Membran pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde nochmals für zwei Minuten bei 11.000 UpM zentrifugiert, wodurch die vollständig isolierte DNS nun in das 1,5ml Reaktionsgefäß gelangte[116].

Es konnte nun entweder sofort mit der PCR fortgefahren oder die DNS im -20°C-Kühlschrank zur späteren Analyse gelagert werden.

3.2.8 Herstellung von Lösungen

3.2.8.1 TAE – Puffer

1x TAE-Puffer wurde in einem 5 Liter Kanister aus 100ml 50x TAE-Puffer (Eppendorf, Deutschland) und 4,9 l destilliertem Wasser aus der Millipore®-Filter-Anlage angesetzt.

3.2.8.2 HEPES – Puffer

Für 500ml HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- Ethansulfonsäure mit einem Molekulargewicht von $M = 238,306 \text{ g / mol}$ wurde gemäß der Formel $m = c \times V$ 23,83 g HEPES abgewogen und in etwa 450 ml PBS gelöst. Wenn nötig, wurde der pH mit 1N NaOH auf 7,4 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt. Im Anschluss war es nötig die Lösung zu autoklavieren.

3.2.8.3 Primerlösungen

a) für PCR

Gen	Produkt	Sequenz
BRaf Exon 11	62 Bp	Forward primer: 5'- Bio -CAGTGGGACAAAGAATTGGATCTG-3' Reverse primer: 5'-CCATGCCACTTTCCCTGTAGA-3'
BRaf Exon 15	91 Bp	Forward primer: 5'-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG-3' Reverse primer: 5'- Bio -TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT-3'
KRas Exon 2 Ogino*	82 Bp	Forward primer: 5'- Bio -TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG-3' Reverse primer: 5'-TCGTCCACAAAATGATTCTGA-3'
Poehlmann*	82 Bp	Forward primer: 5'-NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' Reverse primer: 5'- Bio -TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'

Tab. 5: Primer mit Basensequenz für PCR: *) siehe 3.2.9

Die lyophilisierten Primer wurden zunächst gemäß Herstellerangaben auf 100pM/µl mit H₂O für die Molekularbiologie unter sterilen Bedingungen gelöst und 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ca. 20 Sekunden im Vortexer durchmischt. Es wurden 20µM Aliquots, z.B. 500µl als Mix von Forward- und Reverse-Primer erstellt und eine Test-PCR durchgeführt, um das vollständige Lösen und die Verwendbarkeit der Primer zu überprüfen.

b) für Pyrosequenzierung

Gen	Sequenz
BRaf Exon 11	Sequenzierungsprimer: 5'-ACTTCCCTTGACTGT-3'
BRaf Exon 15	Sequenzierungsprimer: 5'-GTAAAAATAGGTGATTTGG-3'
KRas Exon 2 Ogino*	Sequenzierungsprimer: 5'-GCACTCTGCCTACG-3'
KRas Exon 2 Poehlmann*	Sequenzierungsprimer: 5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3'

Tab. 6: Sequenzierungsprimer mit Basensequenz für Pyrosequenzierung; *) siehe 3.2.11

Die Sequenzierungs-Primer für die Pyrosequenzierung wurden ebenfalls nach Herstellerangaben auf 100pM/ μ l gelöst. Anschließend wurden unter Verwendung von PyroMark Annealing Buffer 3 μ M Aliquots erstellen. Diese Lösung wurde noch zehnfach verdünnt um bei der Pyrosequenzierung eine Endkonzentration der Primer von 0,3 μ M zu erreichen.

3.2.8.4 Orange G Ladepuffer

Hierzu wurden in einem 15ml Reaktionsgefäß 0,01 g Orange G und 5g Saccharose / Sucrose (DNAse/RNAse frei) eingewogen und in 10ml TAE-Puffer (1x) gelöst. Davon wurden Aliquots von 1 ml erstellt, welche wiederum bei -20°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut werden konnten. Der Farbstoff Orange G verhält sich in der Gelelektrophorese, dem Spannungsgefälle folgend, etwa wie ein 20bp Fragment doppelsträngiger DNS (z.B. PCR-Produkt) und dient daher zur Kontrolle des Fortschritts der Auftrennung der DNS-Probe. Die hohe Viskosität der Lösung erlaubt ein einfacheres Umgehen. Auch versehentlich pipettierte Luftblasen schwimmen die DNS-Probe nicht aus der Geltasche. Der „Puffer“ diente lediglich zur Erleichterung beim Auftragen der DNS-Proben und zur Fortschrittskontrolle der Auftrennung während der Gelelektrophorese. Er konnte auch höher konzentriert verwendet werden (10 μ l DNS + 2 μ l Puffer), was die Berechnung und Handhabung erleichterte.

3.2.8.5 2%-ige Eosin Lösung

Es wurden zunächst 2,00 g Eosin abgewogen und in 200ml 96% Ethanol vollständig gelöst[117]. Anschließend wurde die Lösung durch einen Trichter mit aufgesetztem Faltenfilter in eine braune Glasflasche filtrieren, welche einen relativen Schutz vor UV-Licht bietet und somit die Lösung mehrmals verwendbar machte (maximal 3-mal).

3.2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR diente zur Amplifikation der für die Mutationsanalyse benötigten Gensegmente und wurde für alle Gene (BRaf 11, 15, KRas) unter möglichst sterilen Bedingungen unter der Werkbank Hera Safe durchgeführt. Pro PCR mit n-Proben wurde eine Positivkontrolle (bekanntes DNS-Template z.B. DNS der Zellen DLD-1 oder HT-29 + passende Primer) sowie eine Negativkontrolle, welche alle „Zutaten“ außer DNS enthielt, erstellt. Um das Volumen für alle Proben konstant bei 40µl zu halten, wurde statt DNS gleiches Volumen H₂O für alle Primer verwenden. 40µl PCR-Volumen wurden verwendet um von einer Probe die Pyrosequenzierung mit 15µl zweimalig (bei fehlerhaftem 1. Mal) durchführen zu können und zusätzlich 8µl PCR-Produkt für die Gelelektrophorese zur Verfügung zu haben.

Um die optimalen Versuchsbedingungen mit einer möglichst großen Menge an PCR-Produkt herzustellen, mussten zunächst mehrere Versuchsreihen durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Versuchsreihen ergaben folgende Voraussetzungen:

1. Optimale Mg²⁺ – Konzentration: 1,5mM
2. Optimale einzusetzende DNS – Menge: 10ng für Positivkontrollen; für Patientenproben siehe Kapitel Mikrodissektion.
3. Optimale Testtemperatur: s. Tabelle 6
4. Optimale Anzahl der PCR – Zyklen: 50 Zyklen
5. Optimale Primerkonzentration: 0,4µM
6. Optimale Konzentration der dNTPs: 0,2mM
7. Optimale Konzentration der HotStarTaqDNA Polymerase: 1,0 U/µl

Sollten mehrere DNS-Templates mit verschiedenen Primern untersucht werden, so enthielt der Mastermix lediglich H₂O, 10x Puffer, dNTPs und (Taq-)Polymerase.

Um Ungenauigkeiten bei der Pipettierung auszugleichen wurde für den Mastermix immer mit n+1-Proben gerechnet. Der Mastermix bestand pro Probe (n=1) aus folgenden Komponenten:

1. 4,0µl 10x PCR Puffer (beinhaltete 15mM Mg²⁺), Endkonzentration 1,0x
2. 0,2µl HotStarTaqDNA Polymerase, Endkonzentration. 1,0 U/µl
3. 4,0µl Roti-Mix PCR1 dNTPs 2mM:, Endkonzentration 0,2 mM
4. 0,8µl Primer 20µM, Endkonzentration. 0,4 µM; siehe Tabelle 5
5. 29,0µl H₂O für die Molekularbiologie

Um die Herstellung des Mastermix zu erleichtern wurde in Microsoft Excel ein Programm erstellt, welches je nach gewünschter Probenanzahl die richtige Menge der zu pipettierenden Stoffe errechnete.

Für die Positivkontrollen wurden jeweils 10 ng/µl DNS, die aus humanen Tumorzelllinien extrahiert wurde, oder humane männliche DNS, verwendet.

- BRaf11: HT-29 oder humane männliche DNS
- BRaf15: HT-29 oder humane männliche DNS
- KRas: DLD-1 oder humane männliche DNS

38µl Master Mix wurden in 0.2ml PCR-ready Reaktionsgefäße gefüllt und 2µl DNS (Patientenproben + Positivkontrollen) wurden unter der DNA-Werkbank hinzugefügt. Es folgte eine kurzes Schütteln der Proben für 10 Sekunden und eine anschließende Abzentrifugierung für 5 Sekunden in der Mikro-Zentrifuge. Die Proben konnten nun in den Master-Cycler gradient überführt, und das Programm „DANIEL50“ gestartet werden. Dafür wurde der Deckel auf 104°C vorgeheizt. Im Anschluss folgten die Zyklen 1-6 (siehe Tabelle 7), wobei die Zyklen 2-4 in numerischer Reihenfolge 50-mal wiederholt wurden.

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x	95°C	15 min
2	50x	95°C	30 sec
3	50x	60°C	30 sec
4	50x	72°C	30 sec
5	1x	72°C	2 min
6	1x	20°C	1 sec

Tab. 7: PCR-Programm: „DANIEL 50“ Gesamtdauer: 145min / 2h25min; Deckel vorgeheizt auf 104°C

Nach Abschluss der PCR wurden die Proben bei +4°C zwischengelagert, bis der nächste Bearbeitungsschritt erfolgte.

Die Mutationsanalyse im KRas-Gen auf Exon 2 Codon 12/13 erfolgte internen Qualitätskontrolle auf zwei unterschiedliche Ansätze. Zum einen die Methode beschrieben nach Ogino et al.[118] und zum anderen die Methode nach Poehlmann et al.[119]

Diese beiden Methoden unterscheiden sich hinsichtlich der Richtung der Sequenzierung und der verwendeten Primer (siehe Tabellen 3,4). Während es bei der Methode nach Ogino

die Sequenzierung vom 5'-Ende zum 3'-Ende erfolgt, sequenziert die Methode nach Pohlmann in der entgegengesetzten Richtung vom 3'-Ende zum 5'-Ende die Codons 12 und 13.

3.2.10 Gelelektrophorese

Herstellung eines 3%igen Elektrophoresegels:

Hierzu wurden 3g Agarose in einem dafür geeignetem 250ml Glasgefäß (mit Deckel) abgewogen und mit 100 ml 1xTAE-Puffer vermischt und für 30 Sekunden geschwenkt.

In der Mikrowelle wurde die Mischung mit gelockertem Deckel bei 800 Watt für eine Minute aufgekocht bis sich Blasen bildeten und anschließend geschwenkt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte und in der Agarose/TAE-Mischung keine Schlieren mehr sichtbar waren.

Bevor das Gel gegossen werden konnte, mussten 3 µl EtBr zugegeben werden und durch Schwenken gut untergemischt werden, bis das EtBr nicht mehr zu sehen war.

Nachdem die Kämme in die Gelkammer eingebracht worden waren, konnte das Gel möglichst luftblasenfrei gegossen werden. Falls doch Luftblasen entstanden, wurden diese mit einer Pipettenspitze zur Seite geschoben.

Anschließend musste das Agarose-Gel für 20 Minuten aushärten[120].

Elektrophorese:

Die Gießform mit Gel wurde in die Kammer gelegt. 1xTAE-Puffer wurde in die Kammer gegossen, sodass das Gel vollständig bedeckt war. Der TAE-Puffer konnte dabei mehrmals (bis zu dreimal) verwendet werden. Nachdem die Kämme entfernt worden waren, konnte mit der Beladung des Gels mit den vorbereiteten Proben begonnen werden.

Dabei waren die Proben folgendermaßen zusammengesetzt:

1. 7 µl PCR-Produkt
2. 2µl 10 x Orange G Ladepuffer

Die DNS-Leiter als Kontrollbande besetzte immer die erste Tasche des Agarose-Gels und bestand aus:

1. 7 µl molekularbiologischem H₂O
2. 2µl 10 x Orange G Ladepuffer

3. 1 µl DNS-Leiter

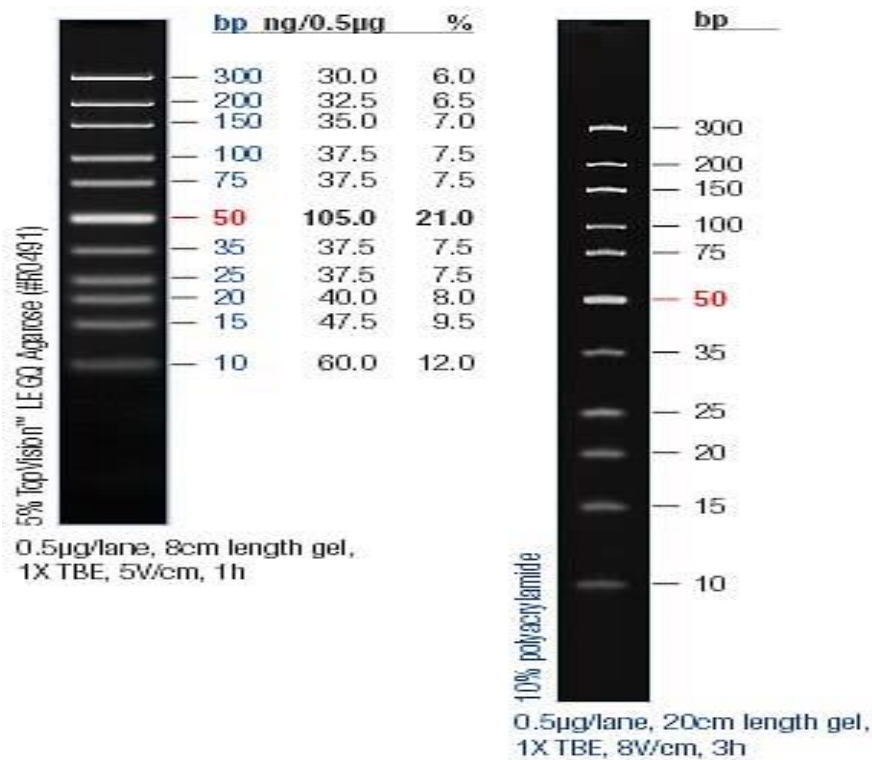


Abb. 10: Zusammensetzung der Basenleiter nach 1h und nach 3h Laufzeit der Gelelektrophore gemäß Herstellerangaben.

Die vorletzte und letzte Tasche des Agarose-Gels beinhaltete stets die Positiv- und Negativkontrollen. Diese wurden nach demselben Schema wie alle Proben aufgetragen und beinhalteten die Positiv- (Zelllinien HT-29, DLD-1) und Negativkontrollen der PCR.

Nach Abschluss der Kammer und Anschluss der Pole, welche die Laufrichtung vorgeben (schwarz = negativ → rot = positiv) musste der Power Supply (je nach Bedarf) programmiert werden. Hierzu wurde das Programm BAE-Gelelektrophorese ausgewählt mit folgenden Einstellungen:

Laufzeit: 1h15 Minuten

Spannung: 100 V (konstant)

Strom: 300 mA,

Leistung: 14W

Die Einstellungen wurden so gewählt, dass nach Ablauf der Zeit die Bande des Orange G - Puffers kurz vor der 2. Taschenreihe zum Liegen kam. Dadurch kam eine ausreichende

Auftrennung der DNS-Fragmente zustande, sodass sie in Zusammenschau mit der Basen-Leiter mühelos ausgewertet werden konnte (s. Abbildung 10).

Auswertung der Gelelektrophorese:

Im Geldokumentationsraum wurde das Gel auf die Vorrichtung gelegt und die Fotokammer fest verschlossen. Nach Überprüfung und Feinjustierung der Kameraeinstellung wurden unter UV-Belichtung mit dem Gel-Pro Imager Fotos des Gels angefertigt. Hierzu wurde die Software Gel-Pro Analyzer verwendet. Die angefertigten Fotos wurden als JPEG-Dateien abgespeichert und anschließend mit Adobe Photoshop farblich invertiert, um eine optimale Belichtungseinstellung auf den Fotos zu erreichen.

BRaf 11:

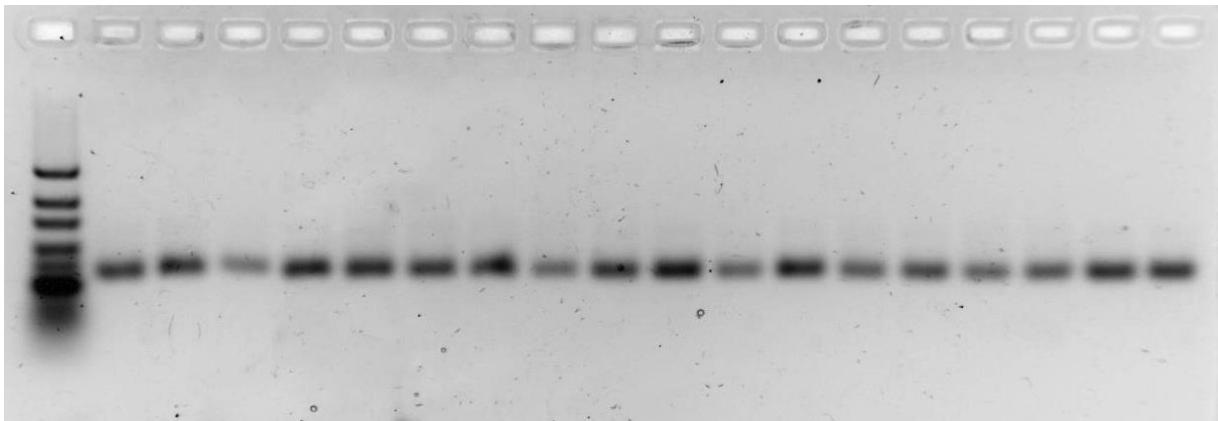


Abb. 11: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für BRaf11

BRaf 15:

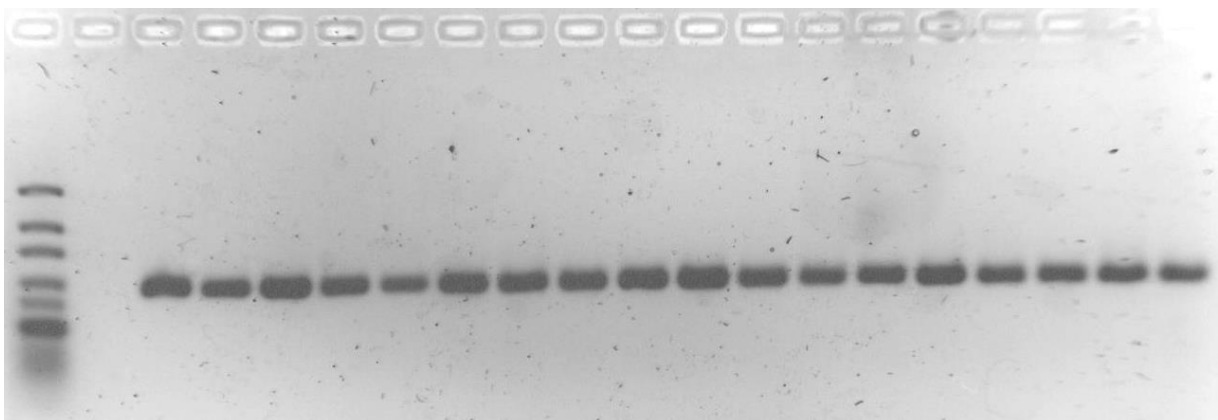


Abb. 12: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für BRaf15

KRas Ogino:

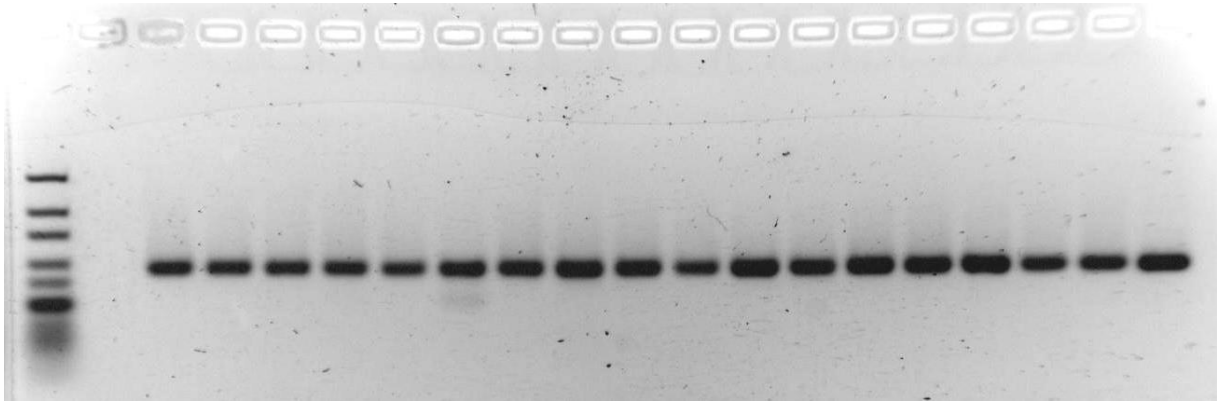


Abb. 13: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für KRas Ogino

KRas Poehlmann:

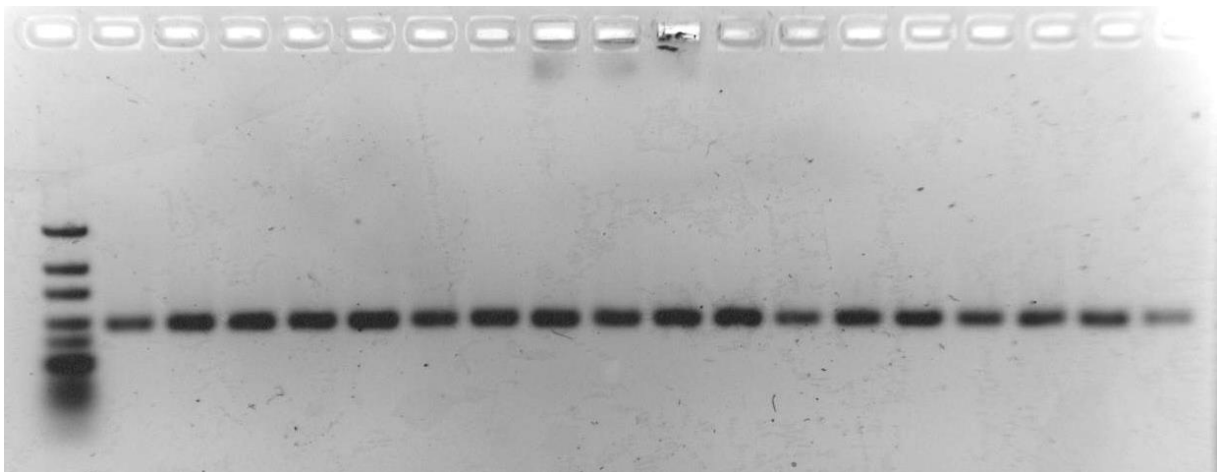


Abb. 14: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für KRas Poehlmann

3.2.11 Pyrosequenzierung

3.2.11.1 Funktionsweise

Schritt 1

Ein Sequenzierungs-Primer wird zu einem Einzelstrang PCR-Amplifikat hinzugefügt, das als Template dient und mit den Enzymen DNS-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase sowie den Substraten Adenosin-5-Phosphosulfat (APS) und Luziferin inkubiert wird.

Schritt 2

Das erste Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) wird zur Reaktion hinzugefügt. Die DNS-Polymerase katalysiert den Einbau des dNTP in den DNS - Strang, wenn es komplementär zu der Base im Template Strang ist. Jeder Baseneinbau ist dabei von einer Freiset-

zung von Pyrophosphat (PPi) begleitet, in einer quantitativ äquimolaren Menge zum eingebauten Nukleotid.

Schritt 3

ATP-Sulfurylase verwandelt PPi unter Anwesenheit von APS in ATP. Dieses ATP treibt die Luziferase gesteuerte Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin an, was sichtbares Licht in einer Menge proportional zur Menge an ATP produziert. Das Licht, das in der Luziferase katalysierten Reaktion entsteht, wird von einem CCD (charge coupled device) – Chip detektiert und als eine Spitze im Rohdatenauswurf (Pyrogramm) sichtbar gemacht. Die Höhe einer einzelnen Spitze (Lichtsignal) ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.

Schritt 4

Apyrase, ein vom Nukleotid Phosphat abspaltendes Enzym, degradiert kontinuierlich nicht eingebaute Nukleotide und ATP. Wenn der Abbau beendet ist, wird ein anderes Nukleotid hinzugefügt.

Schritt 5

dNTPs werden hinzugefügt. Es sollte erwähnt werden, dass Desoxyadenosin-alpha-thiotriphosphat (dATP S) verwendet wird um das natürliche Desoxyadenosintriphosphat (dATP) zu ersetzen, da es von der DNS-Polymerase effizient eingebaut werden kann, jedoch von der Luziferase nicht erkannt wird. Wenn der Prozess fortgesetzt wird, wird der komplementäre DNS-Strang aufgebaut und die Nukleotid-Sequenz kann anhand der Signalspitzen im Pyrogramm-Ablauf detektiert werden.[121]

3.2.11.2 Durchführung

Im ersten Schritt wurden die zu analysierenden Proben in der Software PyroMark® Q24 2.0 auf die vorhandenen 24 Analyseplätze verteilt und per drag & drop mit den jeweils zu analysierenden Programmen besetzt und benannt. Damit war sichergestellt, dass für jede Probe auch das dem Gen entsprechende Programm abgelaufen ist. Die Analysereihenfolge wurde nun auf einem USB-Stick abgespeichert und die entsprechende PreRunInformation der Software ausgedruckt. Hierauf befanden sich die benötigten Mengen an Enzym-Mix, Substrat-Mix und dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), welche bereits von der Software errechnet worden ist.

Um die Vorbereitung abzuschließen wurden an der PyroMark® Q24 Vacuum Workstation die dafür vorgesehenen Behälter mit 70-prozentigem Ethanol, PyroMark® Wash Buffer, destilliertem Wasser und PyroMark® Denaturation Solution gefüllt.

Je nach Anzahl benötigter Proben wurde zunächst ein MasterMix, bestehend aus 40µl PyroMark® Binding Buffer, 23µl molekularbiologisches Wasser und zwei µl streptavidin-coated Sepharose™ beads pro Probe, erstellt. Der MasterMix wurde für 20 Sekunden mit

dem Vortexer durchmischt, in eine 24-Well-Platte ohne Deckel aufgeteilt und 15µl der zu analysierenden PCR-Probe hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten auf dem Magnetschüttler mit 1500 UpM gut durchmischt.

In der Zwischenzeit wurde in ein PyroMark® Q24 Cartridge - gemäß der PreRunInformation - der Enzym-Mix, Substrat-Mix und die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in den jeweils dafür vorgesehenen Öffnungen, eingefüllt.

Außerdem wurden - gemäß der Reihenfolge der Proben - je 25µl der entsprechenden Sequenzierungs-Primer, welche zuvor zu einer Endkonzentration von 0,3µM mit PyroMark Annealing Buffer verdünnt worden waren, in die Aussparungen einer PyroMark® Q24 Plate pipettiert.

Die PyroMark® Q24 Vacuum Workstation wurde nach der Inbetriebnahme zunächst mit ca. 50 ml Wasser durch den Saugkopf gespült. Anschließend wurde die 24 Well Platte mit den Proben in die dafür vorgesehene Halterung eingespannt und der Saugkopf vorsichtig in die Proben eingeführt. Erst wenn die gesamte Flüssigkeit aufgesogen worden war, konnte der Saugkopf vorsichtig aus der 24 Well Platte herausgehoben werden und unmittelbar über die PyroMark® Q24 Plate gehalten werden. Dann wurde der Vakuumsauger ausgeschaltet und nach ca. drei Sekunden wurden die Stifte des Saugkopfes in die Primerlösung eingetaucht und etwa zehn Sekunden vorsichtig gerüttelt.

Die PyroMark® Q24 Plate mit den Proben wurde auf einen PyroMark® Q24 Plate Holder gestellt und zwei Minuten bei 80°C auf der Heizplatte erhitzt. Anschließend mussten die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen und in die Analysevorrichtung des PyroMark® Q24 Instrument gestellt werden. Zusätzlich wurde der bereits bestückte PyroMark® Q24 Cartridge ebenfalls in seine Analysevorrichtung am PyroMark® Q24 Instrument eingespannt und das gesamte Gerät verschlossen.

Zum Beginn der Pyrosequenzierung musste der USB-Stick mit den Daten der zu analysierenden Proben mit dem PyroMark® Q24 Instrument verbunden und das entsprechende Verzeichnis aufgerufen und gestartet werden. Nach Abschluss der Sequenzierung wurde die fertige Datei auf dem USB-Stick gespeichert und konnte mit der PyroMark® Q24 Software 2.0 ausgewertet werden.

3.2.12 DNS-Sequenzierung mit der Methode nach Sanger

Um die mittels Pyrosequenzierung nicht eindeutig zu identifizierende Probe des Patienten #4095 zweifelsfrei einer spezifischen Mutation zuzuordnen, musste in diesem speziellen Fall auf die Sequenzierungsmethode nach Sanger [122] zurückgegriffen werden. Die Durchführung dieser Methode wurde mit freundlicher Unterstützung des pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Jung ermöglicht.

3.2.13 Erstellung einer Datenbank

Für die statistische Auswertung der experimentellen Daten war eine ausführliche Datenerhebung für die klinischen und pathologischen Daten jedes Patienten notwendig. Dafür wurde eine übersichtliche Datenbank sowohl für die klinischen als auch für die experimentellen Parameter mittels FileMakerPro erstellt. Zusätzlich sind die in der Nachsorge erhobenen Daten in die Datenbank mit eingearbeitet worden.

Zur Erhebung der Daten wurden zunächst bei allen Patienten Daten aus OP-Berichten, Arztbriefen und Befunden (Computertomographien, Magnetresonanztomographien, Röntgenberichte, Ultraschallbefunde, Laborparameter etc.) herausgearbeitet.

Zusätzlich wurden die älteren Jahrgänge der Patientenakten, welche im Archiv des Klinikums Großhadern auf Mikrofilm gespeichert wurden ebenfalls zur Informationsbeschaffung herangezogen.

Darüber hinaus sind für jeden einzelnen Patienten die Daten, welche im Rahmen der klinischen Nachsorge erhoben wurden, in die Datenerhebung eingeflossen. Es liegt eine Unbedenklichkeitsbescheinigung der Ethikkommission vor. Zusätzlich wurde das Einwohnermeldeamt und das Tumorregister München bezüglich der Sterbedaten befragt.

Die hieraus gewonnenen Informationen sind ebenfalls in die Datenbank mit aufgenommen worden.

3.2.14 Statistische Auswertung

3.2.14.1 Datenbank in SPSS

Für die statistische Auswertung wurden zunächst relevante Merkmalsfelder aus der kolorektalen Datenbank im FileMaker identifiziert und über eine Excel-Auslagerungsdatei in SPSS importiert. Hierbei war eine exakte Übertragung mit anschließende Prüfung auf Richtigkeit der Daten erfolgt. Zusätzlich wurden für die Mehrzahl der Merkmale Schwellenwerte definiert (s. Tabelle 11, 12, 33 Anhang), welche eine Einteilung der Merkmale in Gruppen ermöglichte und die Voraussetzung für eine statistische Auswertung darstellte.

3.2.14.2 Skalierung und Prüfung auf Normalverteilung

In der SPSS-Datenbank wurden zunächst die einzelnen Merkmalsfelder hinsichtlich der Skalierung definiert:

1. Nominalskaliert (z.B. Geschlecht)

2. Ordinalskaliert (z.B. TNM-Stadium)

3. Intervallskaliert (z.B. Alter in Jahren)

Für die intervallskalierten Merkmale musste nun eine Prüfung auf Normalverteilung erfolgen. Dies wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Testes rechnerisch überprüft.

Anschließend erfolgte zusätzlich eine graphische Darstellung der Normalverteilung mittels Q-Q-Diagrammen (siehe Abbildung 15, 16).

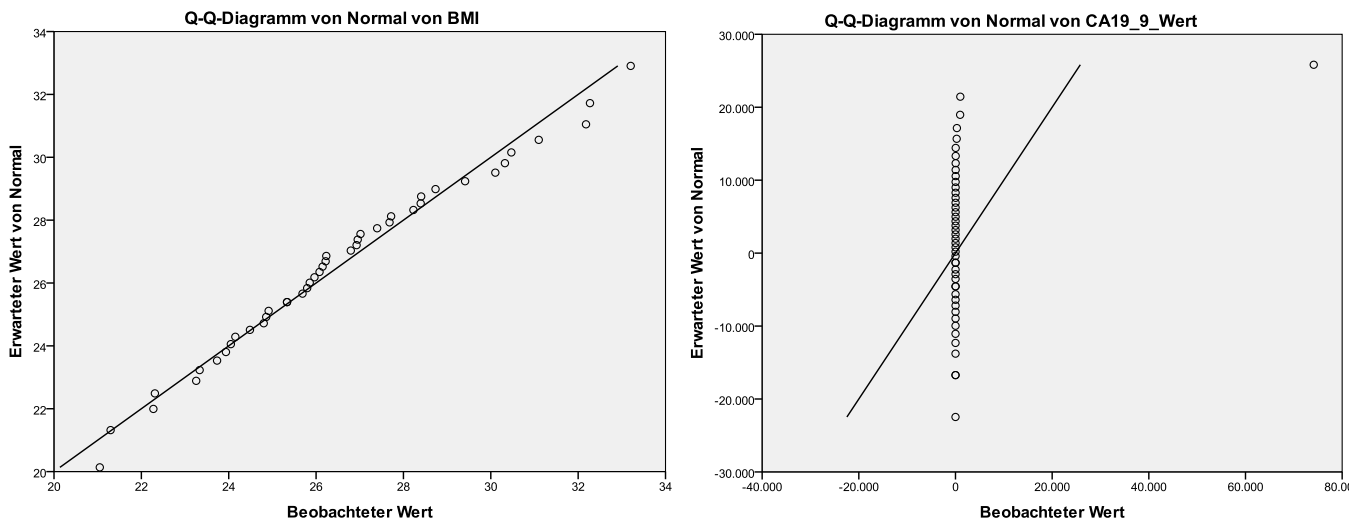


Abb. 15: normalverteilter Q-Q-Plot am Beispiel des Body Mass Index (BMI)

Abb. 16: nicht normalverteilter Q-Q-Plot am Beispiel des CA19-9 Wertes

Da es sich bei den Testvariablen vollständig um unverbundene Variablen handelte, konnte auf eine Differenzierung und Angleichung der zu verwendenden statistischen Testverfahren verzichtet werden.

3.2.14.3 Univariate Analyse

Je nach entsprechender Fragestellung mussten für die univariate Analyse verschiedenste Tests zur Auswertung der einzelnen Parameter herangezogen werden. Eine Annahme der Nullhypothese erfolgte jeweils bei einem Signifikanzniveau $p=0,05$ oder kleiner. Die folgende Tabelle stellt eine Aufstellung der verwendeten statistischen Testverfahren dar:

Art des Merkmals Anzahl der Gruppen	Merkmal		
	qualitativ	quantitativ	
		Normalverteilung	beliebige Verteilung
Vergleich von zwei Gruppen	X ² - Test Exakter Fisher Test	T-Test	Mann Whitney U-Test
Vergleich von mehr als zwei Gruppen	X ² - Test	Einfache Varianzanalyse (ANOVA)	Kruskal-Wallis-Test

Tab. 8: Überblick über die verwendeten statistischen Testverfahren

3.2.14.4 Kaplan-Meier-Schätzer

Um die prognostische Wertigkeit der experimentell erhobenen Parameter zu erhalten, wurden Kaplan-Meier-Schätzer-Kurven erstellt. Als Ereignis wurde der Tod des Patienten definiert. Eine Zensierung wurde vorgenommen, sobald die Nachsorge des Patienten nicht möglich gewesen ist und keine Überlebensdaten erhoben werden konnten. Um die statistische Signifikanz der Überlebenszeit darzustellen wurde auf den LogRank-Test zurückgegriffen.

3.2.14.5 Cox-Regressionsanalyse

Um den gegenseitigen Einfluss von Faktoren, die mit der Lebenszeit korrelieren zu überprüfen und um deren unabhängigen signifikanten Einfluss darzustellen, wurde eine Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wird die Zeit bis zu einem bestimmten Ereignis („time to event“) zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen, um die Wirkung von prognostischen Faktoren abzubilden. Diese Faktoren haben einen Effekt auf die Hazard-Funktion, mit der die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines bestimmten Ereignisses

ausgedrückt wird.

4 Ergebnisse

4.1 Zelllinien

Hinsichtlich der zu testenden Patientenproben wurde zunächst die Methodik an Zelllinien-DNS von Tumorzelllinien etabliert um anschließende Ergebnisse mit der Literatur sowie den Patientenproben abzugleichen. Zudem dienten die Ergebnisse aus den Zelllinien als Positivkontrollen für die anstehende Patientencharakterisierung.

4.1.1 Quantitative DNS-Analyse

Um eine Aussage über die Reinheit der vorliegenden DNS zu bekommen und die Menge der isolierten DNS abschätzen zu können, welche als Kontrollen in die PCR eingesetzt wurden, war zunächst eine quantitative Analyse notwendig. Zudem kann anhand der Messung und Berechnung des Extinktionkoeffizienten der Lichtabsorption der Wellenlängen 260nm und 280nm auf die Verunreinigung der Proben mit Phenol oder Proteinen geschlossen werden. Die Bestimmung der Menge an DNS in den Zellpellets der einzelnen Zelllinien ergab folgende Ergebnisse (s. Tabelle 9): Für die kolorektale Karzinomzelllinie SW480 ergaben sich in der nativen Form 46 µg/ml doppelsträngige DNS mit einer Reinheit von 1,39. Die Oxaliplatin resistente Form von SW480 kam auf 21 µg/ml dsDNS bei einer Reinheit von 1,49. Die Irinotecan resistente SW480 Zelllinie ergab 795,5 µg/ml dsDNS bei einer E_{260} / E_{280} -Ratio von 1,42. Für die ebenfalls vom kolorektalen Karzinom stammende Zelllinie RKO ergaben sich in der nativen Form 1054,5 µg/ml an dsDNS mit einer Reinheit von 1,43. Bei den Oxaliplatin und Irinotecan resistenten RKO-Linien ergaben sich 585,5 bzw. 46,5 µg/ml dsDNS bei einem Reinheitskoeffizienten von 1,38 bzw. 2,98. Weitere Für HT-29, DLD-1 und GEO lag die Menge an dsDNS für HT-29 bei 2135 µg/ml, bei DLD-1 bei 209 µg/ml und bei GEO bei 220 µg/ml. Ihre Reinheiten betragen entsprechend 1,73, 2,22 und 1,75 im E_{260} / E_{280} .

Die vom metastasierten Nierenzellkarzinom stammende Linie SKRC-29 kam auf 46,5 µg/ml dsDNS bei einer Reinheit von 1,36. Die beiden Harnblasenkarzinom-Zelllinien TCC SUP und RT-112 brachten es auf einen Mittelwert von 11 bzw. 83 µg/ml gemessener dsDNS bei Reinheitsquotienten von 1,71 bzw. 1,57.

Für die Ovarialkarzinomlinie OVCAR-3 wurde eine mittlere Menge von 61,5 µg/ml dsDNS bei einer Reinheit von 1,69 ermittelt.

Tumorzelllinien	Diagnose (Ursprung der Zelle)	Mittelwert der gemessenen Menge an dsDNS in µg/ml	Reinheit E₂₆₀ / E₂₈₀*
SW480 Wt***	KRK (Primaria)	46 µg/ml dsDNS	1,39
SW480 Oxaliplatin res**	KRK (Primaria)	21 µg/ml dsDNS	1,49
SW480 Irinotecan res**	KRK (Primaria)	795,5 µg/ml dsDNS	1,42
RKO Wt***	KRK (Primaria)	1054,5 µg/ml dsDNS	1,43
RKO Oxaliplatin resistent	KRK (Primaria)	585,5µg/ml dsDNS	1,38
RKO Irinotecan resistent	KRK (Primaria)	46,5 µg/ml dsDNS	2,98
HT-29	KRK (Primaria)	2135 µg/ml dsDNS	1,73
DLD-1	KRK (Primaria)	209 µg/ml dsDNS	2,22
GEO	KRK (Primaria)	220µg/ml dsDNS	1,75
HCT116	KRK (Primaria)	112µg/ml dsDNS	1,82
SKRC-29	met. Nieren-CA	46,5 µg/ml dsDNS	1,36
TCC SUP	Harnblasen-CA	11 µg/ml dsDNS	1,71
RT-112	Harnblasen-CA	83 µg/ml dsDNS	1,57
OVCAR-3	Ovarial-CA	61,5 µg/ml dsDNS	1,69

Tab. 9: Ergebnisse der photometrischen DNS-Bestimmung; *) Extinktionskoeffizient der Wellenlängen 260/280nm als Maß für die Reinheit der isolierten DNS; **)resistent; ***)Wildtyp

4.1.2 Molekulare Analyse

Die unter 4.1 bereits beschriebenen Zelllinien wurden hinsichtlich ihres Mutationsstatus für BRAf und KRas beurteilt (s. Tabelle 10), um zunächst die Reproduzierbarkeit der Methodik und mögliche Positivkontrollen zu identifizieren.

Die SW480 Zelllinien wiesen konstant in der KRas-Analyse die G12V-Mutation auf[123, 124], ebenso die Nierenzellkarzinom-Zelllinien SKRC-29. Beide Linien waren Wildtyp sowohl für BRAf11 als auch für BRAf15. In den beiden kolorektalen Adenokarzinom-Linien DLD-1 und HCT116 konnte die G13D-Mutation nachgewiesen werden, wie bereits mehrfach beschrieben[124-126]. Bei HCT 116 wurde die Mutation allerdings nur über die Methode von Poehlmann et al.[119] nachgewiesen. Hinsichtlich BRAf 11 und 15 lag jeweils

der Wildtyp vor. Bei den BRaf-Mutationen konnte lediglich in den Zelllinien RKO, HT-29 und OVCAR-3 eine V600E-Mutation auf Exon 15 detektiert werden[124]. Bei der GEO-Linie konnte eine KRas G12A-Mutation nachgewiesen werden. Die Zelllinien TCC SUP und RT112 zeigten sowohl für BRaf 11,15 als auch für KRas den Wildtyp. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten die Zelllinien HT-29, RKO, OVCAR-3, DLD-1, SW480 und GEO als Positivkontrollen für die Mutationsanalyse verwendet werden.

Zelllinie	BRaf 11	BRaf 15	KRas Poehlmann	KRas Ogino
SW480 par	Wt**	Wt**	Mut*G12V	Mut*G12V
SW480 Oxaliplatin-res	Wt**	Wt**	Mut*G12V	Mut*G12V
SW480 Irinotecan-res	Wt**	Wt**	Mut*G12V	Mut*G12V
RKO par	Wt**	Mut*V600E	Wt**	Wt**
RKO Oxaliplatin-res	Wt**	Mut*V600E	Wt**	Wt**
RKO Irinotecan-res	Wt**	Mut*V600E	Wt**	Wt**
HT29	Wt**	mut*V600E	Wt**	Wt**
DLD-1	Wt**	Wt**	Mut*G13D	Mut*G13D
GEO	Wt**	Wt**	Mut*G12A	Mut*G12A
SKRC-29	Wt**	Wt**	Mut*G12V	Mut*G12V
TCC SUP	Wt**	Wt**	Wt**	Wt**
RT112	Wt**	Wt**	Wt**	Wt**
OVCAR-3	Wt**	Mut*V600E	Wt**	Wt**
HCT116	Wt**	Wt**	Mut*G13D	Wt**

Tab. 10: Ergebnis der Sequenzierung von KRas Exon 1 Codon 12/13, BRaf Exon 11 + Exon 15 in den aufgeführten Zelllinien. *)Mutation **)Wildtyp;

4.2 Patientenkollektivbeschreibung

4.2.1 Übersicht Primaria

Patienten-assoziierte Parameter		n	Primärtumoren	%**
Geschlecht	Männlich	108	62	57,4
	Weiblich		46	42,6
Alter (in Jahren)	Durchschnitt (range)	108	68,1(43,4 - 90,9)	
	Standardabweichung		9,4	
	< Durchschnitt		49	45,4
	≥ Durchschnitt		59	54,6
Body Mass Index	Durchschnitt (range)	106	*	
	Standardabweichung		26,3 (16,2 - 48,4)	
	< 18,5 kg/m ²		4	3,8
	≥ 18,5 ≤30 kg/m ²		85	80,2
	> 30 kg/m ²		17	16,0
ASA - Score	1	106	7	6,6
	2		63	59,4
	3		35	33,0
	4		1	0,9
Tumor-assoziierte Parameter				
Lokalisation des Primärtumors	Zökum	108	10	9,3
	Kolon ascendens		27	25,0
	Kolon transversum		18	16,7
	Kolon descendens		6	5,6
	Sigma		38	35,2
	Rektum (> 10cm ab ano)		9	8,3
Tumorgroße (in cm)	Durchschnitt (range)	108	4,6 (1,2 - 11,5)	
	Standardabweichung		1,8	
	< Durchschnitt		55	50,9
	≥ Durchschnitt		53	49,1
Histologische Klassifikation Primärtumor	Adenokarzinom	108	92	85,2
	muzinöses Adenokarzinom		15	13,9
	medulläres Karzinom		1	0,9

Tumor-assoziierte Parameter		n	Primärtumoren	%**
Grading Primärtumor		108		
	G1		2	1,9
	G2		71	65,7
	G3		34	31,5
	G4		1	0,9
pT - Stadium Primärtumor		108		
	T1		3	2,8
	T2		16	14,8
	T3		71	65,7
	T4		18	16,7
pN - Stadium Primärtumor		108		
	N0		67	62,0
	N1		26	24,1
	N2		15	13,9
cM - Stadium Primärtumor		108		
	M0		93	86,1
	M1		15	13,9
UICC - Stadium Primärtumor		108		
	I		19	17,6
	IIA		36	33,3
	IIB		8	7,4
	IIIA		1	0,9
	IIIB		21	19,4
	IIIC		8	7,4
	IV		15	13,9
L - Stadium Primärtumor		70	*	
	L0		50	71,4
	L1		20	28,6
V - Stadium Primärtumor		70	*	
	V0		63	90,0
	V1		7	10,0
Pn - Stadium Primärtumor		24	*	
	Pn0		19	79,2
	Pn1		5	20,8
CEA präoperativ (löslich)		103	*	
	normal (< 3.4 ng/ml)		56	54,4
	pathologisch (≥ 3.4 ng/ml)		47	45,6
CA 19-9 präoperativ (löslich)		83	*	
	normal (< 37.0 U/ml)		69	83,1
	pathologisch (≥ 37.0 U/ml)		14	16,9
Behandlungs-assoziierte Parameter				
Resektionsstatus (R)		108		
	R0		94	87,0
	R1		3	2,8
	R2		11	10,2

Behandlungs-assoziierte Parameter	n	Primärtumoren	%**
Behandlungs-assoziierte Parameter			
<i>Operationsverfahren</i>			
Hemikolektomie rechts	108	33	29,5
Erweiterte Hemikolektomie rechts		17	15,2
Transversumresektion		1	0,9
Hemikolektomie links		9	8,0
Erweiterte Hemikolektomie links		4	3,6
Sigmaresektion (konventionell oder laparoskopisch)		12	10,7
Anteriore Rektumresektion		28	25,0
Tiefe anteriore Rektumresektion		7	6,3
Subtotale Kolektomie		1	0,9
Chemotherapie präoperativ			
Ja	108	0	0,0
Nein		108	100
*nicht alle Daten vorhanden			
**für statistische Berechnungen ausgeschlossen			
molekularbiologische Analysen			
BRaf 11			
Wildtyp	108	108	100
Mutation		0	0,0
BRaf 15			
Wildtyp	108	93	86,1
V600E - Mutation		15	13,9
KRas			
Wildtyp	108	71	65,7
G12S - Mutation		1	0,9
G12R - Mutation		1	0,9
G12C - Mutation		2	1,9
G12D - Mutation		11	10,2
G12A - Mutation		2	1,9
G12V - Mutation		11	10,2
G12W - Mutation		1	0,9
G13D - Mutation		8	7,4
G13C - Mutation		0	0,0
histologische Analysen***			
CD44v6			
Prozentsatz positiver Tumorzellen			
≤ 50%	85*	29	34,1
> 50%		56	65,9
CD45 Infiltrat			
0/1/2	85*	50	58,8
3		35	41,2
EGF-R			
Prozentsatz positiver Tumorzellen			
≤ 50%	85*	39	45,9
> 50%		46	54,1

histologische Analysen***	n	Primärtumoren	%**
HGF-R Prozentsatz positiver Tumorzellen	85*		
≤ 80%	20		23,5
> 80%	65		76,5
HLA-DR Prozentsatz positiver Tumorzellen	85*		
0%	36		42,4
> 0%	49		57,6
IGF1-R Prozentsatz positiver Tumorzellen	85*		
≤ 80%	34		40,0
> 80%	51		60,0
Ki67 Labelling Index	85*		
0%	17		20,0
> 0 - ≤ 30%	14		16,5
> 30 - ≤ 60%	32		37,6
> 60%	22		25,9
Her2/neu Prozentsatz positiver Tumorzellen	85*		
0%	49		57,6
> 0%	36		42,4
Her2/neu Score			
0	49		57,6
1	3		3,5
2	21		24,7
3	12		14,1
*nicht alle Proben bearbeitet (nicht ausreichend Gewebe vorhanden)			
** alle prozentualen Angaben sind auf eine Nachkommastelle gerundet.			
*** für mehr Informationen zu Material, Methoden, Ergebnisse (incl. Schwellenwerte zur Gruppenbildung) der immunhistologischen Untersuchungen siehe Anhang			

Tab. 11: Patientenkollektivbeschreibung der Primärtumoren

4.2.2 Übersicht Lebermetastasen

Patienten-assoziierte Parameter	n	Lebermetastasen	%**
Geschlecht	59	männlich	62,7
		Weiblich	37,3
Alter (in Jahren)	59	Durchschnitt (range)	62,6 (40 - 79)
		Standardabweichung	9,3
		< Durchschnitt	42,4
		≥ Durchschnitt	57,6
Body Mass Index	59	Durchschnitt (range)	25,5 (18,3 - 33,2)
		Standardabweichung	3,3
		< 18,5 kg/m ²	3,4
		≥ 18,5 ≤ 30 kg/m ²	84,7
		> 30 kg/m ²	11,9
ASA - Score	59	1	1,7
		2	69,5
		3	28,8
		4	0,0
<u>Tumor-assoziierte Parameter</u>			
Lokalisation des Primärtumors	55	*	
		Zökum	14,5
		Kolon ascendens	5,5
		Kolon transversum	7,3
		Kolon descendens	7,3
		Sigma	41,8
		Rektum (> 10cm ab ano)	18,2
		Kolon nicht näher definiert	7,3
		Doppelkarzinom	3,6
pT - Stadium Primärtumor	59	T1	5,1
		T2	8,5
		T3	74,6
		T4	11,9
pN - Stadium Primärtumor	58	*	
		N0	43,1
		N1	37,9
		N2	19,0
cM - Stadium Primärtumor	55	*	
		M0	38,2
		M1	61,8
UICC - Stadium Primärtumor	59	I	3,4
		IIA	11,9
		IIB	0,0
		IIIA	5,1
		IIIB	15,3
		IIIC	6,8
		IV	57,6

Tumor-assoziierte Parameter	n	Lebermetastasen	%**
Grading Primärtumor	57	*	
G1		0	0,0
G2		46	80,7
G3		11	19,3
G4		0	0,0
Lebermetastasenengröße (in cm)	56	*	
Durchschnitt (range)		3,93 (0,9-16,0)	
Standardabweichung		2,57	
< Durchschnitt		21	37,5
≥ Durchschnitt		35	62,5
Lebermetastasenengröße gemäß Fong-Score (s.u.)			
< 5cm		43	76,8
≥ 5cm		13	23,2
Anzahl der Lebermetastasen	56	*	
1		18	32,1
>1		38	67,9
Histologische Klassifikation Lebermetastase	58	*	
Adenokarzinom		52	89,7
muzinöses Adenokarzinom		6	10,3
medulläres Karzinom		0	0,0
Grading Lebermetastasen	51	*	
G1		0	0,0
G2		32	62,7
G3		19	37,3
G4		0	0,0
CEA präoperativ (löslich) Lebermetastasenresektion	56	*	
normal (< 3.4 ng/ml)		14	25,0
pathologisch (≥ 3.4 ng/ml)		42	75,0
Patienten mit pathologischen Werten von > 200ng/ml gemäß Fong-Score (s.u.)		n=3 (7,1%)	
CA 19-9 präoperativ (löslich) Lebermetastasenresektion	56	*	
normal (< 37.0 U/ml)		31	55,4
pathologisch (≥ 37.0 U/ml)		25	44,6
Behandlungs-assoziierte Parameter der Lebermetastasen	59		
Resektionsstatus (R)			
R0		46	78,0
R1		7	11,9
R2		6	10,2
Fong Score (je ein Punkt für progressionsfreies Intervall <12 Monaten, Primaria N1/2, CEA > 200ng/ml, Metastasenzahl > 1, Metastasenengröße > 5cm)	51	*	
Score 0		4	7,8
Score 1		13	25,5
Score 2		19	37,3
Score 3		12	23,5
Score 4		3	5,9
Score 5		0	0,0
Fong Score			
≤ 2		36	70,6
> 2		15	29,4

Behandlungs-assoziierte Parameter der Lebermetastasen	n	Lebermetastasen	%**
Operationsverfahren			
Hemihepatektomie rechts	59	16	27,1
Erweiterte Hemihepatektomie rechts		2	3,4
Hemihepatektomie links		3	5,1
Erweiterte Hemihepatektomie links		0	0,0
Segmentresektion		17	28,8
Atypische Resektion		21	35,6
Rezidiv nach Resektion Primärtumor			
1. Ordnung	59	45	76,3
2. Ordnung		14	23,7
Chemotherapie präoperativ			
Ja	59	42	71,2
Nein		17	28,8
molekularbiologische Analysen Lebermetastasen			
BRaf 11			
Wildtyp	58	*	
Mutation		58	100
		0	0,0
BRaf 15			
Wildtyp	58	*	
V600E - Mutation		57	96,6
		1	1,7
KRas			
Wildtyp	59	*	
G12S - Mutation		37	62,7
G12R - Mutation		2	3,4
G12C - Mutation		0	0,0
G12D - Mutation		2	3,4
G12A - Mutation		2	3,4
G12V - Mutation		9	15,3
G12W - Mutation		0	0,0
G13D - Mutation		5	8,5
G13C - Mutation		0	0,0
		2	3,4
		1	1,7
Histologische Analyse Lebermetastasen***			
CD44v6			
Prozentsatz positiver Tumorzellen			
≤ 50%	59	29	49,2
> 50%		30	50,8
CD45 Infiltrat			
0/1/2	59	45	76,3
3		14	23,7
EGF-R			
Prozentsatz positiver Tumorzellen			
≤ 50%	59	23	39,0
> 50%		36	61,0

Histologische Analyse Lebermetastasen	n	Lebermetastasen	%**
HGF-R Prozentsatz positiver Tumorzellen	59	≤ 80%	25,4
> 80%		74,6	
HLA-DR Prozentsatz positiver Tumorzellen	58	0%	69,0
> 0%		31,0	
IGF1-R Prozentsatz positiver Tumorzellen	59	≤ 80%	23,7
> 80%		76,3	
Ki67 Labelling Index	59	0%	18,6
> 0 - ≤ 30%		15,3	
> 30 - ≤ 60%		40,7	
> 60%		25,4	
Her2/neu Prozentsatz positiver Tumorzellen	58	0%	58,6
> 0%		41,4	
Her2/neu Score	58	0	58,6
1		1,7	
2		19,0	
3		20,7	
* nicht alle Proben bearbeitet			
** alle prozentualen Angaben sind auf eine Nachkommastelle gerundet.			
*** für mehr Informationen zu Material, Methoden und Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen siehe Anhang			

Tab. 12: Patientenkollektivbeschreibung der Lebermetastasen einschließlich der korrespondierenden tumorassoziierten Merkmale des Primärtumors

4.2.3 Klinisch-pathologische Daten

4.2.3.1 Primärtumoren

Die Gruppe der Patienten, deren Primärtumor analysiert wurde (n=108) bestand zu 57,4% (n=62) aus Männern und zu 42,6% (n=46) aus Frauen mit einem Durchschnittsalter von 68,1 Jahren und einer Standardabweichung von 9,4 Jahren.

Der Body Mass Index (BMI = Gewicht (in kg) / Größe² (in m)) lag im Durchschnitt bei 26,3 (16,2-48,4), die Standardabweichung betrug 4,7. Bei 2 Patienten konnten bei Aktenansicht keine Informationen zu Größe und Gewicht eruiert werden.

Unsere Kohorte befand sich in einem guten Gesundheitszustand, wie der Score der American Society of Anaesthesiology (ASA) zeigt (Details siehe Anhang) zeigt. Hierbei sind 66,0% (n=70) der Patienten ASA 1/2 klassifiziert, und 33,9% (n=36) weisen eine ASA-Klassifikation von 3 oder 4 auf. ASA5 und 6 wurde nicht beobachtet. Für 2 Patienten wurde der ASA-Score gemäß Aktenlage nicht erhoben.

Wenn man die Lokalisation des Tumors betrachtet, waren 9,3% (n=10) der Tumoren im Zökum, 25,0% (n=27) im Kolon ascendens, 16,7% (n=18) im Kolon transversum (inkludiert rechte und linke Kolonflexur), 5,6% (n=6) im Kolon descendens, 35,2% (n=38) im Kolon sigmoideum und 8,3% (n=9) im Rektum (> 10cm ab ano) gelegen. Zusammengefasst ist bei 50,9% (n=55) der Patienten der Tumor im rechten Kolon (Zökum, Kolon ascendens + Colon transversum) und 49,1% (n=53) der Tumoren im linken Kolon (Kolon descendens, Sigma und Rektum >10cm ab ano) lokalisiert.

Die pathologischen Daten wurden gemäß der internationalen TNM-Klassifikation aus dem Jahre 2005(6. Auflage)[127] vom Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München und für andere Zentren von deren klinikinternen pathologischen Instituten erhoben.

Die Größe der Tumoren war mit einer Durchschnittsgröße von 4,6cm (1,2-11,5cm) und einer Standardabweichung von 1,8 vergleichbar mit anderen Kollektiven.

Die histologische Tumorklassifikation ergab in 85,2% (n=92) aller Tumoren ein Adenokarzinom, in 13,9% (n=15) der Fälle erwies sich der Tumor als ein muzinöses Adenokarzinom und ein Tumor (0,9%) wurde als medulläres Karzinom identifiziert.

In der Beschreibung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen, dem Grading nach WHO-Definition (Details siehe Anhang) zeigte sich in 1,9% der Tumoren (n=2) ein Grading 1, in 65,7% (n=71) ein Grading 2, in 31,5% (n=34) ein Grading 3 und ein Tumor (0,9%) wies ein Grading 4 auf. Für die statistische Auswertung wurden Grading 1 und 2

sowie 3 und 4 zusammengefasst, was einer Verteilung von 67,6% (n=73) für Grading 1/2 und 32,4% (n=35) für Grading 3/4 entsprach.

Das Tumorstadium (T-Stadium) welches die Tumordinfiltration beschreibt (Details siehe Anhang) wurde mit T1 bei 2,8% (n=3) der Tumoren eruiert. T2 konnte bei 14,8% der Tumoren (n=16) ermittelt werden. T3 war mit 65,7% das häufigste Tumorstadium (n=71) und T4 konnte in 16,7% (n=19) aller Patienten nachgewiesen werden. Für die statistische Auswertung wurden die Gruppen T1/2 mit n=19 (17,6%) und T3/4 mit n=89 (82,4%) zusammengefasst.

Im N-Stadium für den Nachweis von Lymphknotenmetastasen im operativ entfernten Präparat ließ sich in 62,0% (n=67) keine Metastase eines Lymphknoten nachweisen. 1-3 perikolische/perirektale Lymphknotenmetastasen und damit Stadium N1 ließen sich in 24,1% (n=26) der Patienten nachweisen. Mehr als 3 Lymphknotenmetastasen, Stadium N2, zeigten sich bei 16,7% (n=18) aller untersuchten Resektate. Für die statistische Korrelation wurden Stadium N1 und N2 zusammengefasst, was einer Gruppe von n=44 und einem prozentualen Anteil von 40,8% entsprach.

Der klinische Nachweis von Metastasen und dem daraus abgeleiteten M-Stadium erfolgte mittels präoperativer Bildgebung, meist mittels Computertomographie (CT) und in ausgewählten Verdachtsfällen mittels Magnetresonanztomographie oder Positronenemissionstomographie kombiniert mit CT. Die intraoperativ vorgefundene Situation ergänzt das klinische Bild der Metastasierung. Hieraus wurde das klinische M-Stadium (cM) abgeleitet. Bei 86,1% der Patienten (n=93) war kein Hinweis auf eine Metastasierung, Stadium M0, vorhanden. Für 13,9% (n=15) lag zum Zeitpunkt der Operation eine histologisch oder rückblickend gesicherte Metastasierung, Stadium M1, vor.

Das aus dem TNM-Stadium abgeleitete UICC-Stadium[127] zeigte folgendes Verteilungsmuster: UICC I wiesen 17,6% (n=19), UICC IIA 33,3% (n=36) und UICC IIB 7,4% (n=8) auf. Ein Patient wurde in das UICC-Stadium IIIA eingruppiert (0,9%). UICC-Stadium IIIB war mit 19,4% (n=21) und IIIC mit 7,4% (n=8) repräsentiert. Zum UICC-Stadium IV zählten n=15 Patienten, was 13,9% am Gesamtkollektiv entsprach. Zur Erläuterung der Stadieneinteilung siehe Anhang. Zusätzlich zum TNM-Stadium wurden noch weitere Risikofaktoren von pathologischer Seite beurteilt:

Das L-Stadium oder auch Lymphangiosis carcinomatosa beschreibt den Tumorbefall von Lymphbahnen. Kein Befall, L0, konnte bei 71,4% (n=50) und Befall der Lymphgefäßspalten, L1, bei 28,6% (n=20) nachgewiesen werden.

Beim V-Stadium oder auch Veneninvasion genannt, wird der Tumor auf den Einbruch in zum Herzen führende Gefäße hin untersucht. Keine Veneninvasion, V0 zeigte sich bei 90% aller untersuchten Tumoren (n=63). Eine mikroskopische Veneninvasion, V1, zeig-

ten 10% (n=7). Der makroskopische Nachweis einer Veneninvasion, V2, wurde bei keinem der untersuchten Präparate erbracht.

Die Perineuralscheideninfiltration untersucht den Tumor auf Einwachsen in Nervengewebe, an dem entlang eine Tumorausbreitung stattfinden kann. So fand sich bei n=19 Patienten keine Infiltration, Pn0 (79,2%) und in n=5 fand eine Invasion der Perineuralscheiden (20,8%) statt.

Die im Vergleich zum Gesamtkollektiv geringere Fallzahl bei L-/V- und Pn-Stadium erklärt sich einerseits durch den langen Rekrutierungszeitraum der Patienten, da das pathologische Institut eine routinemäßige Untersuchung dieser Parameter erst nach Beginn des Beobachtungszeitraums einführte. Andererseits wird über den Pn-Status häufig keine Aussage getroffen, da er nicht immer standardmäßig untersucht wird.

Zusammenfassend lässt sich unserem Kollektiv an Primärtumoren ein durchschnittlich fortgeschrittenes Stadium konstatieren.

Die Tumormarker CEA (carcinoembryonic antigen) sowie CA (carbohydrate antigen) 19.9 wurden im Rahmen der präoperativen Vorbereitungen aus Patientenblut analysiert. Das CEA zeigte sich in 54,4% der analysierten Proben (n=56) im Normbereich (<3,4ng/ml) und in 45,6% (n=47) pathologisch (≥3,4ng/ml). CA 19-9 war in 83,1% der erhobenen Fälle (n=69) normwertig (<37,0 U/ml) und in 16,9% (n=14) pathologisch (≥37,0 U/ml). Die Abweichung in der Gesamtfallzahl erklärt sich aus den in den auswärtigen Zentren häufig standardmäßig nicht erhobenen Tumormarker CA 19-9, sowie einer gelegentlich auswärtig vom Hausarzt durchgeführten Analyse, welche bei Aktensichtung nicht eruiert werden konnte.

Hinsichtlich der Komplettheit der chirurgischen Intervention diente der Resektionsstatus der Operation, welcher für 87,0% (n=94) den Tumor makroskopisch und mikroskopisch entfernt, R0, ergab. Ein mikroskopisch nachweisbarer Tumorrest, R1, konnte in 2,8% der Fälle (n=3) nachgewiesen werden und ein makroskopisch sichtbarer Tumor, R2, blieb in 10,2% der Patienten (n=11) zurück. Die hohe Anzahl der R2-resizierten Patienten erklärt sich durch den Umstand, dass bei Diagnosestellung vorliegende Metastasen, welche in der Operation nicht entfernt wurden automatisch ein R2-Stadium generieren. Von den n=11 R2-operierten Patienten wurden n=9 lokal R0 rezidiert.

Die angewendeten Operationsverfahren für die Primärtumoren sind in Tabelle 11 aufgeführt. So wurde in n=33 (29,5%) Fällen eine Hemikolektomie rechts und in n=17 Fällen (15,2%) eine erweiterte Hemikolektomie rechts durchgeführt. In je einem Fall (0,9%) wurden eine Transversumresektion und eine subtotale Kolektomie durchgeführt. Eine Hemikolektomie links wurde bei n=9 Patienten (8,0%) durchgeführt, eine erweiterte Hemikolektomie links bei n=4 Patienten (3,6%). Bei den Sigma/Rektumkarzinomen wurden in n=28 Fällen (25,0%) eine anteriore Rektumresektion durchgeführt und bei n=12 Pati-

enten (10,7%) eine Sigmaresektion durchgeführt. Diese erfolgte entweder konventionell in offener Technik oder als laparoskopische Sigmaresektion. Zudem erhielten n=7 Patienten (6,3%) mit Rektumkarzinom eine tiefe anteriore Rektumresektion.

Keiner der Patienten in der Gruppe der Primärtumoren bekam eine präoperative Chemotherapie.

4.2.3.2 Lebermetastasen

Von den n=59 analysierten Lebermetastasen waren n=54 metachron, sowie n=5 synchron metastasiert.

62,7% der Patienten waren männlich (n=37) und 37,3% (n=22) weiblich mit einem Durchschnittsalter von 62,6 Jahren (40-79 Jahre) und einer Standardabweichung von 9,3 Jahren.

Der Body Mass Index lag im Durchschnitt bei 25,5 (18,3-33,2) bei einer Standardabweichung von 3,3.

Bei der im Rahmen der Operation erhobenen ASA-Klassifikation zur besseren Einschätzbarkeit des Gesundheitsstatus der Patienten war ein Patient ASA1 (1,7%). ASA2 war mit 69,5% (n=41) am häufigsten. ASA3 betraf 28,8% der Patienten (n=17). Patienten mit ASA 4-6 wurden nicht beobachtet.

Wenn man die Lokalisation des zur Metastasierung führenden Primärtumors betrachtet, waren 14,5% (n=8) der Tumoren im Zökum, 5,5% (n=3) im Kolon Ascendens, 7,3% (n=4) im Kolon Transversum (inkludiert rechte und linke Kolonflexur), 7,3% (n=4) im Kolon Descendens, 41,8% (n=23) im Sigma und 18,2% (n=10) im Rektum (> 10cm ab ano) gelegen. Zusätzlich lag bei n=2 Patienten (3,6%) ein Doppelkarzinom vor und bei n=4 (7,3%) war der im Kolon gelegene Tumor nicht genauer lokalisiert. Zusammengefasst ist bei 27,3% (n=15) der Patienten der Tumor im rechten Kolon (Zökum, Kolon Ascendens und Kolon Transversum) und 67,3% (n=37) der Tumoren im linken Kolon (Kolon Descendens, Sigma und Rektum >10cm ab ano) lokalisiert.

Hinsichtlich der histopathologischen Daten des Primärtumors der untersuchten Lebermetastasen ist bezüglich des UICC-Stadiums zu konstatieren, dass n=2 (3,4%) Stadium I, n=7 (11,9%) in Stadium IIA und 0% in IIB verteilt waren. Stadium IIIA ist mit n=3 (5,1) repräsentiert, IIIB mit n=9 (15,3%) und IIIC mit n=4 (6,8%) vertreten. Die überwiegende Mehrheit gehört Stadium IV mit n=34 (57,6%) Patienten an.

Hinsichtlich TNM im Primärtumor sind nur für das T-Stadium vollständige Daten verfügbar gewesen. Hier ist das Stadium T3 mit n=44 (74,6%) deutlich überrepräsentiert. T1 mit n=3 (5,1%), T2 mit n=5 (8,5%) und T4 mit n=7 (11,9%) waren deutlich seltener.

In Stadium N0 wurden zur Zeit der Diagnose n=25 (43,1%) der Patienten, in Stadium N1 n=22 (37,9%) und in N2 n=11 (19,0%) Patienten klassifiziert. Bei n=1 Patienten fehlte die Angabe zum Nodalstatus.

61,8% der Patienten (n=34), von denen valide Daten erhoben werden konnte, wiesen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose Fernmetastasen (M1) auf. Bei n=21 Patienten (38,2%) war dies noch nicht der Fall. Bei n=4 Patienten konnten keine genauen Daten eruiert werden

Hinsichtlich des Gradings wiesen die Primärtumoren der untersuchten Lebermetastasen in n=46 Fällen (80,7%) G2 und in 19,3% (n=11) G3 hinsichtlich des Differenzierungsgrades des Tumors auf. Es konnten jedoch bei n=2 Patienten keine genauen Daten hinsichtlich des Gradings eruiert werden.

Bei n=56 Patienten konnte die genaue Anzahl der Lebermetastasen eruiert werden. Es hatten zum Zeitpunkt der Operation 32,1% der Patienten (n=18) eine singuläre Metastase und 67,9% (n=38) wiesen mehrere oder multiple Metastasen (Anzahl der Metastasen >1) auf. Bei diesen Patienten konnte auch die Größe der Lebermetastase erhoben werden. Diese lag im Durchschnitt bei 3,93cm (0,9 – 16,0cm) bei einer Standardabweichung von 2,57. Bei multipler Metastasierung ging jeweils die größte Metastase in die Berechnung ein.

In der histologischen Klassifikation wurden 89,7% der Lebermetastasen (n=52) als Adenokarzinome identifiziert und 10,3% der Metastasen (n=6) waren muzinöse Adenokarzinome. Bei n=1 Metastase war eine histologische Einordnung nicht zu evaluieren.

Bei n=51 Patientenproben erfolgte die pathologische Einordnung in das Grading-System der WHO. Dabei waren 62,7% der Proben (n=32) Grading 2 und 29,4% (n=15) Grading 3. Bei n=4 Patienten war die Einordnung nicht eindeutig und es erfolgte ein Grading 2-3, welches jedoch zur statistischen Korrelation unter Grading 3 gelistet wurde. Daher ergab sich für Grading 3 ein prozentualer Anteil von 37,3% (n=19).

Die Tumormarker CEA (Carcinoembryonic Antigen) sowie CA (Carbohydrate Antigen) 19.9 wurden bei den lebermetastasierten Patienten präoperativ ebenfalls aus Patientenblut analysiert. Die Untersuchungen wurden ausschließlich vom Institut für klinische Chemie der LMU am Klinikum Großhadern durchgeführt. Der CEA-Wert war in 25% der analysierten Proben (n=14) normwertig (<3,4ng/ml) und in 75% (n=42) pathologisch (≥3,4ng/ml). CA 19-9 zeigte sich in 55,4% der erhobenen Fälle (n=31) normwertig (<37,0 U/ml) und in 44,6% (n=25) pathologisch (≥37,0 U/ml). Für einige Patienten konnten die Tumormarker-Werte nicht erhoben werden.

Der Resektionsstatus der Metastasen wurde ebenfalls erhoben. Hierbei zeigte sich bei 78,0% (n=46) R0, also kein Anhalt für einen nicht resizierten Tumorrest. Der Nachweis

eines mikroskopischen Tumorrest, R1, erfolgte in 11,9% der Fälle (n=7) und ein makroskopisch sichtbarer Tumor, R2, blieb in 10,2% der Patienten (n=6) zurück, was dem Umstand geschuldet ist, dass sich der Tumor intraoperativ als chirurgisch schwierig zu entfernen oder als nicht respektabel dargestellt hatte.

Der Fong Score (je ein Punkt für ein progressionsfreies Intervall weniger als 12 Monate, N-Stadium 1 oder 2 im Primärtumor, der präoperative lösliche CEA-Wert größer als 200ng/ml, die Metastasenzahl größer 1 und die Metastasengröße größer 5cm) konnte für n=51 Patienten erhoben werden. Hierbei zeigten n=4 (7,8%) einen Score von 0, n=13 (25,5%) einen Score von 1 und n=19 (37,3%) einen Score von 2, was zusammen n=36, also 70,6% der Patienten entsprach. Diese wurden wie Score 3 (n=12, entspricht 23,5%), Score 4 (n=3, entspricht 5,9%) und Score 5 (0 Patienten) zu zwei Gruppen zusammengefasst, welche in der statistischen Auswertung zur Anwendung kamen. Zusammengefasst entsprach Gruppe 2 (Fong Score 3,4,5) mit n=15 und 29,4% rund einem Drittel der erfassten Lebermetastasen.

Die bei den Leberresektionen verwendeten Operationsmethoden wurden ebenfalls erfasst. Am häufigsten wurde eine atypische Leberresektion bei n=21 Patienten (35,6%) durchgeführt, gefolgt von einer Lebersegmentresektion mit n=17 gesammelten Patientenproben (28,8%). N=16 Patienten (27,1%) unterzogen sich einer Hemihepatektomie rechts, n=2 Patienten (3,4%) einer erweiterten Hemihepatektomie rechts. Eine Hemihepatektomie links erhielten n=3 Patienten (5,1%), eine erweiterte Hemihepatektomie links hingegen wurde nicht durchgeführt.

Bei allen n=59 Patienten war es möglich, eine präoperative Therapie mit einem Chemotherapeutikum zu eruieren. Es wurden 71,2% der Patienten (n=42) präoperativ chemotherapiert. Bei n=17 Patienten (28,8%) wurde präoperativ keine Chemotherapie durchgeführt.

4.2.4 Patientenauswertung

Für die Auswertung der Patienten wurde nicht nur Tumorgewebe, sondern auch Mukosa-Proben zur Qualitätsicherung und internen Positivkontrolle analysiert. Bei keiner der Mukosaproben ließ sich weder im BRAF- noch im KRas-Gen eine Mutation detektieren.

4.2.4.1 BRAF

Für BRAF Exon 11 konnte weder bei den analysierten Primärtumoren, noch bei den Lebermetastasen eine Mutation gefunden werden.

In Exon 15 des BRAF Gens konnte bei den Primärtumoren in 86,1% (n=93) der Wildtyp festgestellt werden. 13,9% der analysierten Patientenproben (n=15) wiesen eine Mutation im BRAF Gen auf. Von den hier vorliegenden Mutationen handelte es sich ausschließlich

um die V600E – Mutation in Exon 15. Bei der Mutation wird die Aminosäure Valin an Position 600 des Genprodukts durch ein Basentriplett(T->A) ersetzt, welches für die Aminosäure Glutaminsäure kodiert (s. Abbildung 19)[128]. Unter den analysierten Lebermetastasen wies nur n=1 Metastase (1,7%) die V600E – Mutation auf, andere Mutationen wurden auch hier nicht beobachtet. Für die restlichen n=57 Metastasen wurde der Wildtyp festgestellt. Bei einer Metastasenprobe konnte die Mutationsanalyse sowohl für BRAf als auch für KRas nicht durchgeführt werden, da nicht genügend Gewebe zur Analyse vorlag.

Die Ergebnisse der Mutationsanalysen für das BRAf-Gen sind in Tabelle 11,12 dargestellt.

4.2.4.2 KRas

65,7% der Primärtumoren (n=71) wiesen den Wildtyp auf und bei 34,3% der Primaria-Proben (n=37) konnte eine Mutation im KRas-Gen festgestellt werden. Unter den analysierten Lebermetastasen wiesen 62,7% den Wildtyp (n=37) auf und in 37,3% der Fälle (n=21) bestand eine Mutation. Die detektierten Mutationen waren wie folgt verteilt (siehe Tabelle 13) und sind in Abbildung 17, 18 bildlich dargestellt.

Die G12S-Mutation bei welcher das Glycin in Codon 12 zu Serin umkodiert wird kam n=1 mal (2,7%) bei den Primärtumoren und n=2 (9,5%) mal bei den Lebermetastasen vor. Statt eines Glycin kodiert bei der G12R-Mutation ein Arginin für Codon 12. Sie kommt in unserem Kollektiv nur einmal (2,7%) unter den Primärtumoren vor. Bei der G12C-Mutation welche sich je 2x (5,4% bzw. 9,5%) in den Primärtumoren und in den Lebermetastasen nachweisen ließ, mutiert das für Glycin kodierende Codon 12 in eine für Cystein kodierende Basensequenz. Die häufigste Mutation sowohl unter den Primaria mit n=11 (29,7%), als auch unter den Lebermetastasen mit n=9 (42,9%) war die G12D-Mutation. Hier wird das für Glycin kodierende Codon 12 in Asparaginsäure mutiert. Unter den Primaria war die G12V-Mutation ebenfalls mit n=11 (29,7%) gleich häufig, bei den Lebermetastasen mit n=5 (23,8%) etwas niedriger repräsentiert. Hier entsteht statt dem Glycin in Codon 12 ein Valin in Position 12. Die G12A-Mutation ist mit n=2 (5,4%) nur bei den Primärtumoren vertreten. Aus dem Glycin in Position 12 wird in diesem Fall die Aminosäure Alanin.

Patient # 4095 wies eine Doppelmutation in Codon 12 auf. Um diese Mutation zu bestätigen, wurde die DNS des Patienten nach der Methode von Sanger et al. sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung bestätigte die Vermutung einer Doppelmutation und ist in Abb. 18 graphisch dargestellt. Bei der Doppel-Mutation auf Codon 12 handelt es sich um eine Mutation vom Typ: c.34G>T + c.36T>G – p.G12W (Tryptophan).

Auf Codon 13 konnten zwei verschiedene Mutationen detektiert werden. Die mit n=8 unter den Primärtumoren und n=2 unter den Lebermetastasen weitaus häufigere ist dabei

die G13D-Mutation. Hierbei ist die Basensequenz von Glycin im Codon 13 zu einer für Asparaginsäure kodierenden Sequenz mutiert. In der nur n=1 (4,8%) mal bei den Lebermetastasen vorkommenden G13C-Mutation ist aus dem für Glycin stehenden Basentriplett eines für Cystein entstanden.

Bei einem Primärtumor-Lebermetastasen-Paar (Patient # 3860) konnte im Primärtumor eine G12R-Mutation detektiert werden. In der Lebermetastase fand sich jedoch eine G13D-Mutation. In allen anderen Primärtumor-Metastasen-Pärchen fand sich dieselbe Merkmalsausprägung des Primarius auch in der korrespondierenden Lebermetastase.

So wie grundsätzlich eine KRas-Mutation bei BRAf-Mutation meist ausgeschlossen werden kann, ist das auch sowohl in unseren Zelllinien (s. Tabelle 10), sowie in den Patientenproben der Fall gewesen.

Bei 17 Patienten wurden seitens der Pathologie ebenfalls eine Analyse hinsichtlich einer Mutation im KRas Exon1 Codon 12/13 veranlasst. Bei allen Proben stimmte das Ergebnis der Pathologie mit den eigenen Ergebnissen überein.

Mutation	Primärtumoren		Lebermetastasen	
	Anzahl n	Prozent*	Anzahl n	Prozent*
G12S - Mutation	1	2.7%	2	9.5%
G12R - Mutation	1	2,7%	0	0.0%
G12C - Mutation	2	5.4%	2	9.5%
G12D - Mutation	11	29.7%	9	42.9%
G12A - Mutation	2	5,4%	0	0.0%
G12V - Mutation	11	29.7%	5	23.8%
G12W - Doppelmutation	1	2.7%	0	0.0%
G13D - Mutation	8	21.6%	2	9.5%
G13C - Mutation	0	0.0%	1	4.8%

Tab. 13: Häufigkeiten und Verteilung der detektierten Kras-Mutationen bei Primärtumoren und Lebermetastasen bezogen auf die Gesamtheit aller Kras-mutierten Patienten *gerundet auf eine Nachkommastelle

4.2.4.3 Graphische Darstellung KRas Mutationsanalyse

Mutation: Wildtyp	
Pyrosequenzierung (Ogino)	Pyrosequenzierung (Poehlmann)
Mutation: c.34G>A – p.G12S (Serin)	
Pyrosequenzierung (Ogino)	Pyrosequenzierung (Poehlmann)
Mutation: c.34G>C – p.G12R (Arginin)	
Pyrosequenzierung (Ogino)	Pyrosequenzierung (Poehlmann)
Mutation: c.34G>T – p.G12C (Cystein)	
Pyrosequenzierung (Ogino)	Pyrosequenzierung (Poehlmann)
Mutation: c.35G>A – p.G12D (Aspartat)	
Pyrosequenzierung (Ogino)	Pyrosequenzierung (Poehlmann)

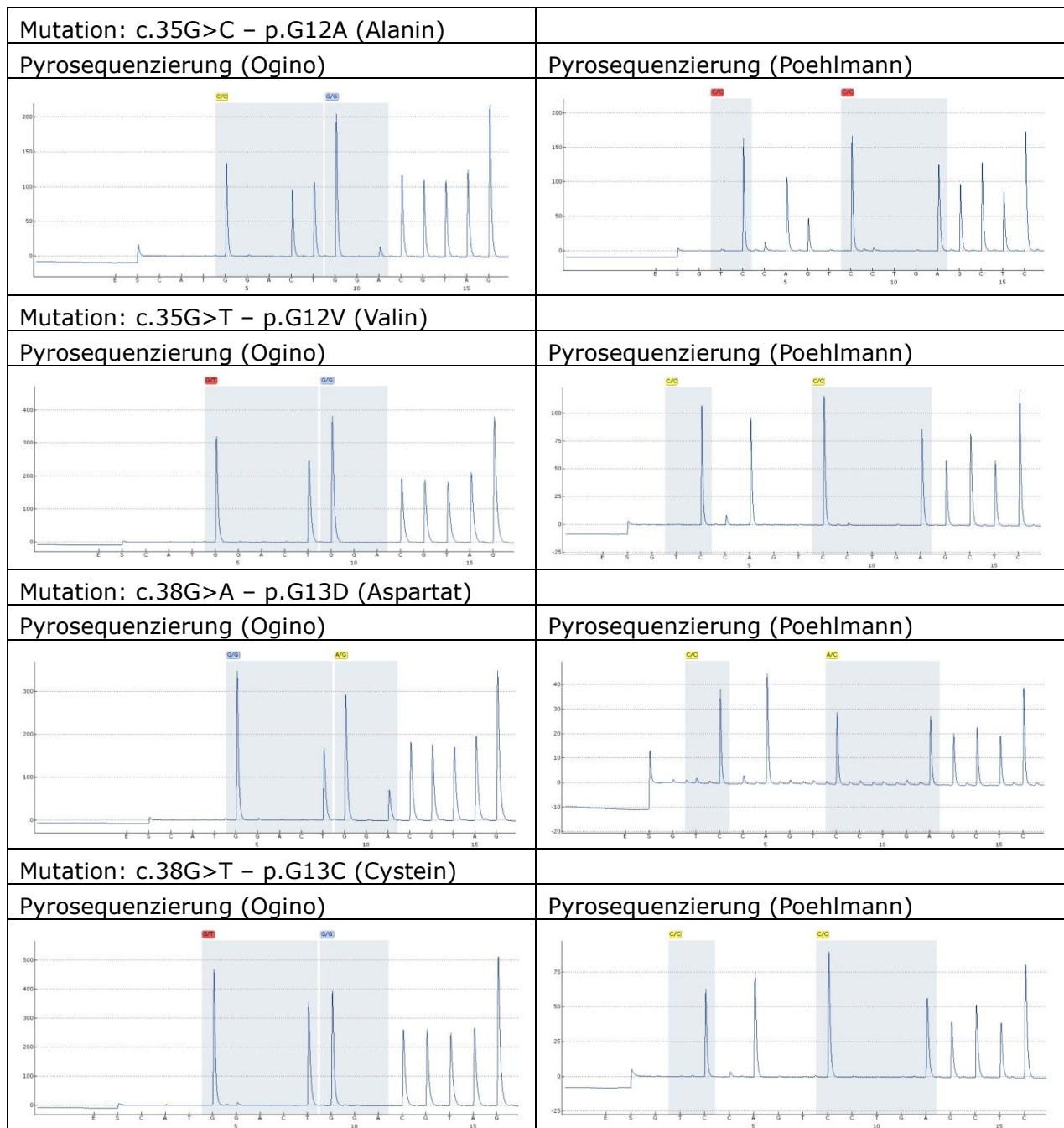


Abb. 17: Ergebnisse der Pyrosequenzierung KRas Exon 2 Codon 12/13

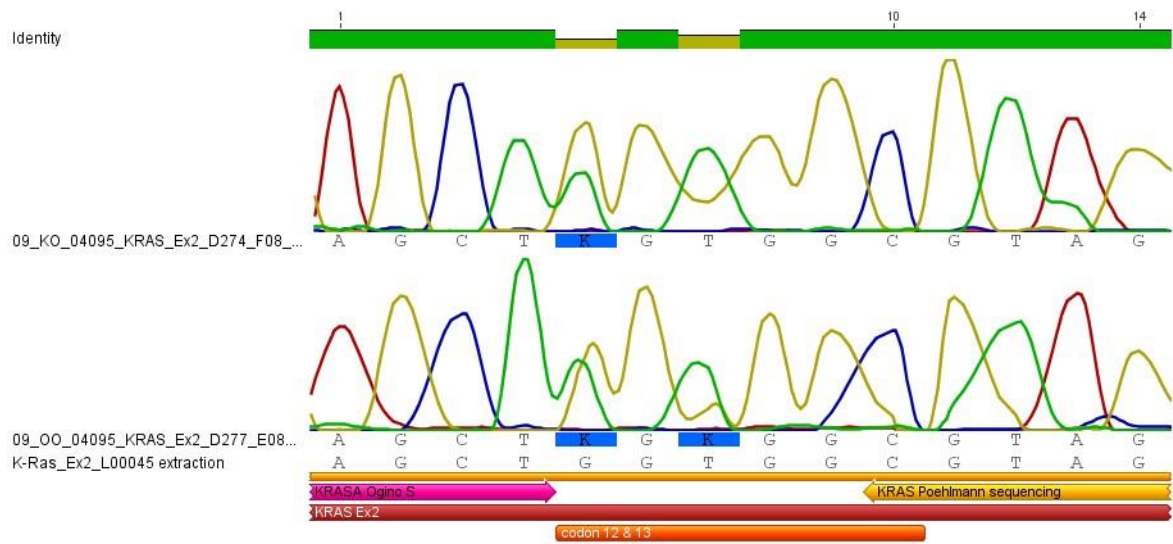


Abb. 18: Ergebnis der Sequenzierung von KRas Exon 2 Codon 12/13 von Pat # 4095 mit der Methode nach Sanger et al.[122]; Die Ergebnisse wurden zur Verfügung gestellt von AG Jung, Pathologisches Institut der LMU

4.2.4.4 Graphische Darstellung Pyrosequenzierung BRaf Mutationsanalyse

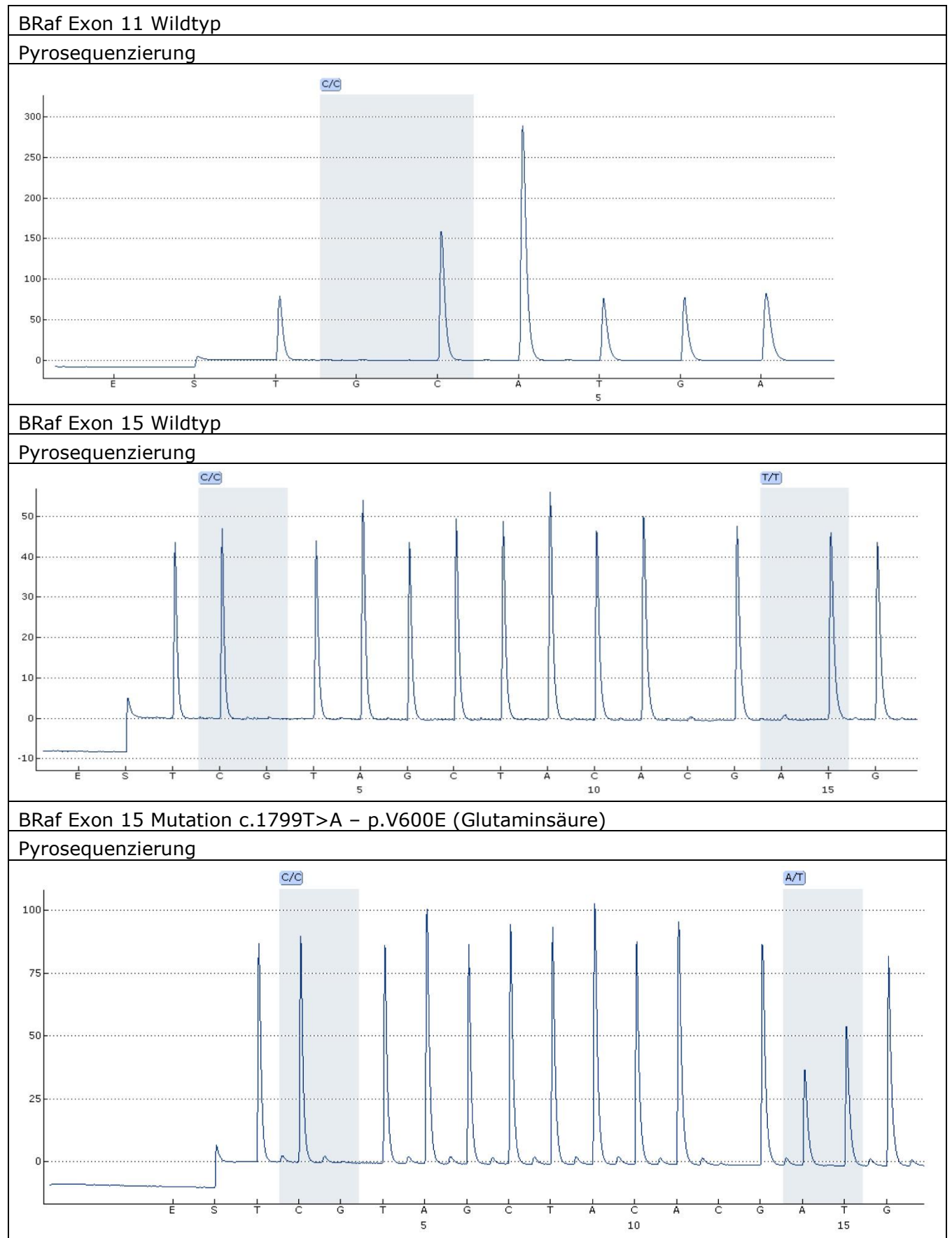


Abb. 19: Ergebnisse der Pyrosequenzierung BRaf Exon 11 + Exon 15

4.3 Statistische Auswertung

4.3.1 Univariate Analyse

4.3.1.1 Skalierung, Verteilung und Verbundenheit

Bevor mit der univariaten Analyse begonnen werden konnte, mussten alle Merkmale hinsichtlich ihrer Skalierung (verhältnisskaliert, ordinal- oder nominalskaliert), ihrer Prüfung auf Normalverteilung und auf Verbundenheit eingeordnet werden. Dies wurde wie bereits unter 3.2.14 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind im Anhang dargestellt.

4.3.1.2 Übersicht

Die univariate Analyse wurde unter Verwendung der in 3.2.14 beschriebenen Testverfahren durchgeführt (Details hierzu siehe Anhang). Allen Testverfahren wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zur Ablehnung der Nullhypothese zu Grunde gelegt. In der nachfolgenden Tabelle sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur signifikante Korrelationen und eindeutige Tendenzen angegeben. Eine Liste mit Testergebnissen $p > 0,05$ ist im Anhang zu finden.

Primärtumoren

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren#
KRas	Wt/Mut	L-Stadium	L0/L1	0,007	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	BRaf	Wt/mut	0,003	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,034	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Histologie	Adeno/muzinös	0,039	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	L-Stadium	L0/L1	0,038	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BRaf	Wt/mut	0,011	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/mut	Geschlecht	m/w	0,042	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/mut	ASA	1,2 vs 3,4	0,059	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/mut	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,003	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/mut	Grading	G1,G2 vs G3,G4	0,002	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Prozent*	---	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,031	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Prozent*	---	Grading Sw**	G1,G2 vs G3,G4	0,029	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Prozent*	---	L-Stadium	L0/L1	0,006	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Prozent*	---	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,021	Mann-Whitney-U-Test
HGF-R Prozent*	---	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,021	Mann-Whitney-U-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,027	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Alter	in Jahren	0,015	ANOVA
Her2/neu Prozent*	---	Geschlecht	m/w	0,01	Mann-Whitney-U-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Geschlecht	m/w	0,005	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0,1,2 vs 3	Geschlecht	m/w	0,009	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Prozent*	---	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,021	Mann-Whitney-U-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,030	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
Her2/neu Score	0,1,2 vs 3	Lokalisation Sw**	rechts/links	0,010	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Prozent*	---	CD45 Sw**	0,1,2 vs 3	0,032	Mann-Whitney-U-Test
Her2/neu Prozent*	---	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,006	Mann-Whitney-U-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,011	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Prozent	---	CD45 Sw**	0,1,2 vs 3	0,046	Mann-Whitney-U-Test
Lebermetastasen					
KRas	Wt/Mut	IGF1-R Prozent*	---	0,051	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Prozent*	---	Histologie	Adeno/muzinös	0,046	Mann-Whitney-U-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße Sw**	</≥ 5cm	0,044	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Prozent*	---	BMI (3 Gruppen)***	<18,5;...;>30	0,038	Mann-Whitney-U-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	BMI (3 Gruppen)***	<18,5;...;>30	0,022	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Prozent*	---	CA19-9 Sw**	Norm/path.	0,003	Mann-Whitney-U-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	CA19-9 Sw**	Norm/path.	0,015	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	EGF-R-Prozent*	---	0,004	Mann-Whitney-U-Test
Her2/neu Score	0,1,2 vs 3	Histologie	Adeno/muzinös	0,018	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Grading	1,2 vs 3,4	0,017	Chi-Quadrat-Test
Ki67 Prozent*	---	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,007	T-Test
HGF-R Prozent*	---	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,044	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Prozent*	---	0,007	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Prozent*	---	0,012	Mann-Whitney-U-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,004	Chi-Quadrat-Test

Tab. 14: Übersicht statistisch signifikanter Korrelationen bei Primärtumoren und Lebermetastasen. *) mit der Angabe Prozent sind die prozentual positiv gefärbten Tumorzellen mittels Rangbildung in die Berechnung eingegangen. **) der festgelegte Schwellenwert ist aus der Tabelle ersichtlich und in der Tabelle aus Platzgründen nur mit Sw abgekürzt. Weitere Informationen zu den Schwellenwerten sind im Anhang zu finden; ***) Der BMI wird in 3 Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 BMI <18,5; Gruppe 2 BMI 18,5-30; Gruppe 3 BMI >30 kg/m²; #) weiter Details zu den statistischen Testverfahren sind im Anhang zu finden (s. Kreuztabellen und Abbildungsverzeichnis)

4.3.1.3 Primärtumoren

Die BRAF V600E-Mutation korreliert mit dem weiblichen Geschlecht (p=0,042). Zudem konnte ein Zusammenhang mit p=0,003 zwischen V600E und einer Lokalisation der Primärtumoren im rechten Kolon nachgewiesen werden. Die BRAF-Mutation erwies sich mit p=0,002 signifikant korrelierend mit dem Auftreten von entdifferenzierten Tumoren im Grading G3 und G4.

Eine weitere statistisch eindeutige Korrelation mit p=0,003 bestand zwischen KRas und BRAF. So gab es unter der Gruppe von KRas mutierten keine BRAF mutierten Patienten und umgekehrt. Des Weiteren ist in der Gruppe der KRas-mutierten Patienten keiner mit einer Lymphangiosis carcinomatosa (p=0,007 bzw. p=0,038) zu finden. Wenn man aus

der Gruppe der KRas-mutierten Patienten die G13D-Mutation zum Wildtyp addiert, wiesen die Gruppe der restlichen KRas-mutierten Patienten überdurchschnittlich häufig ein muzinöses Adenokarzinom auf ($p=0,039$). Zudem stellte sich bei den KRas Wildtyp Patienten überdurchschnittlich häufig eine Überexpression von IGF1-R dar ($p=0,034$). Sowohl für BRaf als auch für KRas wurden alle Ergebnisse mit dem korrigierten, zweiseitigen Chi²-Test ermittelt.

Der EGF-Rezeptor war vor allem im rechten Kolon häufig überexprimiert ($p=0,031$) und auch in der Gruppe der Patienten mit Lymphangiosis carcinomatosa wurde EGF-R deutlich häufiger hochreguliert ($p=0,006$). Es zeigte sich, dass Patienten mit einem Grading G3 und G4 überdurchschnittlich häufig eine hohe EGF-Rezeptordichte auf der Zellmembran aufwiesen ($p=0,029$). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei hoher Expression von CD44v6 an der Zellmembran, ebenfalls eine hohe EGF-Rezeptordichte vorlag ($p=0,021$). Für die Berechnungen mit EGF-R wurde ausschließlich der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Der IGF1-Rezeptor war in den Patienten mit Tumoren im linken Kolon deutlich überrepräsentiert ($p=0,027$), genauso wie Her2/neu-positive Patienten häufiger im linken Kolon auftraten ($p=0,030$). Diese Patienten mit positivem Her2/neu-Rezeptorstatus waren überdies meist weiblichen Geschlechts ($p=0,005$). Diese Korrelationen, sowie die Korrelation zwischen hoher HLA-DR Expression bei Her2/neu-negativen Patienten ($p=0,011$), konnten mittels des korrigierten, zweiseitigen Chi²-Tests dargestellt werden. Zudem konnte für das weibliche Geschlecht ($p=0,009$) und die Lokalisation im linken Kolon ($p=0,010$) mit dem Her2/neu-Score ebenfalls eine Korrelation mittels Chi² nachgewiesen werden. Die Signifikanz ($p=0,032$) zwischen Her2/neu-positiven Patienten und einer niedrigen CD45 Expression (Intensität von 0,1 oder 2) wurde durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet. Ebenso die hohe Co-Expression von HGF-R bei hoch positivem IGF-Rezeptorstatus ($p=0,021$). Es konnte mittels der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) eine Korrelation des Alters mit dem Ki-67 Proliferationsindex errechnet werden ($p=0,015$).

	Ki-67 Index	EGF-R >50%	IGF1-R >80%	Her2/neu positiv/Score	BRaf15 V600E	KRas Wildtyp	KRas mutiert ohne G13D
Geschlecht	n.s.	n.s.	n.s.	0,005;0,009(C)	0,042(C)	n.s.	n.s.
Alter	0,015(A)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lokalisation	n.s.	0,031(M) rechtes Kolon	0,027(C) linkes Kolon	0,030; 0,010(C) linkes Kolon	0,003(C) rechtes Kolon	n.s.	n.s.

	Ki-67 Index	EGF-R >50%	IGF1-R >80%	Her2/neu positiv/Score	BRaf15 V600E	KRas Wildtyp	KRas mutiert ohne G13D
Histologie muzinös	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,039 (C)
L0	n.s.	0,006(M)	n.s.	n.s.	n.s.	0,007(C)	0,038(C)
Grading G3/4	n.s.	0,029(M)	n.s.	n.s.	0,002(C)	n.s.	n.s.
HLA-DR positiv	n.s.	n.s.	n.s.	0,011(C)	n.s.	n.s.	n.s.
CD44v6 >50%	n.s.	0,021(M)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CD45 0/1/2	n.s.	n.s.	n.s.	0,032(M)	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 15: univariate signifikante Korrelation von Ki67, EGF-R, IGF-R, HGF-R, BRaf15 und KRas bei Primärtumoren; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test, A=einfache Varianzanalyse (ANOVA). Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die nicht signifikanten Ergebnisse in der Tabelle mit n.s. angegeben. Sie finden sich im Anhang.

	IGF1-R >80%	HGF-R >80%	BRaf15 V600E	KRas Wildtyp
IGF1-R >80%	---	0,021 (M)	n.s.	0,034 (C)
HGF-R >80%	0,021 (M)	---	n.s.	n.s.
BRaf15 V600E	n.s.	n.s.	---	0,003 (C)
KRas Wildtyp	0,034 (C)	n.s.	0,003 (C)	---

Tab. 16: weitere univariate signifikante Korrelation bei Primärtumoren; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die nicht signifikanten Ergebnisse in der Tabelle mit n.s. angegeben. Sie finden sich im Anhang.

4.3.1.4 Lebermetastasen

Die bereits bei den Primärtumoren festgestellte Korrelation zwischen dem KRas Wildtyp und einer hohen IGF1-Rezeptor Expression verfehlte bei den Lebermetastasen das Signifikanzniveau ($p=0,051$) knapp. Testverfahren der Wahl war hierbei der Mann-Whitney-U-Test. Dieser kam auch bei der Korrelation zwischen einem hohen EGF-Rezeptorstatus und den histologisch muzinösen Adenokarzinomen ($p=0,046$) zum Einsatz. Zudem beschreibt er, dass bei hoher EGF-Rezeptordichte auf den Zellmembranen der Tumoren auch der HGF-Rezeptor hochreguliert ist ($p=0,007$). Bei einer hohen EGF-Rezeptorexpression ist auch der IGF1-R hoch exprimiert ($p=0,004$), berechnet mit dem Chi²-Test. Der HGF-R war zudem in der Gruppe der CD44v6 hoch positiven Patienten überrepräsentiert ($p=0,044$). Der Korrelation wurde der Mann-Whitney-U-Test zu Grunde gelegt. Wenn CD44v6 mit mehr als 50% positiven Zellen definiert wurde, wurde gleichzeitig ein hoher Ki67 Proliferationsindex detektiert ($p=0,007$). Wenn der lösliche Tumormarker CA19.9 pathologisch war, zeigten diese Patienten zudem häufig eine hohe HGF-R-Expression mit mehr als 80% positiven Tumorzellen. Dies konnte mit einem zweiseitigen T-Test nachgewiesen werden. Der korrigierte, zweiseitige Chi²-Test errechnete zwischen dem KRas-mutierten Patientenkollektiv und einer Metastasengröße kleiner als der Median eine Signifikanz von $p=0,046$. Zusätzlich wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem hohen BMI ($>30 \text{ kg/m}^2$), welcher in 3 Gruppen ($<18,5$; $18,5-30$; $\geq 30 \text{ kg/m}^2$) eingeteilt wurde und dem prozentual gerechneten Wert von HLA-DR mit $p=0,038$ abgebildet. Für den Schwellenwert im Chi²-Test ergab sich mit $p=0,022$ eine ebenfalls signifikante Korrelation. Hier zeigten alle Patienten mit einem BMI von $>30 \text{ kg/m}^2$ keine Expression von HLA-DR. Für den erhöhten Ki-67 Labeling-Index und dem fortgeschrittenen Grading ($p=0,017$) sowie für den Her2/neu-Score und der Histologie ($p=0,018$) fand sich im Chi²-Test ebenfalls ein Zusammenhang. Hier kam die Signifikanz durch einen erhöhten Her2/neu-Score ausschließlich bei den Adenokarzinomen zustande.

	Ki-67 hoch	Her2/neu Score3	EGF-R >50%	HGF-R >80%	HLA-DR 0%	CD44v6 >50%
Metastasengröße <5cm	n.s.	n.s.	n.s.	0,044(C)	n.s.	n.s.
BMI >30 kg/m²	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,044(K) 0,022(C)	n.s.
Grading 3/4	0,017(C)					
Histologie		0,018(C) Adeno	0,046(M) muzinös	n.s.	n.s.	n.s.

	Ki-67 hoch	Her2/neu Score3	EGF-R >50%	HGF-R >80%	HLA-DR 0%	CD44v6 >50%
CD44v6 >50%	n.s.	n.s.	n.s.	0,044(M)	n.s.	---
Ki67 hoch	---	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,007(T)
CA19.9 (löslich) pathologisch	n.s.	n.s.	n.s.	0,015(C)	n.s.	n.s.
Fong Score (3,4,5)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,072(C)

Tab. 17: univariate signifikante Korrelationen bei Lebermetastasen; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test, K=Kruskal-Wallis-Test. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die nicht signifikanten Ergebnisse in der Tabelle mit n.s. angegeben. Sie finden sich im Anhang.

	EGF-R >50%	IGF1-R >80%	HGF-R >80%	KRas Wildtyp
EGF-R >50%	---	0,004 (C)	0,007 (M)	n.s.
IGF1-R >80%	0,004 (C)	---	n.s.	0,051 (M)
HGF-R >80%	0,007 (M)	n.s.	---	n.s.
KRas Wildtyp	n.s.	0,051 (M)	n.s.	---

Tab. 18: univariate signifikante Korrelation zwischen EGF-R, IGF-R, HGF-R und KRas bei Lebermetastasen; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test, T=zweiseitiger T-Test. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die nicht signifikanten Ergebnisse in der Tabelle mit n.s. angegeben. Sie finden sich im Anhang.

Da in der Darstellung des Mann-Whitney-U-Testes keine Vierfeldertafel mit der Verteilung der Ränge vorliegen kann wie beim Chi-Quadrat-Test, wurde das Ergebnis daher bei diesen Tests wie in Abbildung 40-58 ersichtlich, graphisch dargestellt (siehe Anhang).

4.3.2 Überleben

4.3.2.1 Kaplan-Meier-Kurven Primärtumoren

Um das Überleben der Patienten mit Primärtumor und Lebermetastasen in Abhängigkeit von einzelnen Merkmalen abzubilden, wurden aus den Nachsorgedaten mittels SPSS Kaplan-Meier-Kurven erstellt und der Log Rank (Mantel Cox) als Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen mit abgebildet. Zunächst musste das Ereignis „Tod“ definiert und die Zeitspanne vom Operationstermin bis zum Eintreten des Ereignisses bzw. bis zur Zensur errechnet werden. Unter Zensur fielen alle Patienten, welche nicht weiter nachverfolgt werden konnten oder deren Nachsorge nicht eruiert werden konnte. Zusätzlich zum Gesamtüberleben wurden für das tumorspezifische Überleben alle Patienten, deren Tod nicht auf den Tumor zurückzuführen oder nicht zu eruieren war ebenfalls zensiert. Für Primärtumoren waren somit drei Patienten mehr zensiert um das tumorspezifische Überleben zu berechnen im Vergleich zum Gesamtüberleben. Hieraus ergaben sich die in Abbildung 20-29 dargestellten Überlebenskurven. In Tabelle 19 sind die signifikanten Merkmale mit zugehörigen Signifikanzen dargestellt. Zudem ist das Grading mit einem p-Wert von 0,056 als Tendenz für das Gesamtüberleben mit aufgeführt. Alle Merkmale, die bei der Auswertung auf Signifikanzen $p > 0,1$ kamen, werden aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht erwähnt, sind aber im Anhang aufgeführt.

Es finden sich überwiegend Merkmale mit einem statistischen Zusammenhang im Überleben der Primärtumoren bei klinisch-pathologischen Merkmalen. Für die TNM-Klassifikation ist der nodale Status (N0 vs. N1/2) und die Metastasierung (M0 vs M1) mit $p < 0,001$ hoch signifikant. Ebenfalls hoch signifikant mit $p < 0,001$ stellen sich das UICC-Stadium (1/2 vs. 3/4), die Lymphgefäßinvasion (L0 vs. L1) und die Gefäßinvasion (V0 vs. V1) dar. Die Perineuralscheideninfiltration erreicht ebenfalls mit $p = 0,001$ ein hohes Signifikanzniveau, jedoch ist hier die ebenso wie bei L- und V-Stadium die wesentlich geringere Fallzahl aufgrund unvollständiger Patientendaten zu beachten. Die präoperativ im Blut erhobenen Tumormarker CEA und CA-19.9 waren mit $p < 0,001$ ebenfalls hoch signifikant. Dies stellte sich sowohl im Gesamtüberleben, als auch im tumorspezifischen Überleben gleich dar.

Unter den immunhistochemischen und molekularbiologischen Merkmalen der Primaria erwies sich nur der EGF-Rezeptor mit $p = 0,049$ als signifikant für das Gesamtüberleben. So hatten Patienten mit hoher Rezeptorexpression an der Zelloberfläche der Tumoren eine signifikant geringere Überlebenschance. Allerdings konnte dieser Zusammenhang im tumorspezifischen Überleben nicht erreicht werden.

Merkmal mit Gruppenbildung	Signifikanz des Log-Rank (Mantel Cox)	
	Gesamtüberleben	Tumorsp. Überleben
Grading G1/2 vs. G3/4*	p=0,056	p=0,121
pN - Stadium N0 vs. N1/2	p=0,000	p=0,001
cM - Stadium M0 vs. M1	p<0,001	p<0,001
UICC - Stadium UICCI/II vs. III/IV	p<0,001	p<0,001
L - Stadium L0 vs. L1	p<0,001	p<0,001
V - Stadium V0 vs. V1	p<0,001	p<0,001
Pn - Stadium Pn0 vs. Pn1	p=0,001	p=0,001
CEA präoperativ Norm vs. pathologisch	p<0,001	p<0,001
CA 19-9 präoperativ Norm vs. pathologisch	p<0,001	p<0,001
Resektionsstatus (R) R0 vs. R1/2	p<0,001	p<0,001
EGF-R ≤50% pos. Tumorzellen vs. >50%	p=0,049	p=0,076

Tab. 19: Übersicht signifikanter Merkmale im Kaplan-Meier-Schätzer bei Primärtumoren; Signifikanzniveau $p < 0,05$; Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben *) Für Grading wird eine Tendenz gezeigt.

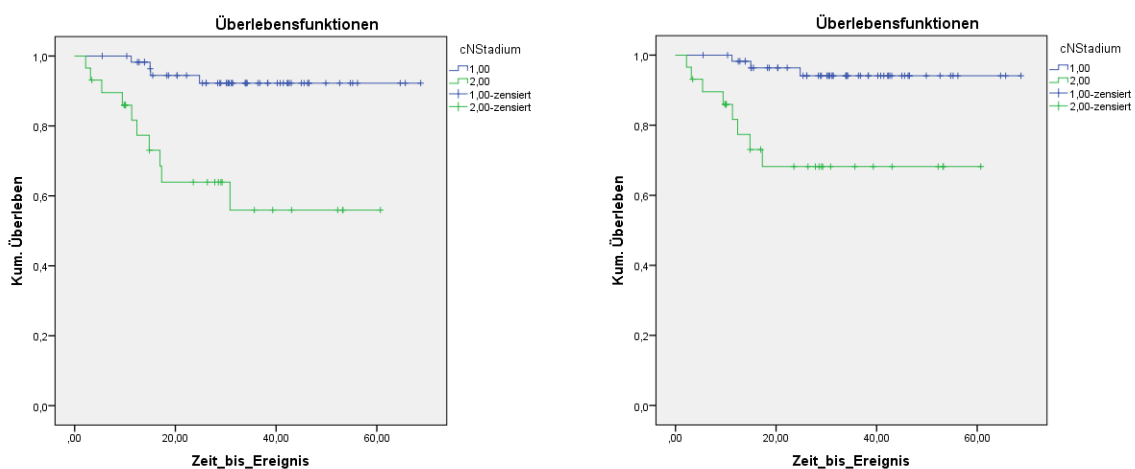


Abb. 20: Kaplan-Meier-Kurven für N-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

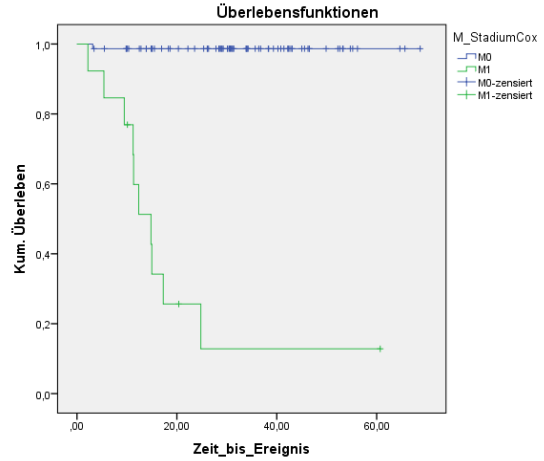
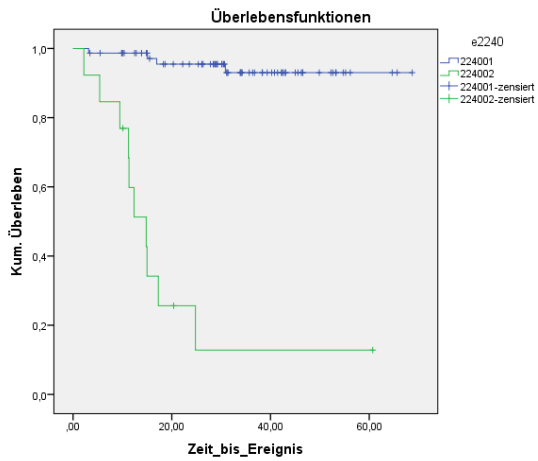


Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurven für M-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

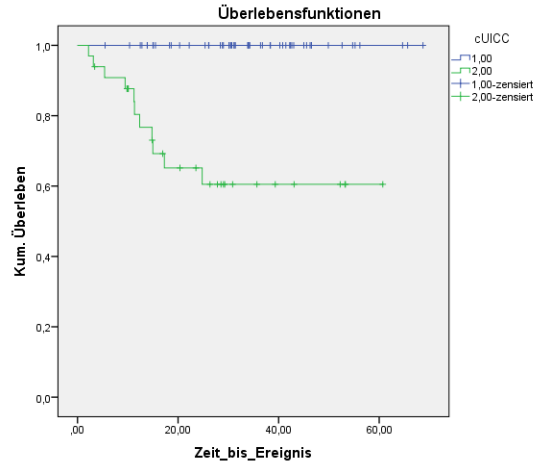
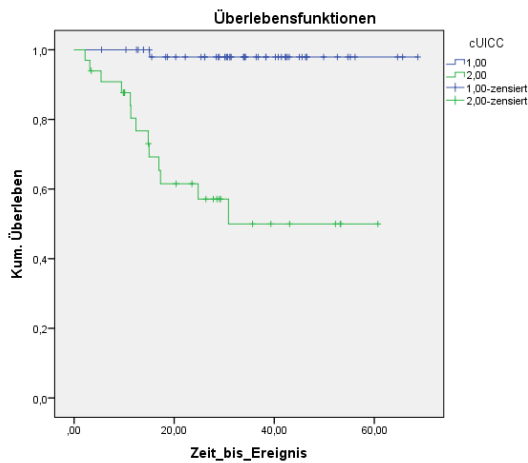


Abb. 22: Kaplan-Meier-Kurven für UICC-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

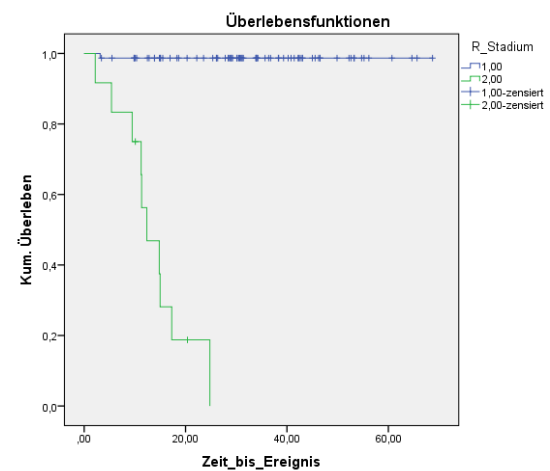
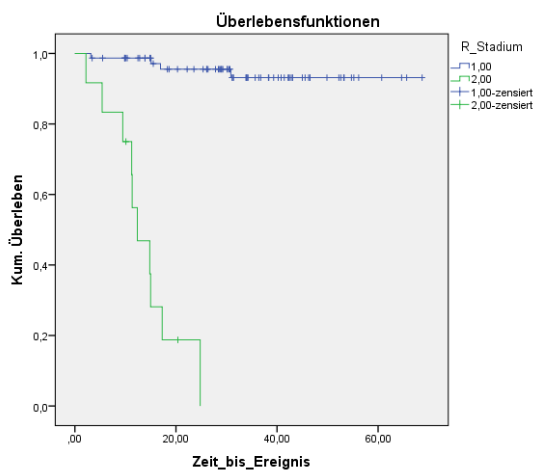


Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurven für Resektionsstadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

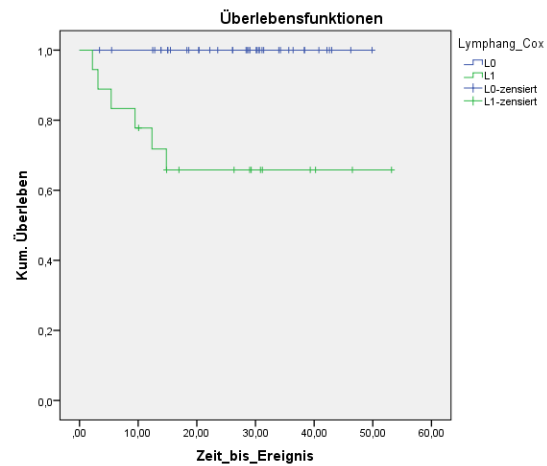
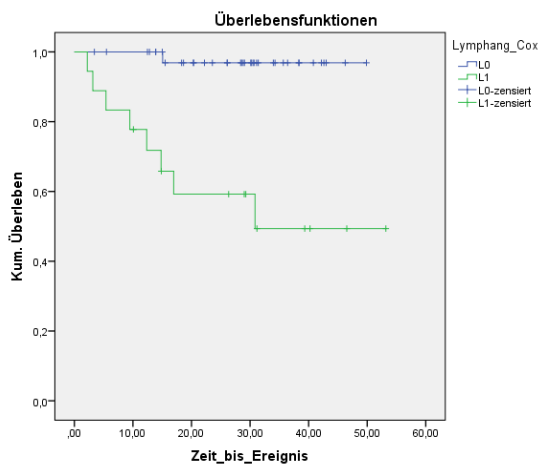


Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurven für Lymphgefäßinvasion im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

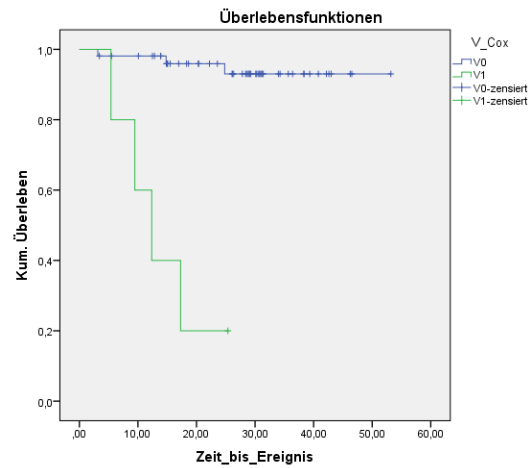
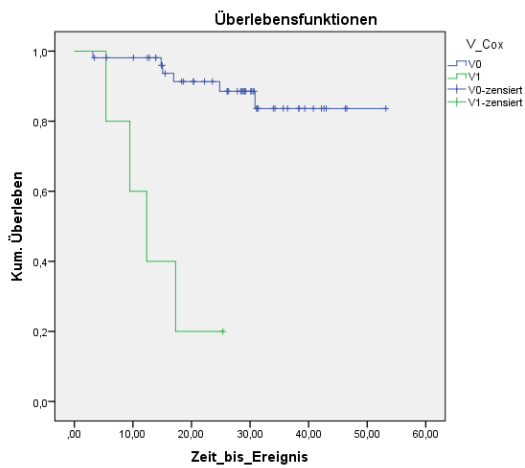


Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurven für Gefäßinvasion (V) im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

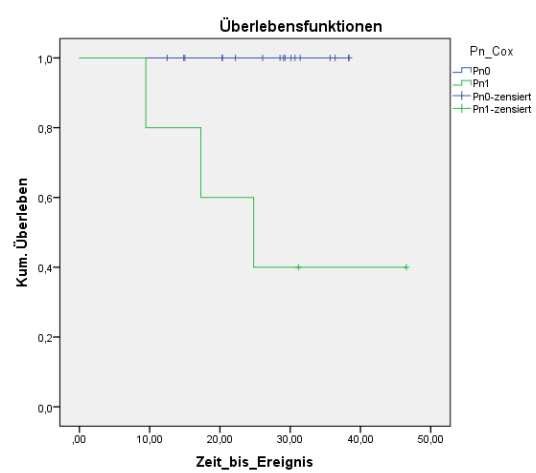
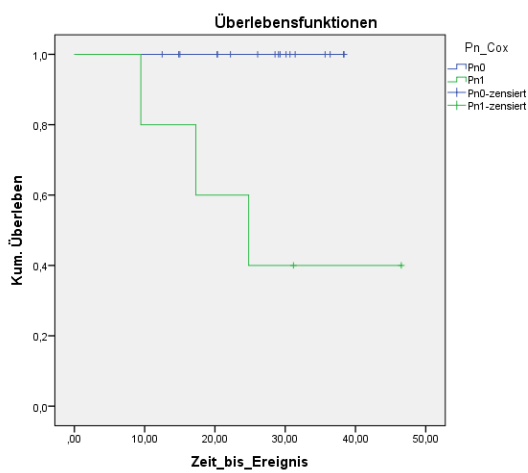


Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurven für Perineuralscheideninfiltration (Pn) im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

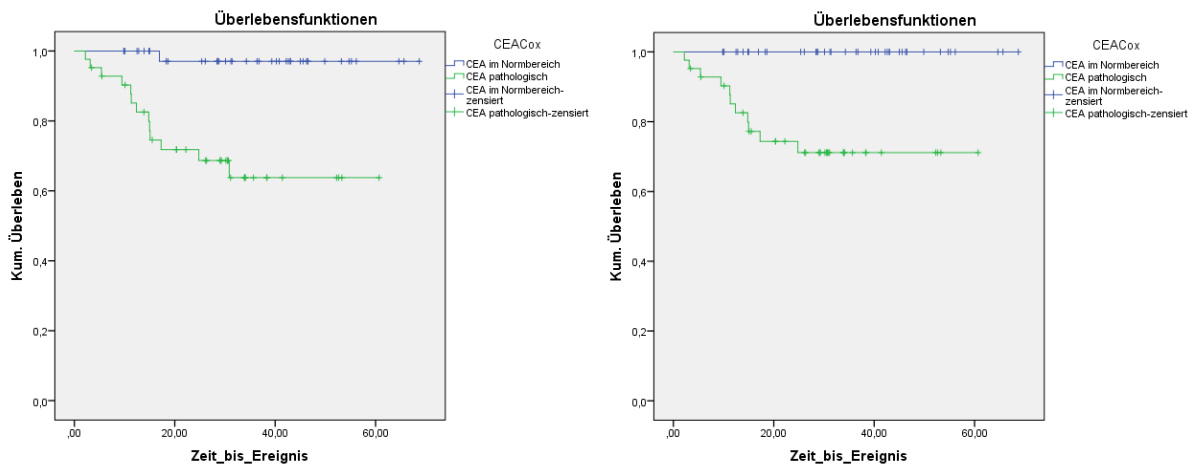


Abb. 27: Kaplan-Meier-Kurven für CEA präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

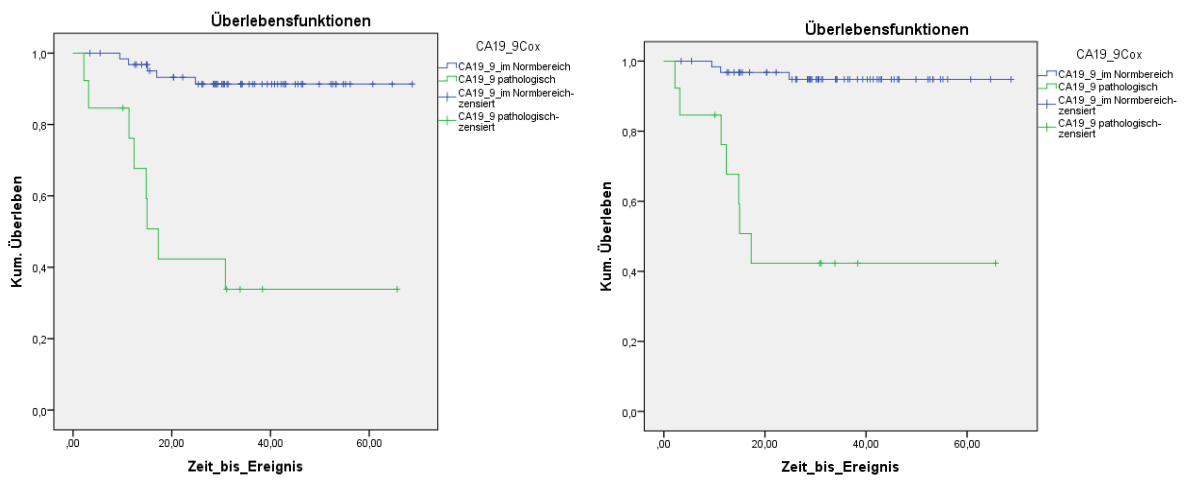


Abb. 28: Kaplan-Meier-Kurven für CA19-9 präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

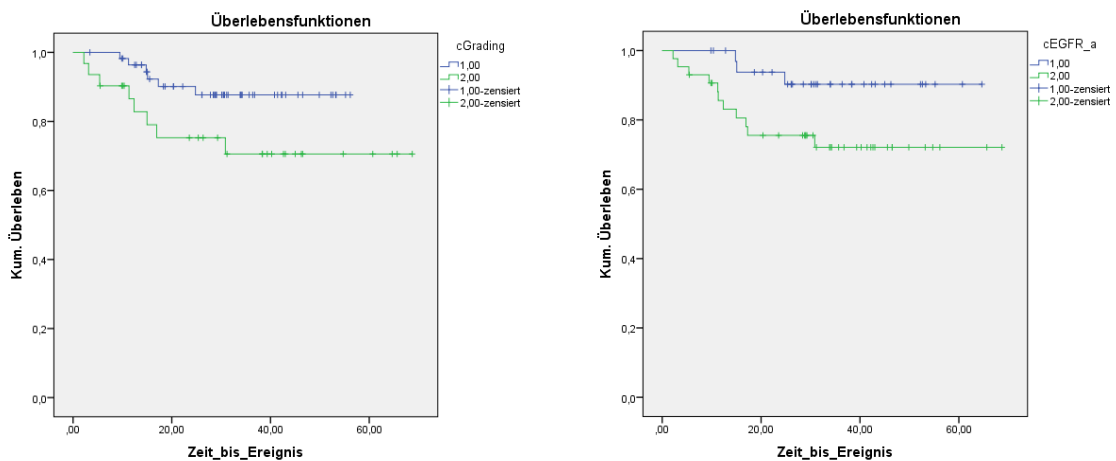


Abb. 29: Kaplan-Meier-Kurve für Grading (r) und EGF-R cutoff (li) im Gesamtüberleben

4.3.2.2 Kaplan-Meier-Kurven Lebermetastasen

Für die Erhebung statistisch relevanter Merkmale hinsichtlich des Überlebens der analysierten lebermetastasierten Patienten wurden zur besseren Vergleichbarkeit nur diejenigen verwendet, welche einen primären leberchirurgischen Eingriff erhielten (n=45). Alle Zweit-, Dritt- oder weitere Folgeeingriffe sind nicht in die Analyse eingeflossen. Zusätzlich wurde analog zu den Primaria eine Differenzierung zwischen Gesamtüberleben und tumorspezifischem Überleben vorgenommen. Hierzu mussten drei Patienten deren Tod nicht eindeutig auf den Tumor zurückzuführen war, zensiert werden. Es erwiesen sich die Metastasengröße über 5cm mit $p=0,017$, das Grading der Lebermetastasen ($p=0,036$), sowie das Resektionsstadium der Lebermetastasen ($p=0,019$) als signifikante klinisch-pathologische Merkmale für das Gesamtüberleben. Unter den Biomarkern konnte nur für CD44v6 ($p=0,004$) und den Her2/neu-Score ($p=0,048$) ein statistischer Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Bei der Berechnung des tumorspezifischen Überlebens erwiesen sich zusätzlich zu den genannten Parametern Metastasengröße ($p=0,014$), R-Stadium ($p=0,002$), CD44v6 ($p=0,004$) und Her2/neu-Score cutoff ($p=0,014$) auch der Her2/neu-Score (0,027) und der Her2/neu cutoff der prozentual gefärbten Tumorzellen ($p=0,027$) als signifikant (s. Tabelle 20 und Abbildung 30-36). Darüberhinaus konnte ein Einfluss auf das tumorspezifische Überleben für den Fong Score ($p=0,050$) und das Grading des initialen Primärtumors ($p=0,030$) nachgewiesen werden.

Merkmal mit Gruppenbildung	Signifikanz des Log-Rank (Mantel Cox)	
	Gesamtüberleben	Tumors. Überleben
Fong Score (0 vs 1 vs 2 vs 3 vs 4 vs 5)	P=0,152	p=0,050
Grading Primarius (Grading 1/2 vs 3/4)	P=0,102	p=0,030
Metastasengröße <5cm vs >5cm	P=0,017	p=0,014
Grading Lebermetastasen G1/2 vs G3/4	P=0,036	p=0,061
R-Stadium Lebermetastasen R0 vs R1 vs R2	P=0,019	p=0,002
CD44v6 cutoff (Details siehe Anhang)	P=0,004	p=0,004
Her2/neu negative Tumorzellen vs. positiv	P=0,123	p=0,027
Her2/neu-Score 0 vs 1 vs 2 vs 3	P=0,138	p=0,027
Her2/neu-Score cutoff (Details s. Anhang)	P=0,048	p=0,014

Tab. 20: Übersicht signifikanter Merkmale im Kaplan-Meier-Schätzer bei Lebermetastasen; Signifikanzniveau $p < 0,05$; Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben

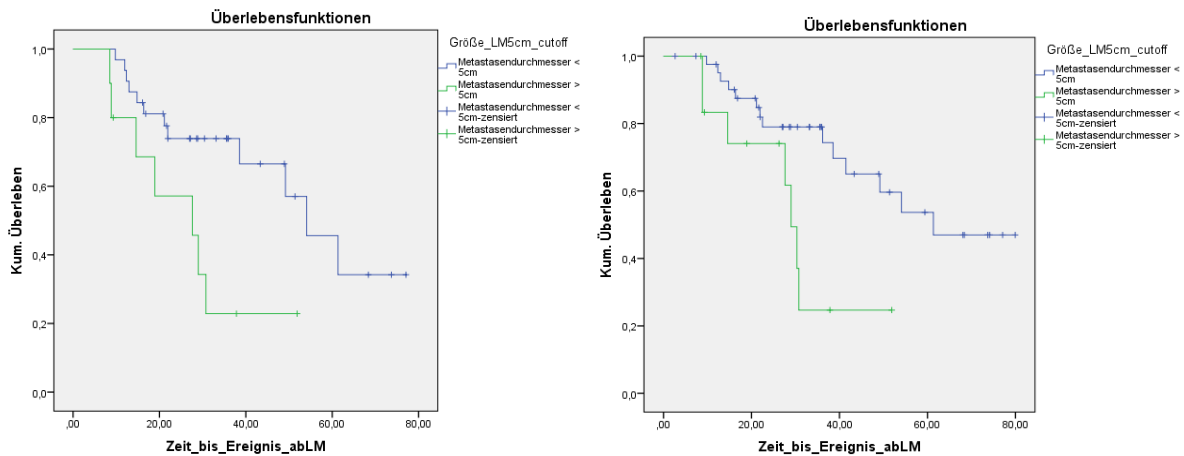


Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurven für die Lebermetastasenengröße bei einem cutoff von 5cm im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

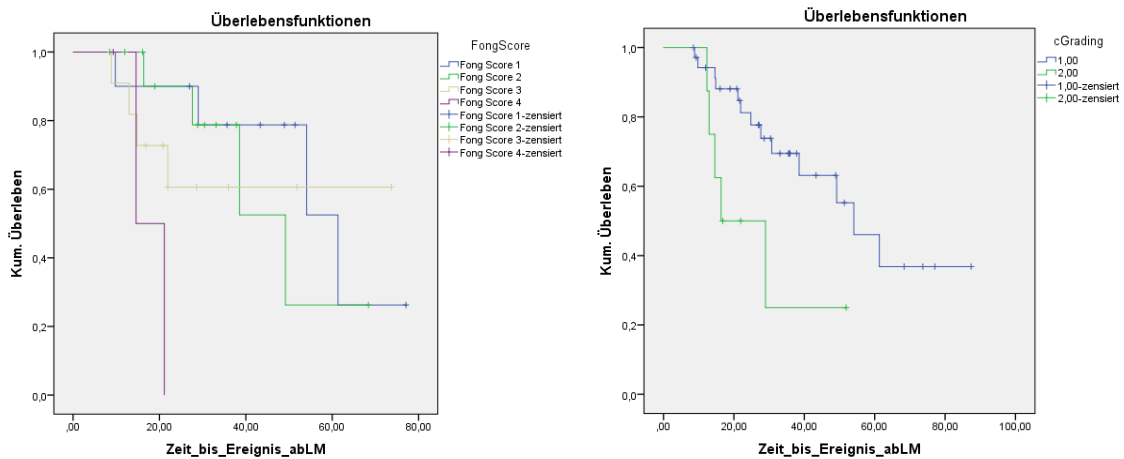


Abb. 31: Kaplan-Meier-Kurven für Fong-Score (r) und Grading Primärtumoren (li) im tumorsp. Überleben

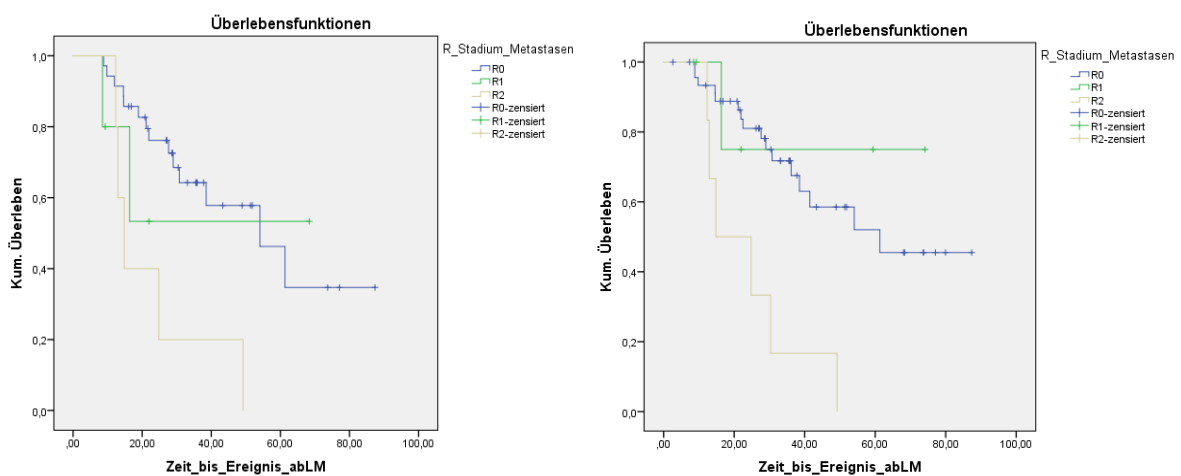


Abb. 32: Kaplan-Meier-Kurven für Resektionsstadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

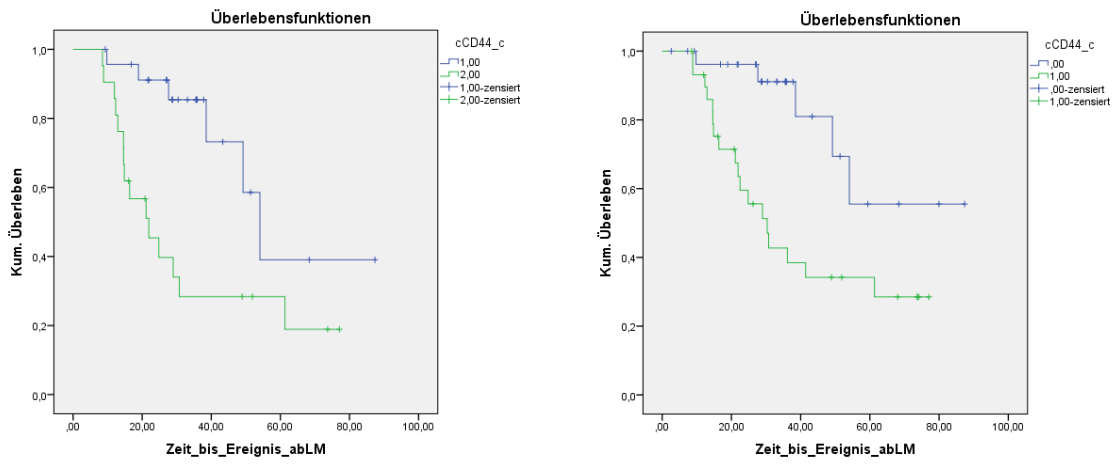


Abb. 33: Kaplan-Meier-Kurven für CD44 cutoff im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

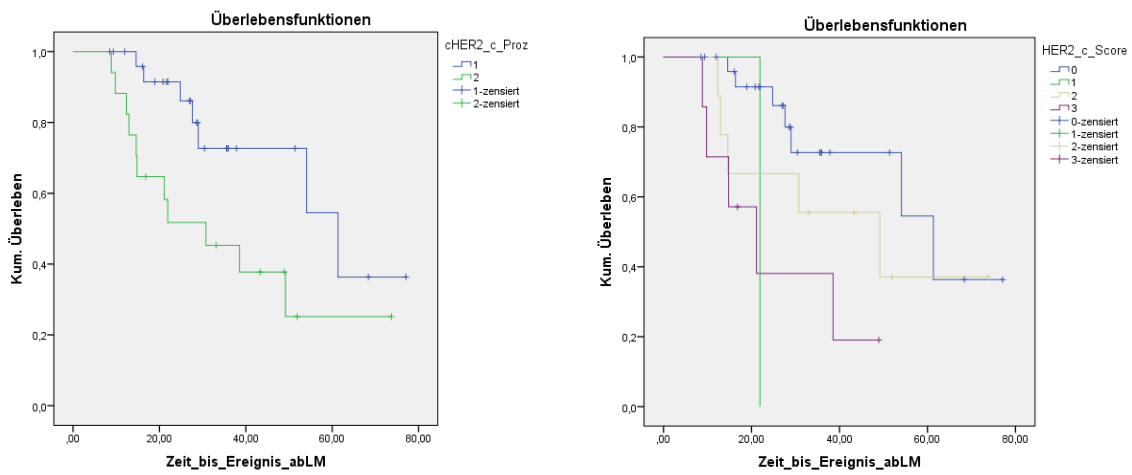


Abb. 34: Kaplan-Meier-Kurven für Her2/neu Prozent (r) cutoff und Her2/neu-Score (li) im tumorsp. Überleben

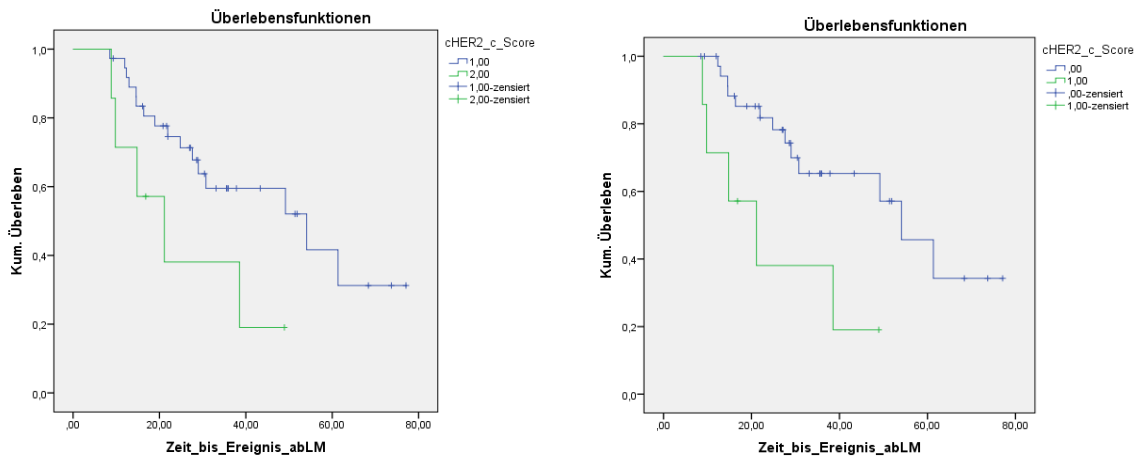


Abb. 35: Kaplan-Meier-Kurven für Her2/neu-Score cutoff präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)

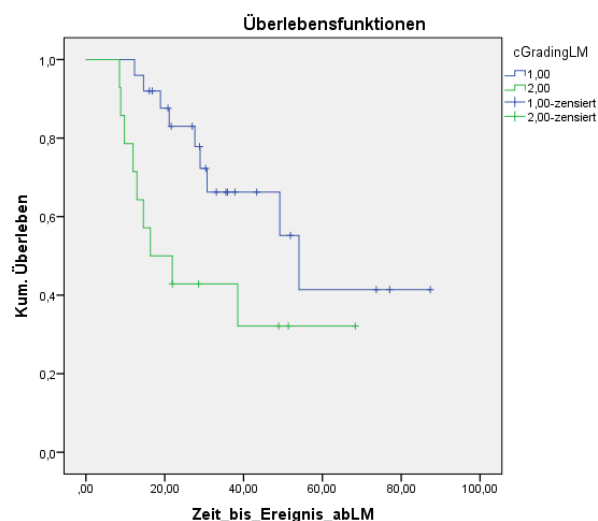


Abb. 36: Kaplan-Meier-Kurve für Grading der Lebermetastasen im tumorspezifischen Überleben (li)

4.3.2.3 Cox-Regressionsmodell

Zur Testung der signifikanten Merkmale auf Unabhängigkeit wurde das Cox-Regressionsmodell herangezogen. Die Durchführung erfolgte mittels SPSS. Damit soll das individuelle Risiko des Patienten als Summe der Beiträge der Risikofaktoren darstellen, wobei der Summand immer 0 sein soll, wenn der Risikofaktor fehlt. Dazu wird das Risiko der einzelnen Patienten berechnet. Hierfür mussten die einzelnen Merkmale intern zunächst in 0 und 1 umkodiert werden. Anschließend wurde ausgehend von den signifikanten Merkmalen in den Kaplan-Meier-Schätzern (s. Tabelle 19/20) ein Cox-Regressionsmodell gerechnet. Hierbei wurde wieder zwischen Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben unterschieden.

4.3.2.3.1 Primärtumoren

Da in die Berechnung nur vollständige Datensätze mit aufgenommen werden, wurden die Merkmale Lymphangiosis carcinomatosa, Gefäßinvasion und Perineuralscheideninvasion nicht in die Berechnung der Primärtumoren mit einbezogen, da aufgrund der hohen Fehlzahlen (s. Tabelle 9) keine ausreichende Patientenzahl zur Berechnung des Cox-Modells zur Verfügung stand. Hier zeigten sich in unserem Patientenkollektiv der Primärtumoren lediglich der N-Status mit $p=0,028$ bei einem Hazard (relatives Risiko) von 4,050 und einem 95%-Konfidenzintervall von 1,160 bis 14,139 sowie der Resektionsstatus mit $p<0,001$, einem relativen Risiko von 44,587 und einem 95%-Konfidenzintervall von 9,232 bis 215,115 als statistisch signifikante unabhängige Prognosefaktoren auf das Gesamtüberleben. Die nicht signifikanten Variablen sind ebenfalls in Tabelle 18 abgebildet. Für das tumorspezifische Überleben konnte nur für das R-Stadium ($p<0,001$) bei einem

Hazard von 115,048 und einem Konfidenzintervall von 13,565 bis 975,730 eine signifikante Beeinflussung des Überlebens gezeigt werden.

Merkmal	Signifikanz	Hazard/Exp (B)	95%-Konfidenzintervall	
			Untere	Obere
Gesamtüberleben				
N-Status	p=0,028	4,050	1,160	14,139
R-Stadium	<0,001	44,587	9,242	215,115
Grading Primaria	p=080	3,076	0,876	10,805
M-Stadium	p=0,541	---	---	---
CEA präop	p=0,280	---	---	---
CA 19-9 präop	p=0,953	---	---	---
EGF-R cutoff	p=0,868	---	---	---
Tumorspezifisches Überleben				
R-Stadium	p<0,001	115,048	13,565	975,730
N-Stadium	p=0,893	---	---	---
M-Stadium	p=0,068	---	---	---
CEA präop	p=0,250	---	---	---
CA 19-9 präop	p=0,162	---	---	---
EGF-R cutoff	p=0,324	---	---	---

Tab. 21: Ergebnis der Cox-Regressionsanalyse der Primärtumoren

4.3.2.3.2 Lebermetastasen

Im Kollektiv der Lebermetastasen erwiesen sich aus dem Bereich der klinisch-pathologischen Parameter die Größe der Metastase und das Resektionsstadium als prognostisch unabhängige Einflussgrößen auf das Gesamtüberleben der Patienten. Die Metastasengröße wies hierbei eine Signifikanz von p=0,009 mit einem Hazard von 7,303 und einem Konfidenzintervall von 1,641 und 32,497 auf. Für das Resektionsstadium erwies sich nur das R2-Stadium (p=0,004) als stark prognostischer Faktor mit einem relativen Risiko von 13,434 und einem 95%-Konfidenzintervall von 2,256 bis 80,012. Aufgrund der Power von R2 muss das gesamte R-Stadium (p=0,014) als prognostisch gewertet werden. Im Bereich der Biomarker erwies sich nur der Her2/neu-Score als Einfluss auf das Überleben nehmend. Er ist jedoch von allen mit der höchsten Signifikanz (p=0,002) bei einem Hazard/Exp (B) von 12,123 und einem Vertrauensbereich von 2,467 bis 59,566 behaftet (s. Tabelle 22). Im tumorspezifischen Überleben konnten diese Signifikanzen bestätigt werden. So war die Metastasengröße mit einem cutoff bei 5cm (p=0,006), das R-Stadium (p=0,023), insbesondere R2 (p=0,006) und der Her2/neu-Score (0,028) star-

ke Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten. Die Hazard/Exp (B) – Werte und das 95- Konfidenzintervall sind analog zum Gesamtüberleben in Tabelle 22 aufgeführt.

Merkmal	Signifikanz	Hazard/Exp (B)	95% - Konfidenzintervall	
			untere	obere
Gesamtüberleben				
Größe Metastase > 5cm	0,009	7,303	1,641	32,497
R-Stadium	0,014			
R1-Stadium	0,526	1,974	0,241	16,151
R2-Stadium	0,004	13,434	2,256	80,012
Her2/neu-Score	0,002	12,123	2,467	59,566
Tumorspezifisches Überleben				
Größe Metastase > 5cm	p=0,006	28,907	2,614	319,618
R-Stadium	p=0,023			
R1-Stadium	p=0,111	11,602	0,571	235,901
R2-Stadium	p=0,006	41,324	2,894	590,061
Her2/neu-Score	p=0,028	4,735	0,827	27,099
Grading Lebermetast.	p=0,081	13,607	1,318	140,430

Tab. 22: Ergebnis der Cox-Regressionsanalyse der Lebermetastasen für Gesamtüberleben und tumorspezifisches Überleben

5 Diskussion

5.1 Klinisch-pathologische Faktoren

5.1.1 Primärtumoren

Die Patientenzahl unseres Kollektivs (n=108) ist im Vergleich zu anderen, großen Kollektiven sicherlich als geringer einzuschätzen. Dennoch ist es aufgrund der Verteilungsmuster der klinisch-pathologischen Daten (s. Tabelle 9) anderen Kollektiven sehr ähnlich und daher eher als ein qualitativ hochwertiges Querschnittskollektiv zu betrachten[129-132]. Ähnlich verhält es sich mit den molekularen und immunhistochemischen Markern, deren Verteilungsmuster ebenfalls weitgehend dem großer, untersuchter Kollektive entsprach[58, 63, 71, 77, 133, 134].

5.1.1.1 Alter, Geschlecht, BMI, ASA

Hinsichtlich des Alters, das insgesamt einen Median von 68,1 Jahren aufwies, liegt unser Kollektiv leicht unter dem vom RKI für Deutschland für 2008 ermittelten Median von 71 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen. So kommen die Männer durchschnittlich auf 68,7 Jahre und das weibliche Geschlecht war im Schnitt 67,8 Jahre alt.

Bezüglich der Geschlechterverteilung ist unser Kollektiv mit einem Verhältnis Mann zu Frau von 1,35:1 tangential an den Durchschnitt der deutschen Neuerkrankungen mit 1,2:1 angelehnt[3].

Wenn man den BMI unserer Patienten betrachtet liegt unser Kollektiv mit einem Median von 26,3 kg/m² und einer Spannweite von 16,2 - 48,4 kg/m² absolut im Durchschnitt vieler großer Studien. Dadurch werden die Ergebnisse auch nicht durch einen hohen Anteil adipöser Patienten verfälscht, die ein deutlich höheres Risiko an KRK zu erkranken, aufweisen [135].

Auch waren unsere Patienten nicht zu einem großen Prozentsatz überdurchschnittlich stark vorerkrankt oder multimorbide. Dies kann an den Zahlen der Einteilung in die ASA-Klassifikation gut deutlich gemacht werden. 70% der Patienten bei den Primärtumoren waren ASA1 oder ASA2 und nur 1 Patient (0,9%) ASA4 klassifiziert. So kann der mögliche Bias einer operativ-getriggerten, erhöhten Mortalität ausgeschlossen werden. Grundsätzlich kann unserem Kollektiv in den o.g. Faktoren eine gute Abbildung der Gesamtheit konstatiert werden.

5.1.1.2 TNM

Unser Patientenkollektiv wurde vom Jahre 2003 bis 2010 rekrutiert. Es konnte die 7. Version der UICC-Klassifikation auf unser Patientenkollektiv daher noch nicht angewendet werden. Der Vorteil dieser Version gegenüber der von uns verwendeten 6. Version ist eine bessere Darstellung von Risikopatienten mittels einer besseren Differenzierung der einzelnen Subgruppen. Abgesehen davon hat es sich hinsichtlich der Prognoseverbesserung für Hochrisikopatienten der 6. Version jedoch als nicht überlegen erwiesen[136]. Die ermittelte Verteilung des TNM-Stadiums, sowie des daraus abgeleiteten UICC-Stadiums ist bezogen auf unser Kollektiv dem anderer großer Kollektive[132] annähernd vergleichbar und ist wiederum als Ausdruck für ein qualitativ hochwertiges Querschnittskollektiv zu interpretieren.

Das T-Stadium war im T1 2,8% und T2 mit 14,8% deutlich seltener als T3 (65,7%) und T4 (16,7%) vertreten. Dies deckt sich auch mit den Daten des RKI, das für T3/T4 über 70% aller neuerkrankten Fälle angibt[3]. Das N-Stadium ist mit 62,0% der Patienten N0 und 38% N1/2. Hier ist unser Kollektiv mit etwas weniger Lymphknoten-metastasierten Patienten befüllt. Andere Publikationen haben hier eine annähernd 50:50-Verteilung[130].

Betrachtet man den Metastasierungsstand bei Diagnosestellung sind nur 13,9 % im Stadium M1. Das ist ein geringer Grad an primär metastasierten Patienten, der normalerweise in der Literatur mit um die 25% angegeben wird.

Insgesamt ergibt sich daraus für das UICC-Stadium unseres Kollektivs eine Verteilung, welche 17,6% im Stadium I, 30,5% im Stadium II, 27,7% im Stadium III und 13,9% im UICC-Stadium IV umfasst. Mit dieser Verteilung ist es sehr gut vergleichbar, da andere Untersuchungen annähernd ähnliche Verteilungen erzielten[132]. Zusammenfassend kann unser Kollektiv daher als durchschnittlich bis leicht fortgeschritten bezüglich der TNM-Klassifikation bezeichnet werden.

Die Tatsache dass sich in der Cox-Regressionsanalyse nur das N-Stadium und der Resektionsstatus als unabhängige prognostische Variablen für das Überleben der Patienten erwiesen haben, war zu erwarten. Da bei beiden Parametern im Falle von N1/2 und R1/2 bereits fortgeschrittene Tumorstadien mit lymphogener Metastasierung oder residuale Tumorreste in situ verbleiben, ist ihre prognostische Wertigkeit keinesfalls überraschend. Auch die im Kaplan-Meier Schätzer als signifikant auf das Überleben Einfluss nehmenden klinisch-pathologischen Merkmale Grading, cM – Stadium, UICC – Stadium, L – Stadium, V – Stadium, Pn - Stadium und der Resektionsstatus waren erwartungsgemäß eingetreten. Für sie gilt ein Einfluss auf das Überleben als gesichert und werden daher auch in der 7. Auflage der UICC-Klassifikation mit berücksichtigt[137].

5.1.1.3 Grading

Bezüglich der Differenzierung der Primärtumoren waren 67,6% WHO Grading 1/2. Diese zwei Drittel-Verteilung kann auch in anderen größeren Fallzahlen beschreibenden Studien mit zufällig selektiertem Patientenkollektiv abgebildet werden. Hier kann im Falle unseres Kollektivs als von einem durchschnittlich fortgeschrittenem Tumorkollektiv ausgegangen werden[138]. Für den Differenzierungsgrad des Tumors ist zudem eine eindeutige prognostische Wertigkeit bekannt[139]. Diesen Wert konnten wir im Kaplan-Meier tendenziell bestätigen. Und auch in der Cox-Regression war hier eine Tendenz ersichtlich, jedoch konnte kein eindeutig signifikanter Zusammenhang dargestellt werden. Auffällig war auch eine Korrelation des fortgeschrittenen Gradings (G3/4) mit einer hohen Expressionsrate von EGF-R. Der Rezeptor ist in etwa 25-82% aller Tumoren hochreguliert[48], worin unser Kollektiv mit 55% Überexpression ebenfalls einzuordnen ist und kann in diesem Zusammenhang als ein Anzeichen für fortgeschrittene Tumoren und erhöhtes Metastasierungspotential gesehen werden[49]. Ein Zusammenhang von EGF-R mit Prognose und Überleben konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden[50].

5.1.1.4 Histologie

Histologisch betrachtet sind 13,9% der Primärtumoren muzinöse Adenokarzinome. Dieser Anteil kann annähernd als gleichwertig mit großen Patientenproben angesehen werden, bei denen bis 20% muzinöse Tumoren detektiert wurden. Zwischen der Histologie der Primärtumoren und dem EGF-R bestand ebenfalls ein statistischer Zusammenhang. So konnte in den muzinösen Primärtumoren eine deutliche Überexpression von EGF-R beobachtet werden. Da sowohl für den muzinösen Histologie-Typ, als auch für eine Überexpression von EGF-R ein fortgeschrittenes Tumorstadium postuliert wird, könnte hierin der kausale Zusammenhang bestehen[140]. Aktuelle Daten legen jedoch auch nahe, dass sich, anders als in der fortgeschrittenen Situation, der muzinöse Subtyp eher analog zum Adenokarzinom im Stadium II/III nach kurativer Resektion verhält. Eine adjuvante Therapie nur aufgrund der histologischen Einteilung sollte demnach nicht erfolgen[141]. Diesbezüglich sollten definitiv weitere prospektive Studien, um ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zu gewinnen, erfolgen.

5.1.1.5 Tumormarker

Der lösliche Tumormarker CEA im Serum ist der am häufigsten untersuchte Tumormarker und war präoperativ in 45,6% der Patienten pathologisch und damit geringfügig höher als in anderen Kollektiven berichtet. Allerdings ist er als eindeutig auf das Überleben der Patienten Einfluss nehmend zu werten[142], was sich auch im Kaplan-Meier-Schätzer zeigte. Die Rolle des CEA als Instrument zur Tumorsuche ist weiterhin umstritten, da es sich doch häufig erst in späteren fortgeschrittenen Stadien als pathologisch darstellt, auch bei einigen nicht malignen Krankheiten erhöht ist und weder eine gute Sensitivität

noch Spezifität besitzt. Daher ist eine lösliche Komponente in Zusammenschau mit einer gewebegebundenen Form des CEA auf weitere Zusammenhänge hin zu überprüfen. Hier könnte sich eine hohe gewebegebundene CEA-Konzentration als nützlicher Prädiktor für ein schlechtes Outcome nach Operation erweisen[143]. Weitere Untersuchungen sind in dieser Hinsicht jedoch definitiv noch anzustreben und Gegenstand aktueller Arbeiten. Für das Monitoring einer Tumorprogression im fortgeschrittenen Stadium ist CEA jedoch ein gut geeignetes und kostengünstiges Instrument der Therapieüberwachung[144].

Beim präoperativ im Serum nachgewiesenen Wert an löslichem CA 19-9 verhält es sich ähnlich zum CEA. Er wird zwar allgemein als Verlaufstumormarker mit angewendet und ist bei pathologischen Werten mit einer schlechteren Prognose assoziiert, als Screeningparameter ist er jedoch gänzlich ungeeignet. Hierfür sprechen auch die von uns erhobenen Zahlen: Nur 16,9% aller Patienten mit Primärtumoren wiesen pathologische Werte auf. Im Kollektiv der Lebermetastasen waren es immerhin 44,6%, was auch hier für eine erhöhte Expression erst in fortgeschrittenen Tumorstadien spricht[145, 146].

5.1.1.6 Tumorlokalisation

Auffällig war die Korrelation der Lokalisation des Primärtumors (linkes bzw. rechtes Hemikolon) mit den Wachstumsfaktoren EGF-R, IGF1-R und Her2/neu, sowie für BRAf in der Univariateanalyse. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Überexpression von EGF-R im rechten, für IGF-R und Her2/neu-Positivität im linken Hemikolon. Zudem waren BRAf-Mutationen häufig bei Patienten mit Tumoren im rechten Kolon vergesellschaftet. Während für BRAf-mutierte Patienten bereits ein Zusammenhang mit der Lokalisation des Tumors bekannt ist[64], ist für die Wachstumsfaktoren bisher eine derartige Korrelation weitgehend unbekannt. Ebenso wenig ist eine signifikante Verbindung der Lokalisation im rechten Hemikolon und einer niedrigen Expression von CD45 bekannt. Die Frage nach der Aussage dieses Ergebnisses ist sicherlich auch vor dem Kontext zu sehen, dass die einfache Einteilung in rechtes und linkes Kolon möglicherweise überholt erscheint. So sind vor allem im Bereich des Zökums und der linken Kolonflexur gelegene Tumoren besonders häufig mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert[147] und vor allem für das rechte Kolon ist ein schlechteres Langzeitüberleben gesichert[148]. Diese verstärkte Malignität der dort angesiedelten Tumoren ist möglicherweise einer erhöhten Expression an Wachstumsfaktoren und sicherlich auch weiteren Faktoren geschuldet, welche sich aus unserem kleinen Kollektiv kaum ablesen lassen. Hierfür wäre es wünschenswert große Kollektive vor diesem Hintergrund zukünftig zu analysieren. Die niedrige Expression von CD45 im rechtsseitigen Kolon könnte als Indiz für eine geringere Infiltration des Tumors mit körpereigenen CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen und einer damit verbundenen schlechteren körpereigenen Tumorimmunabwehr sein. Das könnte die Prognose bei rechtsseitigem Kolonkarzinom zusätzlich verschlechtern und wird als Gegenstand aktueller Arbeiten noch genauer untersucht.

Es ist nicht mehr zeitgemäß vom KRK als eine einzelne Entität zu sprechen, unterscheiden sich die Karzinome doch untereinander sehr stark. Linkes und rechtes Kolon alleine machen in der Biologie, der Genetik, sowie der Karzinogenese der Tumoren starke Unterschiede sichtbar, die sich bei weiterer Diversifikation noch feiner aufspalten lassen könnten. So wird auch von anderen Autoren wie Benedix et al. ein Umdenken gefordert, das das KRK gemäß seiner Lokalisation betrachtet[129]. Auch in unserer Studie ließen sich hierzu große Unterschiede herausarbeiten. Zusammengenommen betrachtet ist aus der Diversität an Biomarkern das linke und rechte Kolon betreffend eine Umkehr in der Betrachtungsweise des kolorektalen Karzinoms abzuleiten. Das von Vogelstein und Pearon eingeführte Modell der Karzinogenese[149] scheint in seiner aktuellen Form überholt und muss den neueren Erkenntnissen geschuldet, dementsprechend abgeändert werden, womit mehrere Wege zu differenten Karzinomen mit eigener Bioentität führen.

5.1.2 Lebermetastasen

Das Kollektiv der Lebermetastasen kann ebenfalls als gutes Querschnittskollektiv angesehen werden, welches sich hinsichtlich der klinisch-pathologischen Faktoren anderen großen Kollektiven als annähernd gleichwertig erweist [150-153].

5.1.2.1 *Alter, Geschlecht, BMI, ASA*

Mit einem Durchschnittsalter von 62,6 Jahren (Spannweite von 40 – 79 Jahren) sind die Patienten, deren Lebermetastasen untersucht wurden, im Schnitt fast sechs Jahre jünger als die Gruppe der Patienten mit Primärtumoren. Auch in großen Kollektiven ist das Alter im Mittel bei 61-64 Jahren[154]. Männer weisen mit 63,3 Jahren ein etwas höheres Durchschnittsalter als Frauen mit 61,4 Jahren auf.

Das Verhältnis Mann : Frau, das mit 1,68:1 im Vergleich zu Fong et al. (1,38:1) die Männer etwas höher repräsentiert ist jedoch im Rahmen der Standardabweichung[36].

Bezüglich des BMI erweist sich unser Metastasenkollektiv mit einem Durchschnittswert von 25,5 kg/m² (Spannweite von 18,3 - 33,2 kg/m²) als weder stark übergewichtig noch unterernährt und kann daher analog zu den Primärtumoren als Querschnittskollektiv bezeichnet werden.

71,2% der Patienten waren ASA1 oder ASA2 klassifiziert. Keiner ASA4. Dies lässt ebenfalls wie bei den Primärtumoren auf einen durchschnittlich guten Gesundheitszustand der Patienten vor Leberresektion schließen.

5.1.2.2 Lokalisation, UICC-Primärtumor

Wenn man die Lokalisation des zur Metastasierung führenden Primärtumors betrachtet, waren bei 27,3% (n=15) der Patienten der Tumor im rechten Kolon (Zökum, Kolon Ascendens + Colon Transversum) und 67,3% (n=37) der Tumoren im linken Kolon lokalisiert, wobei hier das Rektum mit n=10 im Vergleich zu Colon descendens und Sigma etwas unterrepräsentiert ist.

Für das UICC-Stadium der Primärtumoren, welche zur Ausbildung von Metastasen geführt haben, wurden 3,4% Stadium I und 11,9% Stadium II zugeordnet. Stadium III war in 27,2% ursächlich für die Metastasierung und Stadium IV lag in 57,6% der Patienten vor. Diese Verteilung ist bei einem ebenfalls zufällig ausgewähltem Kollektiv von n=305 von Knijn et al. so gut wie identisch mit Abweichungen im Bereich der normalen Streubreite. Hier zeigen sich für synchrone Metastasierung (Stadium IV) 55,4% und gleichwertige Verteilung hinsichtlich TNM[150].

5.1.2.3 Histologie

Betrachtet man die Histologie der Lebermetastasen, so sind 10,3% der Metastasen muzinöse Adenokarzinome. Es kann daher nicht von einer höheren Metastasierungsrate bei muzinösen Karzinomen ausgegangen werden, da sie beim primären KRK etwa 15-20% der histologischen Entitäten ausmachen. 2009 wurde berichtet, dass der muzinöse Typ beim fortgeschrittenen KRK mit schlechterem Ansprechen und Überleben auf eine Chemotherapie mit Oxaliplatin und/oder Irinotecan vergesellschaftet ist als das Adenokarzinom[155]. Dies stützt ebenfalls die o.g. Forderung das KRK in unterschiedliche Entitäten aufzuteilen, die differenziert behandelt und therapiert werden müssen.

5.1.2.4 Tumormarker

Im Vergleich zu den Primärtumoren sind pathologische CEA-Werte im Kollektiv der Lebermetastasen mit einer Quote von 75% deutlich höher und stützen die Verwendung von CEA als Verlaufs- und Progressparameter.

Im Kollektiv der Lebermetastasen bestand zudem ein Zusammenhang zwischen dem CA 19-9 und der HGF-R-Expression. So ist bei den Patienten mit pathologischem CA 19-9 so gut wie nie ein niedriger HGF-R-Status zu beobachten. Dies impliziert, dass fortgeschrittene Tumorstadien, wie sie häufig bei einem erhöhten CA 19-9-Wert der Fall sind, mit einer Überexpression von HGF-R einhergehen. Die Überexpression von HGF-R geht ebenfalls mit fortgeschrittenem Tumorstadium und Invasivität/Metastasierung einher und lässt diese Korrelation daher unter rein kausalen Gesichtspunkten erscheinen[133].

5.1.2.5 Fong Score

Der Fong Score hat sich als stark Einfluss nehmend auf das Überleben erwiesen und konnte im tumorspezifischen Überleben ($p=0,050$) eine knapp signifikante Korrelation darstellen. Allerdings konnte der postulierte Einfluss für die Gruppenbildung Fong Score 0/1/2 vs 3/4/5 kein Nachweis einer Signifikanz im Kaplan-Meier erbracht werden. Dies ist sicherlich auch der geringen Fallzahl von $n=45$ geschuldet. Der Fong Score ist ein einfaches und effektives, prognostisches Mittel, welches einfach zu bestimmen und keinem Patienten vorenthalten werden sollte um sein individuelles Risiko abzuschätzen.

5.2 Molekulare Marker

5.2.1 KRas

Bei der Betrachtung der Verteilung der Mutationen im KRas-Gen entsprechen unsere Ergebnisse mit 34,3% bei den Primärtumoren und 37,3% unter den Lebermetastasen dem in anderen größeren Kollektiven berichteten Muster an detektierten Mutationen. Ebenso die Verteilung mit G12V (29,7% und 23,8%) und G12D (29,7% und 42,9%) als die beiden am häufigsten auftretenden Mutationen ist bereits mehrfach beschrieben worden[58, 152] und deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Hinsichtlich der Analyse von Primärtumoren oder Metastasen ist diese als nahezu gleichwertig anzusehen, da beide Gewebearten eine hohe Konkordanz aufweisen[150]. Dies konnte in der Analyse unserer synchronen Lebermetastasen bestätigt werden. Diese zeigten bis auf eine Ausnahme, bei der in der Lebermetastase eine andere KRas-Mutation als im Primärtumor vorlag, jeweils die im Primärtumor vorkommende Mutation im KRas- oder BRAF-Gen. Hier kann für den Vergleich der Paare eine Gleichwertigkeit von über 90% konstatiert werden, was sich mit den Ergebnissen von Studien mit höheren Fallzahlen deckt[150, 156]. Dennoch bleibt ein kleiner Prozentsatz an Patienten bei dem die Analyse der Lebermetastase möglicherweise eine Mutation im zugrunde liegenden Primärtumor nicht erfasst, was weit reichende Therapiefolgen haben kann. Hier sollte wenn möglich sowohl der Primärtumor als auch Lebermetastasengewebe untersucht werden. Eine weitere Ursache für Diskordanz bei synchronen Gewebepaaren, könnte ein Qualitätsmangel im Bereich der DNS spielen, wie von Kaneko et al. postuliert wird[157]. In diesem Falle wären hohe Standards im Bereich der Gewebeaufarbeitung wünschenswert. Auch die häufig zitierte Heterogenität des Tumors/der Lebermetastasen könnten diese Diskordanz erklären. Hierzu müssen aber sicherlich noch weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven publiziert werden um diesbezüglich zuverlässige Aussagen machen zu können.

Die Mutation vom Typ: c.34G>T + c.36T>G – p.G12W (Tryptophan) ist bereits von Gadedcke et al. 2010[158] beschrieben worden war. Doppelmutationen sind keine Seltenheit

und treten bei etwa 1% der Patienten auf[159]. Hier zeigt sich auch der Vorteil vom Verfahren der direkten Sequenzierung mittels Pyrosequenzierung oder Sanger gegenüber anderen Methoden zur Mutationsanalyse wie z.B. High Resolution Melting.

Innerhalb der letzten Jahre wurde in mehreren Publikationen die Hypothese erhoben, eine strikte Trennung von KRas-mutiert gegenüber KRas Wildtyp abzulehnen und stattdessen Mutationen auf Codon 13 wie den Wildtyp zu behandeln. Im Speziellen ist hier vor allem die mit 21,6% bei Primärtumoren und 14,3% bei Lebermetastasen häufigste Mutation c.38G>A – p.G13D (Aspartat) zu nennen. Hinsichtlich der Verteilung ist unser Kollektiv mit 7,4% und 5,1% Mutationen auf Codon 13, sowie 26,9% und 32,2% auf Codon 12 annähernd identisch zu den mit 10% mutierten Patienten im Codon 13 und 25% im Codon 12 publizierten Daten bei großen Kollektiven[59]. Vor diesem Hintergrund haben wir ebenfalls zusätzlich zur üblichen Einteilung Wildtyp vs. mutiert noch eine Analyse durchgeführt, in der die G13D – Mutation zum Wildtyp gerechnet wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Mutation auf Codon 12 histologisch mit dem muzinösen Typ korreliert. Wir bestätigten daher die bereits von Bazan et al. 2002 festgestellte Verknüpfung des muzinösen Histologietyps und einer Mutation in Codon 12[160]. Es ist davon auszugehen, dass Signaltransduktionswege, die mit der Muzinproduktion in Verbindung stehen, von Codon 12-mutierten KRas-Proteinen affiziert werden. Ein genauer Zusammenhang ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Interessanterweise verhalten sich die KRas-Mutationen nicht nur hinsichtlich der Histologie unterschiedlich. Auch was das Ansprechen auf Therapieoptionen betrifft ist für einzelne Mutationen eine deutliche Tendenz Richtung Wildtyp zu beobachten. Für Patienten, die eine G13D – Mutation tragen, ist hierzu ein Profit im Überleben bei einer Therapie mit dem mAk Cetuximab analog zum Wildtyp beschrieben[59]. Dies nährt die Annahme G13D – Mutationen als eigene Entität zu betrachten und von der Einteilung KRas Wildtyp vs. mutiert abzuweichen. Denn auf dieser Entscheidungsgrundlage könnte vielen Patienten (in unserem Kollektiv 7,4% aller Patienten mit Primärtumoren) eine lebensverlängernde Therapie mit Cetuximab/Panitumumab vorenthalten werden. Hierzu müssen schnellstens mehr Subgruppenanalysen großer Kollektive erfolgen, um diejenigen Patienten die von einer solchen Therapie profitieren würden, zu identifizieren.

Für den IGF1-R ist in Zusammenschau mit KRas eine signifikante Korrelation bei den Primärtumoren und bei den Lebermetastasen – sicherlich auch der niedrigen Fallzahl geschuldet – eine Tendenz mit $p=0,051$ zu erkennen. So ist bei den Patienten mit KRas Wildtyp der IGF1-Rezeptor hochreguliert. Hierin kann man möglicherweise einen Grund für eine Resistenz von KRas-Wildtyp-Patienten gegen eine Cetuximab/Panitumumab-Therapie ableiten. Durch die Querverbindung in der Signalgebung von IGF1-R mit dem RAS/RAF/MAPK-Signalweg können Wachstumssignale, welche bei KRas-Wildtyp-Patienten mittels Cetuximab/Panitumumab geblockt werden sollen, über den IGF1-R übertragen und weitergeleitet werden[79, 161]. Resultat wäre ein Nichtansprechen auf eine Therapie

mit mAk gegen EGF-R, was immer noch bei 40-50% aller Patienten der Fall ist. Die klinische Erprobung von Antikörpern gegen den IGF1-R stellt hierzu sicherlich einen Schritt in eine richtige Richtung dar und könnte für KRas-mutierten Patienten und Nichtansprechern auf Cetuximab/Panitumumab zukünftig eine alternative Therapieoption darstellen[162].

5.2.2 BRaf

Die Tatsache, dass für BRaf Exon 11 keine Mutation detektiert werden konnte, ist nicht allzu überraschend, da auch in anderen Untersuchungen eine Mutation in diesem Bereich äußerst selten detektiert werden konnte[61, 163]. Dies ist auch ein Grund warum eine Testung auf eine Mutation auf Exon 11 nicht standardmäßig durchgeführt wird und man sich bei Testung auf Mutationen im BRaf-Gen auf Exon 15 beschränkt. Die V600E-Mutation ist mit weit über 80% die weitaus häufigste aller Mutationen, welche zu einer erhöhten Kinase-Domänen Aktivität führen. Auch aus Kostengründen sollte daher die alleinige Testung auf V600E erfolgen.

Die Ergebnisse für Mutationen im Exon 15 liegen mit 13,9% für die Primärtumoren innerhalb der in anderen Kollektiven auftretenden Häufigkeiten[64]. Die geringe Häufigkeit von 1,7% (n=1) bei den Lebermetastasen ist sicherlich durch die niedrige Fallzahl der Lebermetastasen geschuldet. Hier würde eine Mutation mehr im Kollektiv schon wieder zu einer deutlichen prozentualen Steigerung führen und damit dem Durchschnitt anderer Kollektive annähern[164]. Zudem ist die BRaf-Mutation wie Benedix et al. 2012 berichteten mit einer geringeren Rate an Fernmetastasierung assoziiert[165]. Die Tatsache, dass BRaf-Mutation unter den synchronen Lebermetastasen sowohl im Primärtumor als auch in der Metastase detektiert werden konnten, sprechen für frühes Auftreten von BRaf-Mutationen in der Karzinogenese. Den bereits in vielen Studien bestätigten Einfluss der V600E-Mutation auf das Patientenüberleben[166], konnten wir in unserem Kollektiv leider nicht abbilden, was auch der Tatsache geschuldet ist, dass unter den Primärtumoren mit Ereignis Tod in der Nachsorge nur n=14 Patienten in die statistische Analyse mit eingegangen sind und die Nachsorgezeit für viele Patienten beim Zeitpunkt der Auswertung noch keine 60 Monate betrug. Der bereits oben erwähnte Zusammenhang zwischen BRaf-Mutation und Lokalisation des Primärtumors im rechten Hemikolon, sowie die überdurchschnittlich hohe Anzahl an Frauen mit BRaf-Mutationen und dem häufigeren Auftreten in Tumoren mit einem Grading von 3 oder 4 sind bereits bekannte Korrelationen[64, 165]. Der Zusammenhang mit dem Geschlecht und der Lokalisation bleibt sicherlich weiterhin Gegenstand der Diskussionen und ist sicherlich noch nicht abschließend geklärt. Der geringe Differenzierungsgrad der Tumoren mit V600E-Mutation trägt sicherlich auch wesentlich dazu bei, bei V600E-mutierten Patienten die Prognose zu verschlechtern. Die Tatsache, dass BRaf-Mutationen und KRas-Mutationen gleichzeitig nur extrem selten auftreten[167], führt dazu, dass eine inverse Korrelation zwischen BRaf und KRas besteht.

Dies erscheint in sich absolut logisch zu sein, da doch beide Mutationen denselben Signalweg aktivieren und daher eine „Doppelaktivierung“ für die Karzinogenese nicht benötigt wird. Dennoch gibt es Tumoren, die eine solche Doppelaktivierung tragen, welche daher nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann[124]. Eine Testung auf beide Mutationen ist daher von essentieller Wichtigkeit.

Zusammenfassend lässt sich hinsichtlich der molekularen Marker, von denen wir einen kleinen Auszug analysiert haben, sagen, dass ein Marker allein, wie er gerade mit der Analyse des KRas-Status erfolgt, nicht ausreichend ist. Es müssen Multimarker-Panels entwickelt werden, welche sich an neuen Erkenntnissen der Forschung orientieren um genau jene Risikogruppen zu identifizieren, welche am Meisten von einer Therapie profitieren können. Ein erster Schritt in die richtige Richtung stellt hierzu der ColoPrint® dar. Dieser Test ist in der Lage die Entwicklung von Fernmetastasen für Patienten mit Stadium II KRK „vorherzusagen“ und erleichtert die Identifizierung von Patienten, die von einer adjuvanten Chemotherapie nicht profitieren würden[18]. Hierzu werden 18 Gensignaturen über einen vollständigen Genom-MicroArray-Ansatz analysiert und mit klinisch-pathologischen Daten, sowie der Mikrosatelliteninstabilität abgeglichen. Seit Kurzem besteht für den Test sogar die Zulassung der amerikanischen FDA[168]. Hier bleibt abzuwarten inwieweit ein solcher Test Einzug in den klinischen Alltag halten wird, da die Kosten für ein derartiges Multimarker-Panel den aktuellen Rahmen sicherlich noch sprengen würden.

5.2.3 Zelllinien

Hinsichtlich der analysierten Karzinomzelllinien ist zu konstatieren, dass sich im Exon 11 des BRAf-Gens kein Mutationsnachweis verzeichnen ließ, sondern lediglich wie bei den Patientenproben auch die V600E-Mutation als häufigste und wichtigste Mutation in Exon 15 nachweisbar war. Auch für das KRas-Gen konnten nur bekannte Mutationen detektiert werden. Ein Nachweis von KRas und BRAf – Mutation in einer Zelle wie von Seth et al. 2009 beschrieben[124], gelang nicht. So ist auch im Bereich der Zelllinien ebenso wie für Patientenproben von einer sehr hohen Diskordanz beim gemeinsamen Auftreten von „gain of function“ – Mutationen im KRas/BRAf – Gen auszugehen. Bezüglich einer möglichen Resistenz gegen Irinotecan oder Oxaliplatin konnte bei den RKO und SW480 Zelllinien keine Abweichung im Mutationsmuster detektiert werden. Um weitere Aussagen bezüglich der Vergleichbarkeit mit dem Kollektiv der Patientenproben zu tätigen, ist die untersuchte Anzahl an Zelllinien als zu gering einzuschätzen. Auch ein Vergleich der unterschiedlichen Tumorentitäten ist bei so geringer Fallzahl keine Aussage zu treffen. Diesbezüglich müssen weitere Zelllinien, auch von anderen Tumorlokalisationen analysiert werden.

5.2.4 Bevacizumab und VEGF

Da VEGF-A im immunhistochemischen Nachweis und auch der lösliche VEGF Rezeptor-2 (sVEGF-R-2) zwar als prognostische Marker [169], aber nicht als relevante Marker für eine Therapie mit Bevacizumab oder einem anderen gegen VEGF-R gerichteten Antikörper wie Cediranib[170] dienen, fehlen weiterhin effektive Stratifizierungsmarker in der Therapie der Neoangiogenese. Dennoch bleibt Bevacizumab aktuell weiterhin eine wichtige Therapieoption für KRas-mutierte Patienten in der Erstlinientherapie des metastasierten KRK[171]. Da der VEGF-R in naher Verwandtschaft zu anderen Wachstumsfaktoren steht und auch bereits weitere Wachstumsfaktoren identifiziert wurden, welche die Neoangiogenese mittels VEGF ebenfalls stimulieren, ist eine Verflechtung auf Signalgebungsebene anzunehmen. So gibt es Hinweise, dass die Expression von VEGF mit einer Mutation im Tumorsuppressorgen p53 und einer Aktivierung des Ras/MAPK- Signalwegs getriggert wird[172]. Es ist daher unbedingt notwendig nicht nur VEGF oder VEGF-R als Zielstrukturen mittels Antikörpern zu blockieren, sondern um die Neoangiogenese effektiver zu unterdrücken, müssen mehrere Angriffspunkte berücksichtigt werden. Hier könnten gegen VEGF-A, VEGF-B und PlGF gerichteter Antikörper, einen ersten Schritt hin zu einer effektiveren Anti-Neoangiogenese darstellen[173]. Ebenfalls ein vielversprechender Ansatz stellt die Untersuchung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen dar, welche mit einer möglichen (Teil-)Remission unter Bevacizumab-Therapie in Korrelation stehen[174]. Hier bleibt das Ergebnis weiterer Untersuchungen abzuwarten.

5.3 Metastasierung

Metastasierung ist weiterhin der prognostisch ungünstigste Faktor des KRK. Marker, die eine mögliche Metastasierung indizieren, sind daher von besonderer Wichtigkeit und Bedeutung für die Patienten. Der bereits oben erwähnte Zusammenhang zwischen Grading und EGF-R-Überexpression als möglicher Metastasierungsmarker könnte die immunhistologische Bestimmung des EGF-R in seiner zukünftigen Bedeutung stärken und bedarf weiterer Subgruppenanalysen in großen Kollektiven. Einen weiteren Hinweis auf Metastasierung stellen die Überexpression von c-Met (HGF-R) und CD44v6 dar, welche sich im Laufe des Metastasierungsprozesses einstellt. Eine Korrelation lässt sich hier jedoch erst bei den Lebermetastasen nachweisen, weshalb beiden Markern im Prozess der Metastasierung bekanntlich eine große Bedeutung beigemessen wird. Als prädiktive Marker beim Primärtumor sind sie jedoch unbrauchbar. Ein weiterer Hinweis auf die große Bedeutung von CD44v6 hinsichtlich Metastasierung ist die eindeutige Tendenz zwischen einem hohen Fong Score (3, 4, 5) und CD44v6 ($p=0,072$). Hier ist eine höhere Fallzahl anzustreben um eine bessere Aussagekraft zu gewinnen. Der signifikanten Korrelation von CD44v6 und Ki67 bei Primärtumoren im fortgeschrittenen Stadium sollte sicherlich besondere

Aufmerksamkeit geschenkt werden. Das erhöhte Metastasierungspotential von CD44v6 kann in Kombination mit einem erhöhten Ki67-Index als möglicher Kombinationsmarker für erhöhtes Risiko einer Metastasierung angesehen werden. In diesem Zusammenhang erscheint die Korrelation von einem hohen Ki67-Index und einem fortgeschrittenen Grading unter rein kausalen Gesichtspunkten.

Die erhöhte Expression von CD44v6 bei Überexpression von EGF-R kann im Sinne einer positiven Rückwärtsaktivierung von EGF-R über den c-Met aktivierenden Signalweg (s.u.) und damit als ein die Metastasierung stärkendes Signal interpretiert werden. Zudem kommt ein Nichtansprechen auf eine Cetuximab-Therapie über diesen Mechanismus in Frage[175]. Für das Mammakarzinom wird ein derartiger Mechanismus im Sinne eines Nichtansprechens auf eine Herceptin® (Trastuzumab) -Therapie ebenfalls angenommen[83].

Die prognostische Relevanz der Metastasengröße und des Resektionsstatus ist nicht verwunderlich, da es auch schon an anderer Stelle beschrieben wurde und hierzu auch bereits Meta-Analysen vorliegen[34]. Für den Her2/neu-Score als hochsignifikanten Prognosemarker bei den Lebermetastasen ist es jedoch umso erstaunlicher wenn man dies im Kontext mit den statistisch signifikanten Korrelationen in der univariaten Analyse von Her2/neu mit CD45 und HLA-DR bei den Primärtumoren sieht. So müssen in die Überlegungen der Metastasierung nicht nur Wachstumsfaktoren und deren Signalwege, sondern auch deren Interaktionen mit Inflammation, Adhäsion und Chemotaxis berücksichtigt werden (s. Abbildung 37)[32]. So ist bei Her2/neu-Positivität CD45 niedrigreguliert. Derselbe Mechanismus tritt bei HGF-R (Positivität korreliert tendenziell $p=0,058$ mit niedriger CD45-Expression) im Kollektiv der Lebermetastasen auf. Daraus lässt sich eine Kreuzverbindung zwischen den Wachstumsfaktorsignalwegen (Ras/Raf/MAPK) und der Inflammationsantwort über den T-Zellrezeptor und CD45-Corezeptor ableiten (s. Abbildung 37). Hinsichtlich der Verhinderung von Metastasierung ist eine adäquate Immunantwort absolut essentiell. Die These der Kreuzantwort für die inflammatorische Immunantwort stützt sich auch auf die inverse Korrelation von HLA-DR und Her2/neu. Bei erhöhtem HLA-DR der Primärtumoren ist Her2/neu meist nicht exprimiert. Dies könnte im Zusammenhang mit einer Immunantwort stehen. Diese wird für ein positives Ansprechen auf Cetuximab-Therapie als Hautausschlag (Rash) postuliert. Ein derartiges Auftreten des Ausschlages wird auch im Zusammenhang mit bestimmten HLA-Polymorphismen gesehen. Eine genetische Komponente und einer damit einhergehenden Immunantwort ist daher nicht von der Hand zu weisen[176]. Es könnten über derartige Interaktionen und Kreuzungen in der Signalgebung wichtige Erkenntnisse für effektivere Therapiemöglichkeiten zur Verringerung der Metastasierungsrate abgeleitet werden.

Insgesamt könnte ein Therapieansatz mit Trastuzumab für Her2/neu-positive metastasierte, kolorektale Karzinompatienten zu einem deutlichen Benefit beitragen. Hierzu sind

aber randomisierte, multizentrische Studien nötig. Des Weiteren sind duale EGFR/Her2/neu-Inhibitoren als hoffnungsvolle neue Therapieansätze nicht außer Acht zu lassen[177].

5.4 konventionelle Chemotherapie

In der Auswertung der Ergebnisse ergab sich keine Hinweis auf die Einflussnahme einer präoperativen Chemotherapie auf die Expression von Biomarkern. Die aktuellen Diskussionen über Resistenzmechanismen in KRK bei der Therapie mit monoklonalen Antikörpern lassen die konventionellen Chemotherapieregime jedoch etwas außen vor. Bei der ganzen Debatte wird häufig auch übersehen, dass auf die aktuellen Therapieregime mit Oxaliplatin und Irinotecan allein, ebenfalls ein hoher Prozentsatz der Patienten nicht anspricht. Hier ist es sicherlich weiterhin von Nöten weitere Stratifizierungsmarker zu evaluieren und in den klinischen Alltag zu überführen. Zwar existieren einige Toxizitätsmarker wie z.B. UGT1A für Irinotecan, dennoch fehlt es weiter an Strategien zur Verbesserung der Effizienz im Einsatz der klassischen Chemotherapeutika. Auch die Ansätze Enzyme wie TS, TP oder DPD für 5-FU oder ERCC-1 und andere Proteine des Nukleotid-Exzisionsreparatur-Komplexes im Zusammenhang mit Oxaliplatin zu untersuchen, haben nicht den gewünschten Erfolg gebracht. Hier gilt es aber nicht die weiteren Bemühungen einzustellen und sich nur auf die Entwicklung und Stratifizierung neuer Therapien zu konzentrieren, sondern zunächst das bestehende weiter in seiner Effizienz zu steigern. Hier-von würden sehr viele Patienten profitieren, v.a. in Anbetracht der Tatsache, dass eine adjuvante Chemotherapie meist weiter mit Schemata wie FOLFOX oder FOLFIRI allein durchgeführt wird[4].

5.5 Signaltransduktion

Die Tatsache, dass zwischen den Wachstumsfaktorrezeptoren untereinander Korrelationen bestehen, lässt auf eine intensive Verflechtung innerhalb der Signaltransduktion schließen. Die Korrelationen von HGF-R mit IGF1-R bei den Primärtumoren, von EGF-R mit HGF-R bei Lebermetastasen und von EGF-R mit IGF1-R ebenfalls bei den Lebermeta-stasen bezeugen ebenfalls eine starke Interaktion der Wachstumsfaktoren untereinander und auf Signalwegesebene (s. Abbildung 37). Über die Aktivierung eines anderen Wachstumsfaktorrezeptors kann die Blockade von EGF-R umgangen und so die mögliche hohe Rate an Nichtansprechern auf Cetuximab/Panitumumab erklärt werden. Ebenso könnten Rückwärtsschleifen zwischen den Signalwegen vermittelt über PI3-Kinase oder PTEN Ursache für die Hochregulation eines Wachstumsrezeptors bei EGF-R Blockierung mittels mAk darstellen. Auch die Korrelation von EGF-R mit CD44v6 kann über eine solche

„Backloop-Verbindung“ erklärt werden. Zudem kann über diesen Weg ein mögliches Nichtansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab/Panitimumab bei KRas-Wildtyp Patienten als potentielle Ursache eruiert werden. So kann über die Aktivierung von CD44/c-MET (oder anderer Wachstumsfaktoren) eine Zunahme der Aktivität im RAS/RAF/MAPK-Signalweg erfolgen[175]. Zudem bestehen zu vielen anderen Signalwegen Querverbindungen. So können sowohl Einflüsse des Wnt- und Notch-Signalwegs auf Promotorebene eruiert werden. Auch über den T-Zell-Rezeptor und CD45 kann auf die Signalgebung der Wachstumsfaktoren Einfluss genommen. Somit sind auch im Immunsystem und der Inflammation mögliche Ursachen für eine Resistenz gegen EGF-R-Ak zu suchen.

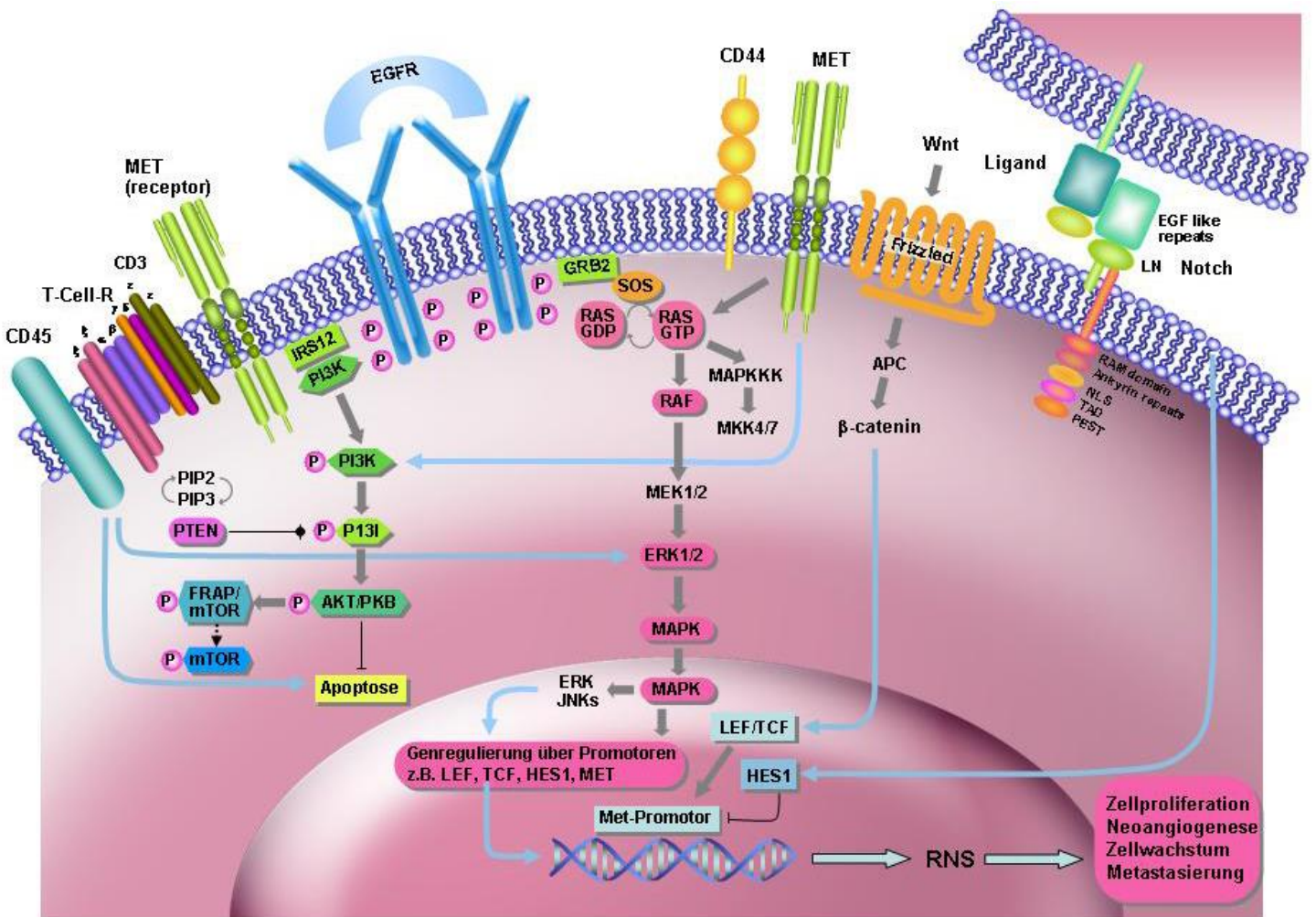


Abb. 37: Signalwegverbindungen zwischen Wachstumsfaktorrezeptoren (am Beispiel EGF-R und MET) und Cofaktor CD44, dem T-Zellrezeptor mit Cofaktor CD45, dem Wnt-Signalweg und dem NOTCH-Signalweg und ihre Auswirkungen auf Apoptose, Genregulation und Transkription, Verfügung gestellt durch Fr. Hanisch, chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern

5.6 Individuelle Therapiestrategie und Ausblick

Zwar konnte für EGF-R ein Einfluss auf das Überleben im Kaplan-Meier-Schätzer gezeigt werden, in der Cox-Regressionsanalyse bestätigte sich ein unabhängiger Einfluss auf das Überleben jedoch nicht! Für keinen der untersuchten Biomarker konnte in unserem Kollektiv ein direkter Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden. Es kann daher anhand unseres Biomarker-Panels keine direkte individuelle Therapiestrategie abgeleitet werden. Andere Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass mit dem richtigen Panel an Markern und in Zusammenschau mit klinischen Parametern, welche, wie der nodale Status und der Resektionsstatus, starken Einfluss auf das Überleben nehmen, die Ableitung einer individuellen Therapie durchaus bereits möglich scheint. Zumindest der additive Effekt einer adjuvanten Chemotherapie kann sich bereits daraus ableiten lassen. Marker, die für ein (Nicht-)Ansprechen auf eine bestimmte Chemotherapie oder mAk sprechen, sind bis auf die KRas-Mutationen für Cetuximab/Panitumumab bisher nicht vorhanden. Hier wird auch die Schwierigkeit der Integration von Biomarker-Forschung in den klinischen Alltag ersichtlich. Denn trotz intensiver Beforschung in den letzten Jahren, hat sich nur der KRas-Status in aktuelle Leitlinien integriert, welche weiterhin nur auf patientenbezogene und klinisch-pathologische Werte zur Stadieneinteilung und Risikostratifizierung zurückgreifen kann. Hier sind weitere Anstrengungen von Nöten, sodass mehr Marker den Einzug in eine leitliniengerechte Therapie vollziehen.

Eine Möglichkeit des Umgangs mit der Variabilität der KRas-Mutation bietet ein Ansatz, der die Testung von Zelllinien mit einbezieht. So könnte durch die Etablierung einer Vielzahl von Zelllinien ausgehend von Primärtumoren deren KRas-Status evaluiert und in vitro dementsprechende Untersuchungen auf die Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika und mAk vorgenommen werden. Die Ergebnisse hieraus könnten dann wiederum im Rahmen randomisierter Studien auf den einzelnen Patienten übertragen werden.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz bietet dafür auch das sog. Gene-Expression-Profilung. Hiermit können anhand der Expression eines genetischen Profils mögliche prädiktive Aussagen getroffen werden. Für das Mammakarzinom sind bereits zwei kommerzielle Tests vorhanden, deren Zulassung auch bereits in Konsensus-Leitlinien übernommen wurde[178]. Zum einen der Oncotype DX (Genomic Health Inc., Redwood City, CA) um das Risiko für in Lymphknoten-negativen, Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom-Patienten abzuschätzen und zur Risikostratifizierung und Entscheidungskriterium für eine adjuvante Chemotherapie[179]. Zum anderen der MammaPrint® (Agendia BV, Amsterdam, Niederlande) zur Risikostratifizierung in lymphknotennegativen Brustkrebspatienten[180]. Für das KRK sind aktuell ebenfalls zwei kommerzielle Gene-Expression-Profilung-Tests verfügbar: Der Oncotype DX Colon Cancer test (Genomic Health, Inc., Redwood City, CA) und der ColoPrint® (Agendia BV, Amsterdam, Niederlande), die mittels eines Progressions- und Risikoscores (Oncotype DX) und einer Gensignatur in Kombination mit klinischen Parametern (ColoPrint®) möglicherweise eine Metastasierung

vorhersagen könnten[18]. Die Effektivität und Effizienz muss in großangelegten Test jedoch erst gezeigt werden[181]. Hierin liegt aber sicherlich die Zukunft der individualisierten Tumorthherapie, die mittels Kartierung des individuellen genetischen Profils zu einer auf das Individuum zugeschnittenen, bestmöglichen Therapie führt. Sollte es möglich sein, die durch eine Genkartierung auftretenden Probleme des Datenschutzes vollständig zu gewährleisten, könnten diese Tests eine mögliche Entwicklung hin zur Tumorthherapie des 21. Jahrhunderts darstellen. Doch bei aller Testung auf Biomarker und genetische Aberrationen darf der wichtigste Faktor in der Therapie des KRK nie außer Acht gelassen werden: der Chirurg!

6 Zusammenfassung

Beim kolorektalen Karzinom haben sich durch die Einführung von neuen Therapeutika mögliche Biomarker in der Therapieauswahl, der Abwägung von Nebenwirkungsprofilen und der Beurteilung von Prognose und Überleben als wichtiger Bestandteil, neben klinischen Faktoren, bisher nur teilweise etabliert können. Ziel muss daher die Etablierung von effektiven Markern sein, um den Patienten eine möglichst effektive, auf das Individuum zugeschnittene Therapie anbieten zu können.

In unserer Studie zum kolorektalen Karzinom haben wir n=108 Patienten mit Primärtumoren und n=59 Patienten mit Lebermetastasen vom KRK analysiert. Aus postoperativ entnommenem, N₂-schockgefrorenem Gewebe sind zunächst 5µm dicke Schnitte angefertigt worden, anhand derer ein Biomarker-Profil aus molekulargenetischen und immunhistologischen Markern erstellt wurde. Es wurden genetische Mutationen auf dem KRas- und BRAf-Gen mittels Mikrodissektion/Pyrosequenzierung detektiert und mittels immunhistochemischer Färbungen die Moleküle EGF-R, Her2/neu, IGF1-R, c-Met, CD44v6, Ki67, CD45 und HLA-DR analysiert. Im weiteren Verlauf wurden die klinisch-pathologischen und Nachsorgedaten in einer Datenbank zusammengestellt und statistisch ausgewertet.

Hierbei ergaben sich in der univariaten Analyse zwischen den einzelnen Parametern der Primärtumoren folgende statistisch signifikante Korrelationen: Eine Mutation/der Wildtyp im KRas-Gen korrelierte mit dem L-Stadium, einer Mutation/der Wildtyp im BRAf-Gen und IGF1-R (p=0,007; 0,003; 0,034). Der um die Mutation G13D erweiterte KRas Wildtyp bzw. mutiert (ohne G13D) korrelierte hierunter mit dem L-Stadium, der Histologie, sowie ebenfalls mit BRAf (p=0,038; 0,039; 0,011). Eine Mutation im BRAf-Gen (Exon 15) war mit dem Geschlecht, der Lokalisation und dem Grading des Primärtumors signifikant verbunden (p=0,042; 0,003; 0,002). Der EGF-R korrelierte mit der Lokalisation, dem Grading, dem L-Stadium und CD44v6-Positivität (p=0,031, 0,020, 0,006, 0,021). Bei Her2/neu fand sich für das Geschlecht, die Lokalisation, CD45 und für HLA-DR eine Verknüpfung (p=0,005, 0,021, 0,032, 0,006). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen Her2/neu (Score) und dem Geschlecht (p=0,009) sowie der Tumorlokalisation (p=0,010) nachgewiesen werden. Für c-Met und IGF1-R (p=0,021) und für IGF1-R mit der Lokalisation des Primarius (p=0,027) bestand eine positive Korrelation. Des Weiteren korrelierten CD45 mit HLA-DR (p=0,046) und Ki67 mit dem Alter der Patienten (p=0,015).

Hinsichtlich der Lebermetastasen konnte eine Verbindung von EGF-R mit der Histologie, mit IGF1-R und c-Met (p=0,046; 0,004; 0,007) nachgewiesen werden. Für die bereits bei den Primaria aufgetretene Korrelation von KRas und IGF1-R gab es bei den Lebermetastasen mit p=0,051 eine Tendenz. Zudem konnte für c-Met und der Tumorgröße, dem

löslichen präoperativen Tumormarker CA19-9 und CD44v6 ($p=0,004$; $0,003$; $0,044$) eine positive Korrelation nachgewiesen werden. HLA-DR und der BMI wiesen einen statistisch signifikanten Wert ($p=0,022$) auf und für Ki67 und CD44v6 bestand ebenfalls eine signifikante Verbindung ($p=0,007$). Ki67 und das Grading ($p=0,017$) sowie Her2/neu (Score) und die Histologie der Lebermetastasen ($p=0,018$) wiesen ebenfalls Signifikanz auf.

Für das Gesamtüberleben im Kollektiv der Primärtumoren konnte im Kaplan-Meier-Schätzer ein Zusammenhang von N-Stadium ($p<0,001$), M-Stadium ($p<0,001$), UICC-Stadium ($p<0,001$), L-/V-/Pn-Stadium ($p<0,001$; $p<0,001$ und $p=0,001$), dem Resektionsstatus ($p<0,001$), dem präoperativ bestimmten löslichen Tumormarkern CEA und CA19-9 ($p<0,001$), sowie dem EGF-R ($p=0,049$) ermittelt werden. Das tumorspezifische Überleben zeigte für o.g. Merkmal jeweils gleiche Werte, der EGF-R ($p=0,076$) war jedoch hierunter als nicht mehr signifikant einzustufen.

Im Kollektiv der Lebermetastasen mit erstmaliger Leberresektion konnte hinsichtlich des Überlebens im Kaplan-Meier-Schätzer ein Einfluss der Metastasengröße $>5\text{cm}$ ($p=0,017$), des Gratings ($p=0,036$), des Resektionsstatus ($p=0,019$), von CD44v6 ($p=0,004$) und dem Her2/neu Score ($p=0,048$) als signifikant auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Auch im tumorspezifischen Überleben stellten sich die Metastasengröße $>5\text{cm}$ ($p=0,014$), der Resektionsstatus ($p=0,002$), CD44v6 ($p=0,004$), der Her2/neu Score ($p=0,014$) als signifikant dar. Zudem zeigten der Fong Score ($p=0,050$), das Grading der zur Metastasierung geführten Primärtumoren ($p=0,030$) und die Her2/neu-Positivität ($p=0,027$) einen Einfluss auf das tumorspezifische Überleben.

In der Cox-Analyse konnten jedoch nur der Resektions- und der nodale Status ($p<0,001$ bzw. $p=0,028$) als unabhängige Variablen der Einflussnahme auf das Gesamtüberleben bei den Primärtumoren nachgewiesen werden. In der tumorspezifischen Analyse des Überlebens konnte sich lediglich das Resektionsstadium als unabhängiger Prognosefaktor beweisen ($p<0,001$). Für das untersuchte Kollektiv der Lebermetastasen ergab sich für die Lebermetastasengröße $>5\text{cm}$ ($p=0,009$), das R2-Stadium ($p=0,004$) und den Her2/neu-Score ($p=0,002$) eine eindeutig prognostische Relevanz. Diese Ergebnisse waren sowohl im Gesamtüberleben, als auch für das tumorspezifische Überleben relevant (Lebermetastasengröße $p=0,006$; R2-Stadium $p=0,006$, Her2/neu-Score $p=0,028$).

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse ableiten, dass in der Behandlung des „einen“ KRK ein Umdenken stattfinden sollte. Das klassische Modell der Karzinogenese ist der Komplexität neuerer Erkenntnisse nicht mehr gewachsen. Es sollte möglichst dahingehend erweitert werden, dass sich auf dem Weg zur Tumorentwicklung eine Auftrennung in verschiedene Tumorentitäten vollzieht, die nach Lokalisation getrennt, unterschiedliches tumorbiologisches Verhalten an den Tag legen. Hierin liegt der Schlüssel für eine weitere Individualisierung in der Behandlung des KRK. Denn nur durch ein Panel an

suffizient evaluierten Stratifizierungsmarkern, durchgeführt am Tumor selbst, kann eine personalisierte Therapieentscheidung getroffen werden und ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden. Als äußerst aussichtsreich hat sich dazu in jüngster Zeit das Gene-Expression-Profilings erwiesen.

7 Anhang

7.1 Tabellen zu klinisch-pathologischen Parametern

7.1.1 ASA-Klassifikation

ASA	Beschreibung
ASA 1	Normaler, gesunder Patient
ASA 2	Patient mit leichter Allgemeinerkrankung
ASA 3	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung
ASA 4	Patient mit schwerer Allgemeinerkrankung, die eine ständige Lebensbedrohung ist.
ASA 5	moribunder Patient, der ohne Operation voraussichtlich nicht überleben wird
ASA 6	hirntoter Patient, dessen Organe zur Organspende entnommen werden

Tab. 23: Klassifikation der American Society of Anesthesiology zur Abschätzbarkeit des präoperativen Risikos [182]

7.1.2 TNM-Klassifikation

Stadium	Infiltrationstiefe(T), Lymphknoten(N), Fernmetastasen(M)
T0	Keine Infiltration
T1	Infiltration der Tela submucosa
T2	Infiltration der Tunica muscularis
T3	Infiltration der Subserosa
T4	Infiltration von Nachbarorganen oder des Bauchfells (Peritoneum viscerale)
N0	Keine Metastasen in den Lymphknoten
N1	Metastasen in ein bis drei perikolischen (perirektalen) Lymphknoten

Stadium	Infiltrationstiefe(T), Lymphknoten(N), Fernmetastasen(M)
N2	Metastasen in mehr als drei perikolischen (perirektalen) Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (meist Leber, Lymphknoten, Peritoneum, Lunge, Skelett, Nebenniere, Gehirn)

Tab. 24: Einteilung TNM-Klassifikation

7.1.3 UICC-Stadium

Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
I	T1/T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
IIIB	T2/T3	N1	M0
IIIC	jedes T	N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Tab. 25: Einteilung UICC-Klassifikation Kolorektales Karzinom 2002

7.1.4 Grading

Grading	Beschreibung
G1	gut differenzierte Tumoren
G2	mäßig differenzierte Tumoren
G3	schlecht differenzierte Tumoren
G4	entdifferenzierte/ undifferenzierte Tumoren

Tab. 26: Einteilung Grading gemäß WHO

7.2 Statistik

7.2.1 Tabelle Skalierung, Verteilung und Verbundenheit

Merkmal	Skalierung	Verteilung Primärtumor	Verteilung Lebermetastasen	Verbundenheit
Geschlecht	nominal			Unverbunden
Alter (in Jahren)	Verhältnis	Normal	normal	Unverbunden
Body Mass Index	Verhältnis	Normal	normal	Unverbunden
ASA - Klassifikation	ordinal			Unverbunden
Lokalisation des Primärtumors	nominal			Unverbunden
Tumor-/Lebermetastasengröße (in cm)	Verhältnis	Normal	nicht normal	Unverbunden
Anzahl der Lebermetastasen	ordinal			Unverbunden
Histologische Klassifikation Primärtumor/Lebermetastase	nominal			Unverbunden
Grading Primärtumor/Lebermetastase	ordinal			Unverbunden
pT - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
pN - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
cM - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
UICC - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
L - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
V - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
Pn - Stadium Primärtumor	ordinal			Unverbunden
CEA (carcinoembryonic antigen) präoperativ	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
CA (carbohydrate antigen) 19-9 präoperativ	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
Resektionsstatus (R)	ordinal			
Merkmal	Skalierung	Verteilung Primärtumor	Verteilung Lebermetastasen	Verbundenheit

Chemotherapie präoperativ	ordinal			Unverbunden
KRas	nominal			Unverbunden
BRaf 11	nominal			Unverbunden
BRaf 15	nominal			Unverbunden
CD44v6	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
CD45	ordinal			Unverbunden
EGF-R	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
HGF-R	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
Her2/neu	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
HLA-DR	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
IGF1-R	Verhältnis	nicht normal	nicht normal	Unverbunden
Ki67	Verhältnis	normal	normal	Unverbunden

Tab. 27: Übersicht zur Skalierung, Verteilung und Verbundenheit aller Merkmale

7.2.2 Statistische Algorithmen

Die verwendeten statistischen Tests der univariaten Analyse und ihre dafür verwendeten Algorithmen sind im Folgenden aufgeführt.

Pearson's Chi-Quadrat - Test:

$$\chi_p^2 = \sum_{ij} \frac{(f_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Die Freiheitsgrade sind $(R-1)(C-1)$ [183]

Fisher - Test:

$$\chi_c^2 = \begin{cases} \frac{W(|f_{11}f_{22} - f_{12}f_{21}| - 0.5W)^2}{r_1 r_2 c_1 c_2} & \text{if } |f_{11}f_{22} - f_{12}f_{21}| > 0.5W \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

Die Freiheitsgrade sind 1[183].

Mann Whitney U-Test: Die kombinierten Daten beider Gruppen werden sortiert und Ränge gebildet. Im Falle von Gleichheit wird mit Durchschnittsrängen gerechnet:

$$\begin{aligned} U &= \sum_{i \in G_1} \sum_{j \in G_2} f_i f_j I(x_i < x_j) + \frac{1}{2} \sum_{i \in G_1} \sum_{j \in G_2} f_i f_j I(x_i = x_j) \\ &= n_{1,f} n_{2,f} + \frac{n_{1,f}(n_{1,f}+1)}{2} - S_{1,f} \\ &= S_{2,f} - \frac{n_{2,f}(n_{2,f}+1)}{2} \end{aligned}$$

Die p-Wert – Berechnung erfolgt folgendermaßen[183]

$$p_1 = \begin{cases} \sum_{u=0}^{\lfloor U \rfloor} f_{n_{1,f}, n_{2,f}}(u) & \text{if } U \leq \frac{n_{1,f} n_{2,f} + 1}{2} \\ 1 - \sum_{u=0}^{\lfloor U \rfloor} f_{n_{1,f}, n_{2,f}}(u) & \text{if } U > \frac{n_{1,f} n_{2,f} + 1}{2} \end{cases}$$

$$p = 2p_1$$

Kruskal-Wallis-Test:

$$H = \frac{12}{N_f(N_f+1)} \sum_{i=1}^k R_{i,f}^2 n_{i,f}^{-3} (N_f+1)$$

Der einseitige p-Wert ist $p_1 = \Pr(\chi_{2k-1}^2 \geq H') = 1 - \Pr(\chi_{2k-1}^2 \leq H')$, wobei χ_{2k-1}^2 einer Chi-Quadrat-Verteilung mit $k-1$ Freiheitsgraden folgt[183].

Varianzanalyse (ANOVA): Um Durchschnittswerte für mehrere Gruppen zu vergleichen, wie das bei numerischen Variablen der Fall war, wurde die einfache Varianzanalyse verwendet. Es wird hierbei nur die erste unabhängige Variable verwendet. Angenommen man hat J unterschiedliche Gruppen, so wird die Statistik für jede Gruppe einzeln berechnet, sowie für alle Gruppenwerte zusammengenommen.

SMY_j ist die Summe der abhängigen Variable.

X_j ist der Wert der unabhängigen Variable[183]

Kaplan-Meier-Schätzer:

Er ist definiert durch:

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} = \prod_{t_{(i)} \leq t} \left(1 - \frac{d_i}{n_i} \right)$$

$S(0) = 1$

d_i = Patienten, bei denen das Ereignis zum Zeitpunkt $t_{(i)}$ eingetreten ist

n_i = Patienten zum Zeitpunkt $t_{(i)}$ unter Risiko[183]

Cox-Regressionsanalyse: Unter der Annahme des proportionalen Hazards, ist die Hazard Funktion h von t unter x gegeben: $h(t | \mathbf{x}) = h_0(t) e^{\mathbf{x}'\boldsymbol{\beta}}$

x ist ein bekannter Vektor für Regressionsvariablen, die mit dem Individuum assoziiert sind.

$\boldsymbol{\beta}$ ist ein Vektor für unbekannte Parameter

$h_0(t)$ ist die Basis Hazard Funktion für ein Individuum mit $\mathbf{x}=0$ [183]

7.2.3 Tabelle univariate Analyse nicht signifikante Ergebnisse

Primärtumoren

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
KRas	Wt/Mut	Geschlecht	m/w	0,611	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Alter	</> Median	0,123	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Alter in Jahren	---	0,339	T-Test
KRas	Wt/Mut	BMI	<18,5; -30; >30	0,547	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	BMI Wert	---	0,150	T-Test
KRas	Wt/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,295	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Lokalisation	links vs rechts	0,639	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Tumorgröße	</> 5cm	0,203	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Tumorgröße in cm	---	0,160	T-Test
KRas	Wt/Mut	Histologie	Adeno vs. muz	0,193	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Grading	1/2 vs 3/4	0,084	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,786	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	N-Stadium	0 vs 1/2	0,662	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	M-Stadium	0 vs 1	0,614	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,515	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	V-Stadium	0 vs 1	0,303	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Pn-Stadium	0 vs 1	0,923	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,812	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,729	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,935	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,784	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,497	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	CD45	0,1,2,3	0,726	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,422	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	EGF-R Prozent	---	0,424	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,223	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	HGF-R Prozent	---	0,351	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	HLA-DR	0%/>0%	0,953	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
KRas	Wt/Mut	HLA-DR Prozent	---	0,435	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	IGF1-R Prozent	---	0,432	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,512	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,454	T-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,191	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,264	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,491	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Geschlecht	m/w	0,877	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Alter	</> Median	0,614	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Alter in Jahren	---	0,715	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BMI	<18,5;-30; >30	0,663	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BMI Wert	---	0,186	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,917	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Lokalisation	links vs rechts	0,739	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Tumorgroße	</> Median	0,535	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Tumorgroße in cm	---	0,400	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Grading	1/2 vs 3/4	0,266	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,530	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	N-Stadium	0 vs 1/2	0,658	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	M-Stadium	0 vs 1	0,216	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,085	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	V-Stadium	0 vs 1	0,569	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Pn-Stadium	0 vs 1	0,722	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,323	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,848	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,542	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,575	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,901	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD45	0,1,2,/3	0,888	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,328	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	EGF-R Prozent	---	0,257	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HGF-R	≤80%/>80%	0,240	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HGF-R Prozent	---	0,556	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,630	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HLA-DR Prozent	---	0,492	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,084	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	IGF1-R Prozent	---	0,395	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,343	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,218	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,344	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,376	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,506	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
BRaf 15	Wt/Mut	Alter	</> Median	0,504	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Alter in Jahren	---	0,627	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	BMI	<18,5; -30; >30	0,110	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	BMI Wert	---	0,706	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,059	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Tumorgröße	</> Median	0,556	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Tumorgröße in cm	---	0,367	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Histologie	Adeno vs. muz	0,065	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,054	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	N-Stadium	0 vs 1/2	0,186	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	M-Stadium	0 vs 1	0,947	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,323	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	L-Stadium	0 vs 1	0,052	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	V-Stadium	0 vs 1	0,324	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Pn-Stadium	0 vs 1	0,822	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,347	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,237	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,947	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,232	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,286	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD45	0,1,2,/3	0,334	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,058	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	EGF-R Prozent	---	0,070	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,754	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HGF-R Prozent	---	0,367	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,667	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HLA-DR Prozent	---	1,000	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,291	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	IGF1-R Prozent	---	0,107	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,398	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,973	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,278	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,098	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,430	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Geschlecht	m/w	0,454	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Alter	</> Median	0,173	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Alter in Jahren	---	0,439	T-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	BMI	<18,5; -30; >30	0,833	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	BMI Wert	---	0,567	T-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	ASA	1/2 vs 3/4	0,188	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Tumorgröße	</> Median	0,888	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Tumorgröße in cm	---	0,852	T-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Histologie	Adeno vs. muz	0,362	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,596	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,969	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	M-Stadium	0 vs 1	0,273	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,896	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	L-Stadium	0 vs 1	0,065	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	V-Stadium	0 vs 1	0,832	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,308	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,154	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,449	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	R-Status	0 vs 1/2	0,362	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	CD45	0,1,2,/3	0,623	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,090	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,924	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Prozent	---	0,069	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,896	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Prozent	---	0,505	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,455	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Prozent	---	0,890	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,063	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,896	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Prozent	---	0,688	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,634	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Geschlecht	m/w	0,734	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Alter	</> Median	0,297	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Alter in Jahren	---	0,455	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	BMI	<18,5; -30; >30	0,958	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	BMI Wert	---	0,941	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	ASA	1/2 vs 3/4	0,554	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Lokalisation	links vs rechts	0,275	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Tumorgröße	</> Median	0,363	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Tumorgröße in cm	---	0,189	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Histologie	Adeno vs. muz	0,150	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Grading	1/2 vs 3/4	0,593	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,103	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	N-Stadium	0 vs 1/2	0,936	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	M-Stadium	0 vs 1	0,784	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,937	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	L-Stadium	0 vs 1	0,824	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Pn-Stadium	0 vs 1	0,952	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,499	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,568	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	R-Status	0 vs 1/2	0,313	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,640	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
CD45	0/1/2 vs 3	EGF-R Prozent	---	0,624	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,521	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HGF-R Prozent	---	0,875	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,088	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,177	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	IGF1-R Prozent	---	0,611	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,826	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Ki-67 Prozent	---	0,737	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,088	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,136	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Geschlecht	m/w	0,081	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Alter	</> Median	0,493	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Alter in Jahren	---	0,528	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	BMI	<18,5;-30; >30	0,390	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	BMI Wert	---	0,288	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	ASA	1/2 vs 3/4	0,402	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Lokalisation	links vs rechts	0,058	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Tumorgröße	</> Median	0,963	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Tumorgröße in cm	---	0,851	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Histologie	Adeno vs. muz	0,235	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,946	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,098	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	V-Stadium	0 vs 1	0,413	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,060	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,506	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,100	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,349	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Prozent	---	0,651	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,121	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Prozent	---	0,476	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,859	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Prozent	---	0,681	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,274	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Prozent	---	0,966	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,267	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Prozent	---	0,257	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,509	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Geschlecht	m/w	0,716	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Alter	</> Median	0,318	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Alter in Jahren	---	0,542	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	BMI	<18,5;-30; >30	0,419	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	BMI Wert	---	0,697	T-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	ASA	1/2 vs 3/4	0,952	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Lokalisation	links vs rechts	0,833	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße	</> Median	0,264	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße in cm	---	0,155	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Histologie	Adeno vs. muz	0,967	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Grading	1/2 vs 3/4	0,804	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,723	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,804	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	M-Stadium	0 vs 1	0,839	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,808	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	L-Stadium	0 vs 1	0,846	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	V-Stadium	0 vs 1	0,822	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,710	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,794	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,254	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	R-Status	0 vs 1/2	0,967	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,429	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	HLA-DR Prozent	---	0,405	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,602	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	IGF1-R Prozent	---	0,080	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,514	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Prozent	---	0,852	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,784	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Prozent	---	0,166	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,329	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Geschlecht	m/w	0,140	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Alter	</> Median	0,355	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Alter in Jahren	---	0,633	T-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	BMI	<18,5; -30; >30	0,973	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	BMI Wert	---	0,659	T-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	ASA	1/2 vs 3/4	0,722	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Lokalisation	links vs rechts	0,393	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Tumorgröße	</> Median	0,820	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Tumorgröße in cm	---	0,128	T-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Histologie	Adeno vs. muz	0,763	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Grading	1/2 vs 3/4	0,268	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,436	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,512	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	M-Stadium	0 vs 1	0,220	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,095	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	L-Stadium	0 vs 1	0,286	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	V-Stadium	0 vs 1	0,753	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,060	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
HLA-DR Sw**	0%/>0%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,179	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,403	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	R-Status	0 vs 1/2	0,128	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,858	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	IGF1-R Prozent	---	0,823	Mann-WhitneyU-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,280	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Ki-67 Prozent	---	0,237	T-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,064	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Geschlecht	m/w	0,326	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Alter	</> Median	0,423	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Alter in Jahren	---	0,225	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	BMI	<18,5; -30; >30	0,901	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	BMI Wert	---	0,297	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	ASA	1/2 vs 3/4	0,163	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße	</> Median	0,859	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße in cm	---	0,288	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Histologie	Adeno vs. muz	0,085	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Grading	1/2 vs 3/4	0,927	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	1,000	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,927	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	M-Stadium	0 vs 1	0,340	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,858	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	L-Stadium	0 vs 1	0,051	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	V-Stadium	0 vs 1	0,112	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,599	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	CEA löslich Sw**	Norm/path	1,000	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,228	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	R-Status	0 vs 1/2	0,176	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,789	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Prozent	---	0,644	Mann-WhitneyU-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,530	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Prozent	---	0,264	Mann-WhitneyU-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,530	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Geschlecht	m/w	0,863	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Alter	</> Median	0,141	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Alter in Jahren	---	0,015#	ANOVA
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	BMI	<18,5; -30; >30	0,607	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	BMI Wert	---	0,376	ANOVA
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	ASA	1/2 vs 3/4	0,345	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Lokalisation	links vs rechts	0,209	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Tumorgröße	</> Median	0,781	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Tumorgröße in cm	---	0,273	ANOVA
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Histologie	Adeno vs. muz	0,087	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Grading	1/2 vs 3/4	0,412	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,146	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,449	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	M-Stadium	0 vs 1	0,306	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,304	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	L-Stadium	0 vs 1	0,811	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	V-Stadium	0 vs 1	0,021#	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,055	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,179	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,917	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	R-Status	0 vs 1/2	0,438	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,136	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Prozent	---	0,067	Mann-WhitneyU-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,249	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Alter	</> Median	0,400	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Alter in Jahren	---	0,094	T-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	BMI	<18,5; -30; >30	0,138	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	BMI Wert	---	0,080	T-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	ASA	1/2 vs 3/4	0,554	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Tumorgröße	</> Median	0,267	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Histologie	Adeno vs. muz	0,126	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Grading	1/2 vs 3/4	0,802	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,436	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	N-Stadium	0 vs 1/2	0,512	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	M-Stadium	0 vs 1	0,526	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,436	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	L-Stadium	0 vs 1	0,503	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	V-Stadium	0 vs 1	0,878	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Pn-Stadium	0 vs 1	0,599	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,656	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,403	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	R-Status	0 vs 1/2	0,362	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Alter	</> Median	0,554	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Alter in Jahren	---	0,322	ANOVA
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	BMI	<18,5; -30; >30	0,139	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	BMI Wert	---	0,118	ANOVA
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	ASA	1/2 vs 3/4	0,543	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Tumorgröße	</> Median	0,572	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Tumorgröße in cm	---	0,155	ANOVA
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Histologie	Adeno vs. muz	0,410	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Grading	1/2 vs 3/4	0,436	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	T-Stadium	1/2 vs 3/4	0,501	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	N-Stadium	0 vs 1/2	0,195	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	M-Stadium	0 vs 1	0,925	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	UICC-Stadium	1/2 vs 3/4	0,380	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	L-Stadium	0 vs 1	0,386	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	V-Stadium	0 vs 1	0,596	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	Pn-Stadium	0 vs 1	0,807	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,238	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,191	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	R-Status	0 vs 1/2	0,837	Chi-Quadrat-Test

Lebermetastasen

KRas	Wt/Mut	Geschlecht	m/w	0,587	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Alter	</> Median	0,258	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Alter in Jahren	---	0,300	T-Test
KRas	Wt/Mut	BMI	<18,5; -30; >30	0,140	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	BMI Wert	---	0,355	T-Test
KRas	Wt/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,050	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Lokalisation PT	links vs rechts	0,049	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,611	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Metastasengröße	</> 5cm	0,072	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,093	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Grading	1/2 vs 3/4	0,164	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Histologie	Adeno vs. muz	0,087	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,073	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,769	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,364	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Chemo vor OP	ja/nein	0,926	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	BRaf 15	Wt/Mut	0,447	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,309	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,398	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	CD45	0,1,2,/3	0,076	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,268	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	EGF-R Prozent	---	0,248	Mann-WhitneyU-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
KRas	Wt/Mut	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,495	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	HGF-R Prozent	---	0,482	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,419	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	HLA-DR Prozent	---	0,393	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,187	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,983	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,669	T-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,640	Chi-Quadrat-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,832	Mann-WhitneyU-Test
KRas	Wt/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,311	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Geschlecht	m/w	0,720	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Alter	</> Median	0,841	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Alter in Jahren	---	0,581	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BMI	<18,5; -30; >30	0,827	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BMI Wert	---	0,518	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,470	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,466	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Metastasengröße	</> 5cm	0,423	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Tumorgröße in cm	---	0,512	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,315	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Grading	1/2 vs 3/4	0,704	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Histologie	Adeno vs. muz	0,064	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,406	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,877	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,462	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Chemo vor OP	ja/nein	0,513	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	BRaf 15	Wt/Mut	0,849	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,960	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,612	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	CD45	0,1,2,/3	0,439	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,261	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	EGF-R Prozent	---	0,160	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,417	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HGF-R Prozent	---	0,460	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,328	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	HLA-DR Prozent	---	0,476	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,417	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	IGF1-R Prozent	---	0,392	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,757	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,513	T-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,091	Chi-Quadrat-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,212	Mann-WhitneyU-Test
KRas wt+G13D	Wt+G13D/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,000#	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
BRaf 15	Wt/Mut	Geschlecht	m/w	0,430	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Alter	</> Median	0,431	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Alter in Jahren	---	0,473	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	BMI	<18,5;-30; >30	0,911	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	BMI Wert	---	0,932	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	ASA	1/2 vs 3/4	0,534	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Lokalisation PT	links vs rechts	0,501	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	----	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Metastasengröße	</> 5cm	0,574	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Tumorggröße in cm	---	0,255	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Grading	1/2 vs 3/4	0,436	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Histologie	Adeno vs. muz	0,729	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,261	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	R-Status	0 vs 1/2	0,048#	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Chemo vor OP	ja/nein	0,117	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	0,330	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD44v6 Prozent	---	0,414	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	CD45	0,1,2,/3	0,588	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,430	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	EGF-R Prozent	---	0,138	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,569	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HGF-R Prozent	---	0,448	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,493	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	HLA-DR Prozent	---	0,702	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,569	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	IGF1-R Prozent	---	0,724	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,696	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Ki-67 Prozent	---	0,762	T-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,237	Chi-Quadrat-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Prozent	---	0,807	Mann-WhitneyU-Test
BRaf 15	Wt/Mut	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,235	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Geschlecht	m/w	0,239	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Alter	</> Median	0,908	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Alter in Jahren	---	0,949	T-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	BMI	<18,5;-30; >30	0,509	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	BMI Wert	---	0,278	T-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	ASA	1/2 vs 3/4	0,344	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,928	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,072	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Metastasengröße	</> 5cm	0,114	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	1,000	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Grading	1/2 vs 3/4	0,120	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Histologie	Adeno vs. muz	0,389	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	CEA löslich Sw**	Norm/path	1,000	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	R-Status	0 vs 1/2	0,219	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Chemo vor OP	ja/nein	0,436	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	CD45	0,1,2,/3	0,493	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,711	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	EGF-R Prozent	---	0,259	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,116	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,860	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Prozent	---	0,754	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,942	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	IGF1-R Prozent	---	0,418	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,094	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,056	Chi-Quadrat-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Prozent	---	0,134	Mann-WhitneyU-Test
CD44v6 Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,203	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Geschlecht	m/w	0,440	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Alter	</> Median	0,259	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Alter in Jahren	---	0,284	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	BMI	<18,5; -30; >30	0,574	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	BMI Wert	---	0,738	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	ASA	1/2 vs 3/4	0,982	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,437	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Metastasengröße	</> 5cm	0,361	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Tumorgröße in cm	---	0,211	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,424	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Grading	1/2 vs 3/4	0,315	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Histologie	Adeno vs. muz	0,652	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,452	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	R-Status	0 vs 1/2	0,160	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Chemo vor OP	ja/nein	0,485	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	EGF-R Sw**	≤50%/>50%	0,734	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	EGF-R Prozent	---	0,816	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,757	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HGF-R Prozent	---	0,058	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,819	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	HLA-DR Prozent	---	0,903	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,342	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	IGF1-R Prozent	---	0,725	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Ki-67 Prozent	---	0,220	T-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,621	Chi-Quadrat-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Her2/neu Prozent	---	0,815	Mann-WhitneyU-Test
CD45	0/1/2 vs 3	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,888	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Geschlecht	m/w	0,815	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Alter	</> Median	0,642	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Alter in Jahren	---	0,716	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	BMI	<18,5;-30; >30	0,084	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	ASA	1/2 vs 3/4	0,826	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,061	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,657	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Metastasengröße	</> 5cm	0,370	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Tumorgröße in cm	---	0,146	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,883	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Grading	1/2 vs 3/4	0,213	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Histologie	Adeno vs. muz	0,257	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,080	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,187	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	R-Status	0 vs 1/2	0,831	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Chemo vor OP	ja/nein	0,712	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HGF-R Sw**	≤80%/>80%	0,053	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,285	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	HLA-DR Prozent	---	0,187	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,411	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Ki-67 Prozent	---	0,244	T-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,955	Chi-Quadrat-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Prozent	---	0,788	Mann-WhitneyU-Test
EGF-R Sw**	≤50%/>50%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,805	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Geschlecht	m/w	0,714	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Alter	</> Median	0,713	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Alter in Jahren	---	0,676	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	BMI	<18,5;-30; >30	0,695	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	BMI Wert	---	0,626	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	ASA	1/2 vs 3/4	0,077	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,310	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,988	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße in cm	---	0,185	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,424	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Grading	1/2 vs 3/4	0,575	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Histologie	Adeno vs. muz	0,652	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,855	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	R-Status	0 vs 1/2	0,481	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Chemo vor OP	ja/nein	0,383	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	HLA-DR Sw**	0%/>0%	0,671	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	HLA-DR Prozent	---	0,410	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,311	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	IGF1-R Prozent	---	0,233	Mann-WhitneyU-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,907	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Prozent	---	0,527	T-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,462	Chi-Quadrat-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Prozent	---	0,334	Mann-WhitneyU-Test
HGF-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,774	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Geschlecht	m/w	0,495	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Alter	</> Median	0,061	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Alter in Jahren	---	0,102	ANOVA
HLA-DR Sw**	0%/>0%	BMI	<18,5;-30; >30	0,022	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	BMI Wert	---	0,030	ANOVA
HLA-DR Sw**	0%/>0%	ASA	1/2 vs 3/4	0,861	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,134	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,282	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Metastasengröße	</> 5cm	0,960	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Tumorgröße in cm	---	0,665	Kruskal-Wallis-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,437	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Grading	1/2 vs 3/4	0,302	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Histologie	Adeno vs. muz	0,377	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,495	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,209	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	R-Status	0 vs 1/2	0,764	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Chemo vor OP	ja/nein	0,282	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	0,372	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	IGF1-R Prozent	---	0,448	Mann-WhitneyU-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,484	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Ki-67 Prozent	---	0,590	T-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,412	Chi-Quadrat-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Her2/neu Prozent	---	0,343	Mann-WhitneyU-Test
HLA-DR Sw**	0%/>0%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,436	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Geschlecht	m/w	0,622	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Alter	</> Median	0,508	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Alter in Jahren	---	0,335	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	BMI	<18,5;-30; >30	0,626	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	BMI Wert	---	0,738	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	ASA	1/2 vs 3/4	0,485	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,405	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,131	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Metastasengröße	</> 5cm	0,659	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Tumorgröße in cm	---	0,433	Mann-WhitneyU-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,904	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Grading	1/2 vs 3/4	0,315	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Histologie	Adeno vs. muz	0,164	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,285	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,877	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	R-Status	0 vs 1/2	0,381	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Chemo vor OP	ja/nein	0,514	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	0,586	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Ki-67 Prozent	---	0,713	T-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,692	Chi-Quadrat-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Prozent	---	0,730	Mann-WhitneyU-Test
IGF1-R Sw**	≤80%/>80%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,908	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Geschlecht	m/w	0,052	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Alter	</> Median	0,219	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Alter in Jahren	---	0,120	ANOVA
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	BMI	<18,5;-30; >30	0,764	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	BMI Wert	---	0,392	ANOVA
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	ASA	1/2 vs 3/4	0,912	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,304	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,326	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Metastasengröße	</> 5cm	0,299	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Tumorgröße in cm	---	0,273	Kruskal-Wallis-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,834	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Histologie	Adeno vs. muz	0,391	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,914	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,166	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	R-Status	0 vs 1/2	0,500	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Chemo vor OP	ja/nein	0,073	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Sw**	0%/>0%	0,266	Chi-Quadrat-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Prozent	---	0,348	Mann-WhitneyU-Test
Ki-67 Index	0%/≤30%/>30%; ≤60%/>60%	Her2/neu Score	0vs1vs2vs3	0,555	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Geschlecht	m/w	0,349	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Alter	</> Median	0,970	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Alter in Jahren	---	0,587	T-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	BMI	<18,5;-30; >30	0,297	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	BMI Wert	---	0,051	T-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	ASA	1/2 vs 3/4	0,545	Chi-Quadrat-Test

Merkmal 1	Gruppierung1	Merkmal 2	Gruppierung2	p-Wert	stat. Testverfahren
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Lokalisation PT	links vs rechts	0,346	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,432	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Metastasengröße	</> 5cm	0,827	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Tumorgröße in cm	---	0,355	Mann-WhitneyU-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,512	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Grading	1/2 vs 3/4	0,833	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Histologie	Adeno vs. muz	0,645	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,946	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,402	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	R-Status	0 vs 1/2	0,982	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Sw**	0%/>0%	Chemo vor OP	ja/nein	0,250	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Geschlecht	m/w	0,716	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Alter	</> Median	0,612	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Alter in Jahren	---	0,292	ANOVA
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	BMI	<18,5; -30; >30	0,669	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	BMI Wert	---	0,284	ANOVA
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	ASA	1/2 vs 3/4	0,305	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Lokalisation PT	links vs rechts	0,424	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	FongScore	0/1/2 vs 3/4/5	0,342	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Metastasengröße	</> 5cm	0,833	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Tumorgröße in cm	---	0,778	Kruskal-Wallis-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Anzahl Metastasen	1 vs >1	0,843	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Grading	1/2 vs 3/4	0,350	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Histologie	Adeno vs. muz	0,018	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	CEA löslich Sw**	Norm/path	0,211	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	CA 19-9 löslich Sw**	Norm/path	0,409	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	R-Status	0 vs 1/2	0,388	Chi-Quadrat-Test
Her2/neu Score	0 vs 1 vs 2 vs 3	Chemo vor OP	ja/nein	0,550	Chi-Quadrat-Test

Tab. 28: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse in der Univariatanalyse für Primärtumoren und Lebermetastasen; # trotz Unterschreiten des Signifikanzniveaus mit $p < 0,05$ wird in diesem Fall keine positive Korrelation angenommen, da die Gruppen zu klein oder die Fallzahl zu gering ist, so dass hierbei nicht von einer relevanten Korrelation ausgegangen werden darf.

7.2.4 Kreuztabellen für Chi²-Tests der Univariatanalyse

Primärtumoren:

L-Stadium * Kras_Status Kreuztabelle

Anzahl

		Kras_Status		Gesamt
		1	2	
L-Stadium	L0	36	18	54
	L1	16	0	16
Gesamt		52	18	70

Kras_Status * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

		Braf15		Gesamt
		Wildtyp	mutiert	
Kras_Status	Wildtyp	56	15	71
	mutiert	37	0	37
Gesamt		93	15	108

Kras_Status * IGF1-R Primärtumor cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		IGF1-R cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
Kras_Status	Wildtyp	17	37	54
	mutiert	17	14	31
Gesamt		34	51	85

KraswtG13D * cHistologie Kreuztabelle

Anzahl

		Histologie		Gesamt
		Adeno-Ca	Muzinös	
KraswtG13D	wt+G13D	71	7	78
	Andere Mutationen	22	7	29
Gesamt		93	14	107

KraswtG13D * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

		Braf15		Gesamt
		Wildtyp	Mutiert	
KraswtG13D	wt+G13D	64	15	79
	Andere Mutationen	29	0	29
Gesamt		93	15	108

KraswtG13D * L-Stadium Kreuztabelle

Anzahl

		L-Stadium		Gesamt
		L0	L1	
KraswtG13D	wt+G13D	42	16	58
	Andere Mutationen	12	0	12
Gesamt		54	16	70

Geschlecht * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

		Braf15		Gesamt
		Wildtyp	mutiert	
Geschlecht	Männlich	57	5	62
	Weiblich	36	10	46
Gesamt		93	15	108

ASA * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

	Braf15		Gesamt
	Wildtyp	mutiert	
ASA 1 / 2	56	13	69
ASA 3 / 4	35	2	37
Gesamt	91	15	106

Lokalisation * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

	Braf15		Gesamt
	Wildtyp	mutiert	
Lokalisation rechts	42	13	55
Lokalisation links	51	2	53
Gesamt	93	15	108

Grading * Braf15 Kreuztabelle

Anzahl

	Braf15		Gesamt
	Wildtyp	mutiert	
Grading 1 / 2	68	5	73
Grading 3 / 4	25	10	35
Gesamt	93	15	108

Lokalisation * IGF1-R_Primärtumor Kreuztabelle

Anzahl

		IGF1-R Primärtumor cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
Lokalisation	rechts	21	19	40
	links	13	32	45
Gesamt		34	51	85

Geschlecht * HER2/neu Primärtumor cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		cHER2/neu_a_Proz		Gesamt
		1,00	2,00	
Geschlecht	Männlich	34	14	48
	Weiblich	15	22	37
Gesamt		49	36	85

Geschlecht * HER2/neu_Primärtumor_Score Kreuztabelle

Anzahl

		HER2/neu_Score				Gesamt
		0	1	2	3	
Geschlecht	männlich	34	1	10	3	48
	weiblich	15	2	11	9	37
Gesamt		49	3	21	12	85

Lokalisation * HER2/neu_Primärtumor cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		HER2/neu_Primärtumor cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
Lokalisation	Rechts	28	12	40
	Links	21	24	45
Gesamt		49	36	85

cLokalisation * HER2_a_Score Kreuztabelle

Anzahl

		HER2/neu_a_Score				Gesamt
		0	1	2	3	
Lokalisation	Rechts	28	0	11	1	40
	Links	21	3	10	11	45
Gesamt		49	3	21	12	85

HLADR_Primärtumor cutoff* HER2/neu_Primärtumor cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		HER2/neu Primärtumor cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
HLADR Primärtumor	1,00	15	21	36
	2,00	34	15	49
Gesamt		49	36	85

Lebermetastasen:

Durchmesser_Metastase_5cm * HGF-R_cutoff Lebermetastasen Kreuztabelle

Anzahl

		HGFR LM cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
Durchmes- ser_Metastase_5cm	Metastasendurchmesser < 5cm	8	35	43
	Metastasendurchmesser > 5cm	6	7	13
Gesamt		14	42	56

BMI_3Gruppen * HLADR Lebermetasetasen cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		HLADR_cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
Body Mass Index	BMI < 18,5	0	2	2
	BMI 18,5 - 30	33	16	49
	BMI > 30	7	0	7
Gesamt		40	18	58

CA19-9 * HGF-R Lebermetastasen cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		HGF-R Lebermetastasen cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
CA-19-9	Norm	11	20	31
	pathologisch	2	23	25
Gesamt		13	43	56

Histologie Lebermetastase * HER2/neu_c_Score Kreuztabelle

Anzahl

		HER2/neu_Score				Gesamt
		0	1	2	3	
Histologie	Muzinös	4	1	1	0	6
	Adeno-Ca	29	0	10	12	51
Gesamt		33	1	11	12	57

Grading Lebermetastasen * KI67_Labeling Index Kreuztabelle

Anzahl

		KI67_LI				Gesamt
		,00	1,00	2,00	3,00	
GradingLM	1 / 2	6	4	18	4	32
	3 / 4	1	2	6	10	19
Gesamt		7	6	24	14	51

EGF-R_cutoff* IGF1-R_cutoff Kreuztabelle

Anzahl

		IGF1-R_cutoff		Gesamt
		1,00	2,00	
EGF-R_cutoff	1,00	10	13	23
	2,00	4	32	36
Gesamt		14	45	59

7.2.5 Tabelle Überleben nichtsignifikante Ergebnisse Primaria

Merkmal mit Gruppenbildung	Signifikanz des Log-Rank (Mantel Cox)	
	Gesamtüberleben	Tumorsp. Überleben
Geschlecht männlich vs. weiblich	p=0,866	p=0,377
Alter (in Jahren) größer vs. kleiner Durchschnitt	p=0,429	p=0,266
Body Mass Index <18,5; 18,5 – 30; >30 kg/m ²	p=0,849	p=0,707
ASA – Klassifikation ASA1/2 vs. ASA3/4	p=0,543	p=0,207
Lokalisation Primärtumor rechtes vs. linkes Kolon	p=0,845	p=0,634
Tumorgröße (in cm) größer vs. kleiner Durchschnitt	p=0,666	p=0,903
Histologie Adenokarzinom vs. muzinös	p=0,490	p=0,731
pT - Stadium T1/2 vs. T3/4	p=0,140	p=0,070
KRas Wildtyp vs. mutiert	p=0,908	p=0,943
KRas Wildtyp+G13D vs. mutiert	p=0,840	p=0,704
BRaf 15 Wildtyp vs. mutiert	p=0,183	p=0,075
CD44 ≤80% positiver Tumorzellen vs. >80%	p=0,142	p=0,092
CD45 Intensität 0/1/2 vs. Intensität 3	p=0,600	p=0,395
HGF-R <100% positiver Tumorzellen vs. =100%	p=0,399	p=0,655
Her2/neu neg. Tumorzellen vs positiv	p=0,895	p=0,988
Her2/neu Score 0 vs 1 vs 2 vs 3	p=0,620	p=0,606
HLA-DR negative Tumorzellen vs. positiv	p=0,478	p=0,668
IGF1-R <100% positiver Tumorzellen vs. =100%	p=0,849	p=0,437
Ki67 labeling Index	p=0,236	p=0,130

Tab. 29: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse im Kaplan-Meier-Schätzer für Primärtumoren. Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben

7.2.6 Tabelle Überleben nichtsignifikante Ergebnisse Lebermetastasen

Merkmal mit Gruppenbildung	Signifikanz des Log-Rank (Mantel Cox)	
	Gesamtüberleben	Tumorsp. Überleben
Fong Score cutoff (0/1/2 vs 3/4/5)	p=0,492	p=0,170
Zeit bis Metastasierung	p=0,742	p=0,518
N-Stadium Primarius (N0 vs N1/2)	p=0,569	p=0,139
CEA 200ng/ml cutoff	p=0,487	p=0,297
Anzahl Lebermetastasen (n=1 vs n>1)	p=0,859	p=0,796
Geschlecht männlich vs. weiblich	p=0,992	p=0,899
Alter (in Jahren) größer vs. kleiner Durchschnitt	p=0,788	p=0,794
Body Mass Index <18,5; 18,5 - 30; >30 kg/m ²	p=0,407	p=0,198
ASA - Klassifikation ASA1/2 vs. ASA3/4	p=0,341	p=0,749
Präoperative Chemotherapie	p=0,645	p=0,977
Lokalisation Primärtumor rechtes vs. linkes Kolon	p=0,370	p=0,312
Histologie Primarius (Adeno-Ca vs muzinös)	p=0,373	p=0,400
T-Stadium Primarius (T1/2 vs T3/4)	p=0,747	p=0,900
M -Stadium Primarius (M0 vs M1)	p=0,211	p=0,445
UICC Primarius (UICC 1/2 vs 3/4)	p=0,133	p=0,200
Histologie Lebermetastase Adenokarzinom vs. muzinös	p=0,656	p=0,476
CEA präoperativ (normwertig vs pathologisch)	p=0,657	p=0,541
CA19-9 präoperativ (normwertig vs pathologisch)	p=0,076	p=0,114
KRas Wildtyp vs. mutiert	p=0,706	p=0,864
KRas Wt/G13D Wildtyp+G13D vs. mutiert	p=0,628	p=0,465
BRaf 15 Wildtyp vs. mutiert	p=0,011	p=0,001*

Merkmal mit Gruppenbildung	Signifikanz des Log-Rank (Mantel Cox)	
	Gesamtüberleben	Tumorsp. Überleben
CD45 Intensität 0/1/2 vs. Intensität 3	p=0,205	p=0,307
HGF-R <100% positiver Tumorzellen vs. =100%	p=0,816	p=0,693
HLA-DR negative Tumorzellen vs. positiv	p=0,210	p=0,477
IGF1-R <100% positiver Tumorzellen vs. =100%	p=0,347	p=0,539
Ki67 labeling Index	p=0,126	p=0,223

Tab. 30: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse im Kaplan-Meier-Schätzer für Lebermetastasen. Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben; *) bei n=1 Braf15-Mutationen ist die Korrelation zu vernachlässigen

7.3 Immunhistochemie

7.3.1 Material

Aceton Emprove® exp	Merck, Darmstadt
AB-Serum	Biochrom AG, Berlin
PBS-Lösung	Biochrom AB, Berlin
Avidin-biotin-blocking-kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
biotinylierter Sekundärantikörper	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
HRP-Streptavidin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
AEC-Peroxidase-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Mayer's Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Seren	siehe Tabelle 31
Antikörper	siehe Tabelle 32

	Seren	Stamm-konz. mg/ml	Hersteller
1	Ziegenserum X0907	Aliq. von 40µg/ml (Vial: 91)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
2	Hasenserum X0936	Alliq. von 15µg/ml (Vial: 15)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

Tab. 31: Übersicht verwendeter Seren

7.3.2 Methodik

Bei der durchgeführten Immunhistochemie handelt es sich um die Labelled Streptavidin-Biotin-Methode, kurz LSAB. Dabei wird ein Antikörpergerüst basierend auf dem zu erforschenden Antigen nach und nach aufgebaut, das mittels der Peroxidasereaktion sichtbar gemacht wird (siehe Abb. 31/32). Daraus resultiert ein komplexer Färbeablauf[184-187].

Die bereits vorgefertigten, beschrifteten und über Nacht bei Raumtemperatur getrockneten Gefrierschnitte (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden zu Beginn für 8 Minuten in reinem Aceton fixiert und für weitere 8 Minuten staubfrei bei Raumtemperatur getrocknet.

Anschließend wurden die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 10-prozentigen AB-Serum-PBS-Lösung (1ml AB-Serum in 9ml PBS) rehydriert und somit auch die endogene Gewebeperoxidase blockiert, damit diese bei der späteren Peroxidasereaktion keine unspezifische Färbung zeigen kann.

In zwei weiteren je 15-minütigen Inkubationsschritten wurde mittels dem Avidin-biotin-blocking-kit endogenes Avidin und Biotin blockiert.

Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von dem spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper für weitere 30 Minuten. Schließlich wurde das HRP-Streptavidin für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Im Falle von IGF1-R und HGF-R wurden der Sekundärantikörper und das Streptavidin mittels eines Verstärker-Kits durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug für jedes Reagenz 10 Minuten.

Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger vorsichtig in PBS-Lösung dreimalig für insgesamt 3x5 Minuten gewaschen.

Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur die achtminütige Färberreaktion der Präparate in frisch angesetzter AEC-Peroxidase-Lösung in einer abgedunkelten Färbeküvette. Schließlich wurden die Präparate 10 Sekunden mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und unter fließendem Wasserbad gebläut.

Zuletzt wurden die getrockneten Objektträger mit Kaiser's Glyceringelatine und Objektgläsern zur Versiegelung eingedeckt.

7.3.2.1 Antikörper

Nach oben beschriebener Methodik wurden folgende Antikörper aus Tabelle 29 nachgewiesen. Bei allen Färbungen liefen zu jedem Antikörper Zytospinpräparate von Zelllinien als Positivkontrollen mit, um die Funktionsfähigkeit der Färbung und der Antikörper zu überwachen. Nur wenn diese Färbungen zufrieden stellende Ergebnisse lieferten, konnte der Färbezyklus als erfolgreich gewertet werden. Zudem wurden MOPC-21, UPC-10, DA1E, Hasen-/u. Ziegen Serum (siehe Tabelle 28/29) als Negativkontrollen mitgefärbt, um bei der Auswertung die Echtheit der Färbungen zu kontrollieren.

Antigen	Antikörper	Isotyp	Arbeits- konz.	Stamm- konz.	Ver- dünnung	Positiv- kontrolle	Anzahl positiver Zellen	Färbe- intensität	Färbemuster	Hersteller,
			µg/ml	mg/ml			%	++ / + /± / - (3/2/1/0)		
MOPC-21	MOPC-21	IgG1		1						Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fruktosan	UPC-10	IgG2a		1						Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hase mAb, Isotyp Kontrolle	DA1E	IgG		2,5						Cell Signalling, Boston, USA
EpCAM (CD326)	Ber-EP4	IgG1	2,5	0,18	1:72	HT29	98	++ / + / ±	membranständig	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Zytokeratin	KL1	IgG1	0,32	0,127	1:400	HT29	98	++ / ±	stark cytoplas- matisch; bei ++ auch nukleär	Beckmann Coulter Deutschland GmbH, Krefeld
Ki67	MIB-1	IgG1	1,14	0,035	1:30	HT29	40	++ / +	nukleär Hämalaun nur kurz!	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
CD45	2B11/PD7	IgG1	4,5	0,3	1:67	<i>Leukozyten</i>	100	±	membranständig	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

HLA-DR	B8.12.2	IgG2b	4	0,2	1:50	HL60	60	+	cytoplasmatisch + membranständig	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD44v6	VFF-18	IgG1	1	1	1:1000	HT29	98	+/ \pm	membranständig	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Her2/neu	CB11	IgG1	1,5	0,026	1:17	N87	100	+	membranständig	Leica Biosystems, Wetzlar
Her2/neu	4B5	monoklonal Hase	1,5	0,006	1:4	N87	100	+	membranständig	Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA
EGF-R	H11	IgG1	2,94	0,273	1:93	HT29, (N87)	98	+ / \pm	cytoplasmatisch, membranständig	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
IGF1-R (CD221)	24-31	IgG1	4	0,1	1:25	CaCo-2, (HT29)	100	++	membranständig	Abcam, Cambridge, UK
HGF-R (c-Met)	213-0492	Polyklonal, Hase	2,5	0,5	1:200	HCT116, (DLD-1)	80	+/ \pm	cytoplasmatisch, Oberfläche	Cytomed GmbH, Baden Baden

Tab. 32: Liste der verwendeten Antikörper mit zugehörigen Arbeitskonzentrationen, Stammkonzentrationen (vom Hersteller ausgegeben), Verdünnungen, der verwendeten Positivkontrollen; die Anzahl der positiven Zellen der Positivkontrollen, sowie die Färbeintensität und das Anfärbemuster

7.3.2.2 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Antikörpernachweise erfolgte semiquantitativ und qualitativ unter dem Lichtmikroskop. *Der prozentuale Anteil wurde semiquantitativ auf dem gesamten Tumorschnitt ermittelt.* Zusätzlich wurde die Intensität der Färbung erfasst und je nach Stärke aufsteigend von 0 – 3 (keine, schwach, moderat, stark) beschrieben. Für Ki67 wurde zusätzlich auf 5 repräsentativen Tumorabschnitten jeweils ein Foto in einer Auflösung von 1292x968 erstellt und auf einer Fläche von 250x250µm der Anteil der positiven Tumorzellen ermittelt.

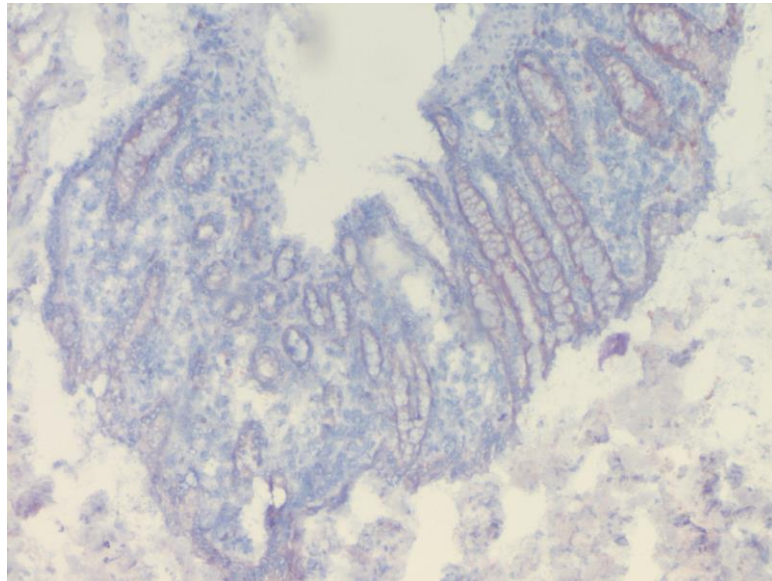


Abb. 38: Mukosa gefärbt mit HGF-R-Antikörper, 100-fach vergrößert, zur Verfügung gestellt von Melanie Zoller

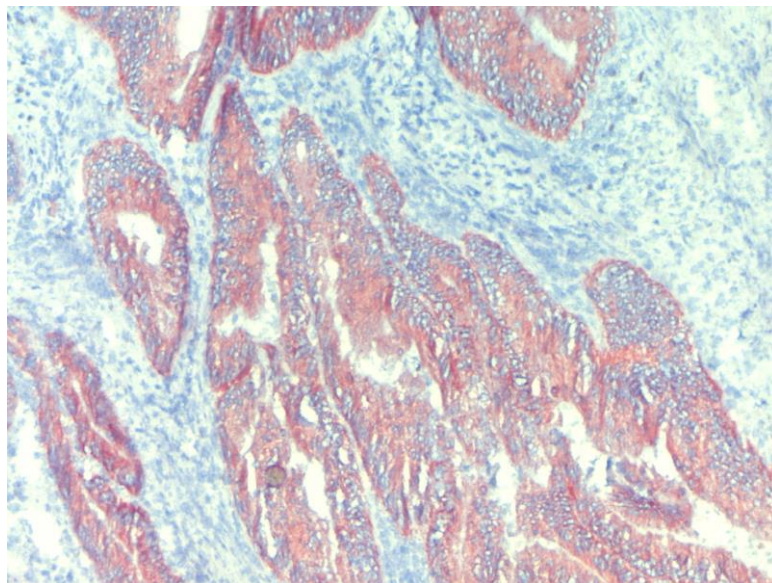


Abb. 39: Primärtumor gefärbt mit HGF-R-Antikörper, 100-fach vergrößert, zur Verfügung gestellt von Melanie Zoller

7.3.3 Festlegung der Schwellenwerte

Zunächst wurden für die einzelnen Marker gemeinsame Schwellenwerte für Primärtumoren und Lebermetastasen definiert um eine Gruppenbildung für die statistische Auswertung zu ermöglichen. Hierzu wurden zunächst Verteilungsdiagramme (s. Abbildung 15/16) erstellt, was eine bessere Abschätzung der prozentualen Verteilung positiver Tumorzellen ermöglichte. Die Schwellenwerte waren wie folgt definiert (s. Tabelle 33):

Marker	Schwellenwert
CD44v6	≤50% vs. >50% positiver Tumorzellen
CD45	Infiltrat tumorassoziertem Bindegewebe 0/1/2 vs. 3
EGF-R	≤50% vs. >50% positiver Tumorzellen
Her2/neu	0% vs. >0% positiver Tumorzellen
HGF-R	≤80% vs. >80% positiver Tumorzellen
HLA-DR	0% vs. >0% positiver Tumorzellen
IGF1-R	≤80% vs. >80% positiver Tumorzellen
Ki67	≤30% vs. >30% positiver Tumorzellen

Tab. 33: Schwellenwerte der immunhistochemischen Marker

7.3.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Methodik und Auswertung wurden von Thomas Singer und Melanie Zoller der AG Metastasierung der chirurgischen Forschung des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt.

Für CD45 wurde das Infiltrat des tumorassozierten Bindegewebes bewertet und hierzu in ein Schema von 0 (=kein Infiltrat) bis 3 (=sehr starkes Infiltrat) eingeordnet. Zur statistischen Auswertung erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen. Sie wurde in 0/1/2 zusammengefasst und 3 gegenübergestellt. Es zeigte sich ein Verteilungsmuster von n=50 (58,8%) für die Intensität 0/1/2 und von n=35 (41,2%) für Intensität 3 bei den Primärtumoren. Die Lebermetastasen wiesen in 76,3% (n=45) der Patientenproben eine Intensität 0/1/2 und in 23,7% eine Intensität 3 auf.

Bei EGF-R wurde der Schwellenwert bei kleiner gleich 50% positiver Tumorzellen vs. größer 50% festgelegt. Somit wurde ein Prozentsatz von 45,9% Gruppe 1 (n=39 mit $\leq 50\%$ positiver Tumorzellen) und 54,1% (n=46) Gruppe 2 ($>50\%$ positiv gefärbter Tumorzellen) bei den Primärtumoren zugeordnet. Wenn man die Lebermetastasen betrachtet, waren n=23 (39,0%) in Gruppe 1 und n=36 (61,0) in Gruppe 2 verteilt.

Für Her2/neu wurde entsprechend der Auswertung durch die Pathologie für das Mammakarzinom, sowie für das Magenkarzinom (s.u.) ein Score von 0-3 gebildet. Ebenso wurde die prozentuale Verteilung der positiv gefärbten Tumorzellen berücksichtigt und ein Schwellenwert von 0% vs $>0\%$ festgelegt. Es zeigte sich, dass bei den Primärtumoren 57,6% (n=49) Her2/neu negativ und 42,4% (n=36) positiv gefärbt waren. Das zudem erstellte Schema von 0-3 war wie folgt verteilt: in der Gruppe 0 befanden sich 57,6% (n=49) der Patienten. Auf Gruppe 1 entfielen 3,5% (n=3), auf Gruppe 2 24,7% (n=21) und auf Gruppe 3 14,1% (n=12) aller ausgewerteten Patientenproben.

In der Gruppe der Lebermetastasen waren bei n=34 (58,6%) der Proben keine Her2/neu positiven Zellen erkennbar, bei n=24 (41,4%) hingegen schon. Daraus ergab sich für die Rangfolge des Auswertungssystems für n=34 (58,6%) ein Wert von 0, n=1 Patient (1,7%) kam auf einen Wert von 1, n=11 Patienten (19,0%) wurden in Gruppe 2 eingeordnet und n=12 der Patientenproben (20,7%) erreichten den Höchstwert von 3 Punkten.

Während das Auswertungs-System für das Mammakarzinom nur auf einer Färbung beruht, welche die komplette Zirkumferenz der Membran anfärbt (Wolff et al. 2007) und nur bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt wird, beurteilt das Magenkarzinom - Auswertungs - System eine komplette basolaterale oder laterale Membranfärbung als spezifisch [188], indem eine objektive Regel angewendet wird[189]. Der höchste Auswertungs-Punkt auf der Objektträgerprobe wird angenommen. Andere Färbemuster werden als nicht spezifisch angesehen. Beide Auswertungen, also sowohl für Mammakarzinom als auch für das Magenkarzinom wurden in die Auswertung mit einbezogen, denn aktuell liegt für das Kolorektale Karzinom noch kein Auswertungs-System vor

Für den Marker c-Met (HGF-R) wurde der Schwellenwert bei 80% festgelegt. Es ergab sich unter den Primärtumoren somit folgendes Verteilungsbild: n=20 Patienten (23,5%) wiesen $\leq 80\%$ und n=65 (76,5%) $>80\%$ positiv gefärbter Tumorzellen auf. Bei den Lebermetastasen zeigte sich ein ähnliches Bild. 25,4% (n=15) Proben waren $\leq 80\%$ und in 74,6% (n=44) färbten sich mehr als 80% der Tumorzellen positiv an.

Der Entzündungsmarker/Aktivierungsmarker HLA-DR wurde zunächst mit dem Schwellenwert 0% definiert. Bei den Primärtumoren wiesen 42,4% (n=36) keine Färbung mit HLA-DR Antikörper auf, wohingegen 57,6% (n=49) positiv waren. Bei den Lebermetastasen war der Anteil der Patienten mit negativem Färbergebnis mit 69,0% (n=40) etwas

höher. Positiv angefärbte Proben wiesen 31,0% (n=18) der untersuchten Gewebeproben auf.

Ein weiterer Wachstumsfaktor, IGF1-R wurde wie c-Met ebenfalls mit einem Schwellenwert von $\leq 80\%$ und $> 80\%$ positiver Tumorzellen definiert. Dabei wiesen 60,0% der Proben der Primärtumoren (n=51) in mehr als 80% der Tumorzellen eine Antikörperreaktion auf. In 40,0% (n=34) der Proben konnte das Oberflächenprotein IGF1-R zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz ($< 80\%$) detektiert werden. Die Verteilung der Lebermetastasen zeigte mit 76,3% (n=45) für die Gruppe $> 80\%$ und 23,7% für die Gruppe $\leq 80\%$ eine etwas stärkere Expression des membranständigen Proteins.

Für den Proliferationsmarker Ki67 wurde ein Proliferationsindex erstellt. Hierbei wurden für jeden Antikörper auf 5 repräsentativen Tumorabschnitten jeweils ein Foto in 20 - facher Vergrößerung erstellt und auf einer Fläche von $250 \times 250 \mu\text{m}$ der Anteil der positiven Tumorzellen/Zellkerne ermittelt. Positive Tumorzellen wurden ausgewertet und 4 Gruppen zugeordnet: Gruppe 1 beinhaltet alle negativen Tumorproben. Gruppe 2 alle Patienten mit positiven Tumorzellen zwischen 0% und $\leq 30\%$. Gruppe 3 ist zwischen $> 30\%$ und $\leq 60\%$ der positiven Tumorzellen definiert, und Gruppe 4 bei $> 60\%$. Die Primärtumoren in Gruppe 1 machten 20% (n=17) aus, in Gruppe 2 waren es 16,5% (n=14). In Gruppe 3 waren 37,6% (n=32) und in Gruppe 4 25,9% (n=22) der Patienten vertreten. Die Lebermetastasen zeigten eine sehr ähnliche Verteilung: 18,6% (n=11) wurden Gruppe 1, 15,3% (n=9) Gruppe 2, 40,7% (n=24) Gruppe 3 und 25,4% (n=15) wurden Gruppe 4 zugeordnet.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Andreas Georg Bogner

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von Biomarkern beim kolorektalen Karzinom und seinen Lebermetastasen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.05.2013

7.5 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Zusammensetzung des DNA Mikro Kits
- Tab. 2: Übersicht der für die Pyrosequenzierung benötigten Substanzen
- Tab. 3: Verwendete Tumorzelllinien und ihre Herkunft
- Tab. 4: beteiligte Kliniken, geordnet nach Häufigkeit der Tumorproben
- Tab. 5: PCR-Primer mit Basensequenz:
- Tab. 6: Sequenzierungsprimer mit Basensequenz
- Tab. 7: PCR-Programm: „DANIEL 50“ Gesamtdauer: 145min / 2h25min
- Tab. 8: Überblick über die verwendeten statistischen Testverfahren
- Tab. 9: Ergebnisse der photometrischen DNS-Bestimmung
- Tab. 10: Ergebnis der Sequenzierung von KRas Exon 1 Codon 12/13, BRaf Exon 11 + Exon 15 für Zelllinien.
- Tab. 11: Patientenkollektivbeschreibung für Primärtumoren
- Tab. 12: Patientenkollektivbeschreibung für Lebermetastasen
- Tab. 13: Häufigkeiten und Verteilung der detektierten Kras-Mutationen bei Primärtumoren und Lebermetastasen bezogen auf die Gesamtheit aller Kras-mutierten Patienten
- Tab. 14: Übersicht statistisch signifikanter Korrelation bei Primärtumoren und Lebermetastasen.
- Tab. 15: univariate signifikante Korrelation zwischen Ki67, EGF-R, IGF-R, HGF-R, BRaf15 und KRas bei Primärtumoren; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test.
- Tab. 16: weitere univariate signifikante Korrelation bei Primärtumoren; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test.
- Tab. 17: univariate signifikante Korrelationen bei Lebermetastasen; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test, K=Kruskal-Wallis-Test.
- Tab. 18: univariate signifikante Korrelation zwischen EGF-R, IGF-R, HGF-R und KRas bei LeberMetastasen; in Klammern ist der jeweils zugehörige Test angegeben: C=Chi-Quadrat-Test (zweiseitig), M=Mann-Whitney-U-Test, T=zweiseitiger T-Test.

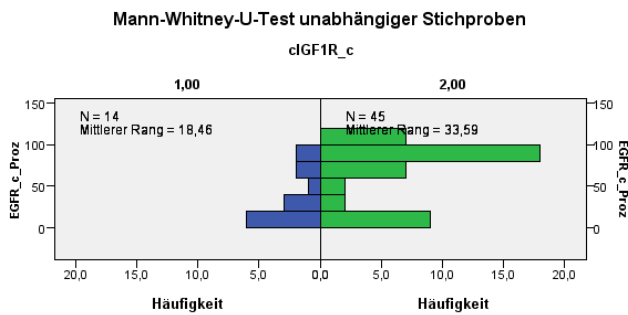
- Tab. 19: Übersicht signifikanter Merkmale im Kaplan-Meier-Schätzer bei Primärtumoren; Signifikanzniveau $p < 0,05$; Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben
- Tab. 20: Übersicht signifikanter Merkmale im Kaplan-Meier-Schätzer bei Lebermetastasen; Signifikanzniveau $p < 0,05$; Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben
- Tab. 21: Ergebnis der Cox-Regressionsanalyse der Primärtumoren
- Tab. 22: Ergebnis der Cox-Regressionsanalyse der Lebermetastasen
- Tab. 23: Klassifikation der American Society of Anesthesiology zur Abschätzbarkeit des präoperativen Risikos
- Tab. 24: Einteilung TNM-Klassifikation
- Tab. 25: Einteilung UICC-Klassifikation kolorektales Karzinom 2002
- Tab. 26: Einteilung Grading gemäß WHO
- Tab. 27: Übersicht zur Skalierung, Verteilung und Verbundenheit aller Merkmale
- Tab. 28: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse in der Univariatanalyse
- Tab. 29: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse im Kaplan-Meier-Schätzer für Primärtumoren. Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben
- Tab. 30: Liste aller nichtsignifikanten Ergebnisse im Kaplan-Meier-Schätzer für Lebermetastasen. Dargestellt sind das Gesamtüberleben und das tumorspezifische Überleben
- Tab. 31: Übersicht verwendeter Seren
- Tab. 32: Liste der verwendeten Antikörper mit zugehörigen Arbeitskonzentrationen, Stammkonzentrationen (vom Hersteller ausgegeben), Verdünnungen, der verwendeten Positivkontrollen; die Anzahl der positiven Zellen der Positivkontrollen, sowie die Färbeintensität und das Anfärbemuster
- Tab. 33: Schwellenwerte der immunhistochemischen Marker

7.6 Abbildungsverzeichnis

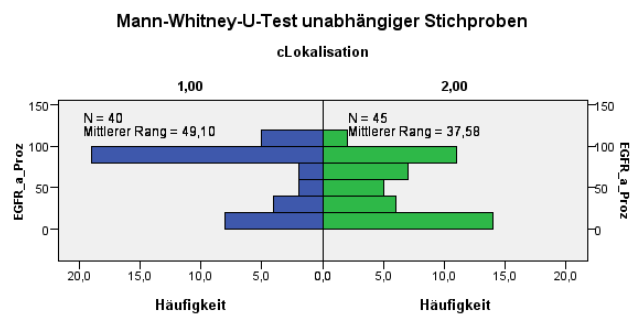
- Abb. 1: Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Signalweiterleitung über den RAS/RAF/MAPK-Signalweg, zur Verfügung gestellt durch Fr. Hanisch, chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern
- Abb. 2: gezeigt ist die Tumorentwicklung nach Fearon und Vogelstein von der gesunden Schleimhaut über Adenomentwicklung zum Karzinom mit anschließender Metastasierung. In der unteren Zeile sind die jeweiligen Mutationsereignisse gemäß ihrem zeitlichen Auftreten im Ablauf der Karzinogenese dargestellt. Fett die jeweiligen untersuchten Marker
- Abb. 3: HE-Färbung eines Tumorareals (Patient #3729) mit zentralen Nekrosen, 100-fach vergrößert
- Abb. 4: HE-Färbung Mukosa mit Krypten (Patient #3729), 200-fach vergrößert
- Abb. 5: Nilblau-Färbung einer Mukosa-Krypte (Patient #4175); 200-fach vergrößert unter UV-Anregung
- Abb. 6: Tumorareal vor Mikrodissektion (Patient #3729), 200-fach vergrößert; Pfeil: Tumorareal; HE
- Abb. 7: Tumorareal nach Mikrodissektion (Patient #3729), 200-fach vergrößert; Pfeil: einzelne Krypte; HE
- Abb. 8: Mukosakrypten vor Mikrodissektion (Patient #3729), 100-fach vergrößert; HE
- Abb. 9: Mukosakrypten nach Mikrodissektion (Patient #3729), 100-fach vergrößert; HE
- Abb. 10: Zusammensetzung der Basenleiter nach 1h und nach 3h Laufzeit der Gelelektrophore gemäß Herstellerangaben.
- Abb. 11: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für BRaf11
- Abb. 12: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für BRaf15
- Abb. 13: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für KRas Ogino

- Abb. 14: Gelelektrophorese von 8 Patienten (jeweils immer Tumor + Mukosa) für KRas Poehlmann
- Abb. 15: normalverteilter Q-Q-Plot am Beispiel des Body Mass Index (BMI)
- Abb. 16: nicht normalverteilter Q-Q-Plot am Beispiel des CA19-9 Wertes
- Abb. 17: Ergebnisse der Pyrosequenzierung KRas Exon 2 Codon 12/13
- Abb. 18: Ergebnis der Sequenzierung von KRas Exon 1 Codon 12/13 von Pat # 4095 mit der Methode nach Sanger et al., zur Verfügung gestellt durch AG Jung, Pathologisches Institut der LMU
- Abb. 19: Ergebnisse der Pyrosequenzierung BRaf Exon 11 + Exon 15
- Abb. 40: Kaplan-Meier-Kurven für N-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 41: Kaplan-Meier-Kurven für M-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 42: Kaplan-Meier-Kurven für UICC-Stadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 23: Kaplan-Meier-Kurven für Resektionsstadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 24: Kaplan-Meier-Kurven für Lymphgefäßinvasion im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 25: Kaplan-Meier-Kurven für Gefäßinvasion (V) im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurven für Perineuralscheideninfiltration (Pn) im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 27: Kaplan-Meier-Kurven für CEA präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 28: Kaplan-Meier-Kurven für CA19-9 präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 43: Kaplan-Meier-Kurve für Grading (r) und EGF-R cutoff (li) im Gesamtüberleben

- Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurven für die Lebermetastasengröße bei einem cutoff von 5cm im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 31: Kaplan-Meier-Kurven für Fong-Score (r) und Grading Primärtumoren (li) im tumorsp. Überleben
- Abb. 32: Kaplan-Meier-Kurven für Resektionsstadium im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 33: Kaplan-Meier-Kurven für CD44 cutoff im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 34: Kaplan-Meier-Kurven für Her2/neu Prozent (r) cutoff und Her2/neu-Score (li) im tumorsp. Überleben
- Abb. 35: Kaplan-Meier-Kurven für Her2/neu-Score cutoff präoperativ im Gesamtüberleben (r) und tumorsp. Überleben (li)
- Abb. 36: Kaplan-Meier-Kurve für Grading der Lebermetastasen im tumorspezifischen Überleben (li)
- Abb. 37: Signalwegverbindungen zwischen Wachstumsfaktorrezeptoren (am Beispiel EGF-R und MET) und Cofaktor CD44, dem T-Zellrezeptor mit Cofaktor CD45, dem Wnt-Signalweg und dem NOTCH-Signalweg und ihre Auswirkungen auf Apoptose, Genregulierung und Transkription, zur Verfügung gestellt durch Fr. Harnisch, chirurgische Forschung am Klinikum Großhadern
- Abb. 38: Mukosa gefärbt mit HGF-R-Antikörper, 100-fach vergrößert, zur Verfügung gestellt von Melanie Zoller (AG Metastasierung)
- Abb. 39: Primärtumor gefärbt mit HGF-R-Antikörper, 100-fach vergrößert, zur Verfügung gestellt von Melanie Zoller (AG Metastasierung)
- Abb. 40-58: graphische Darstellung des Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis-Tests (s.u.)

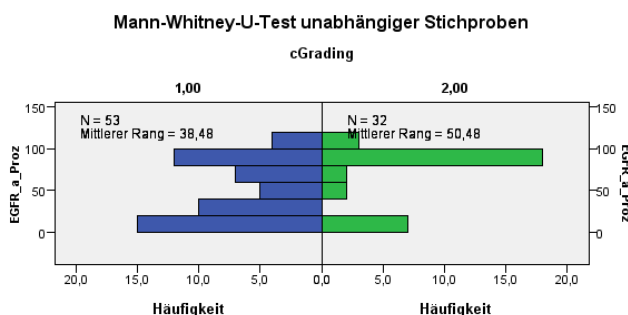


Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	476,500
Wilcoxon-W	1.511,500
Teststatistik	476,500
Standardfehler	55,767
Standardisierte Teststatistik	2,896
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,004

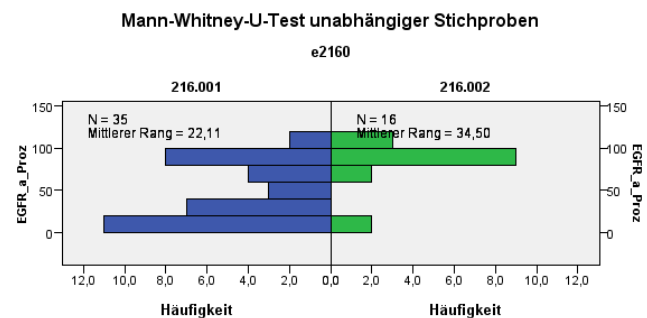


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	656,000
Wilcoxon-W	1.691,000
Teststatistik	656,000
Standardfehler	112,867
Standardisierte Teststatistik	-2,162
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,031

Abb. 40/41 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U Tests für IGF1-R/EGF-R (Lebermetastasen) und Lokalisation/EGF-R (Primaria)

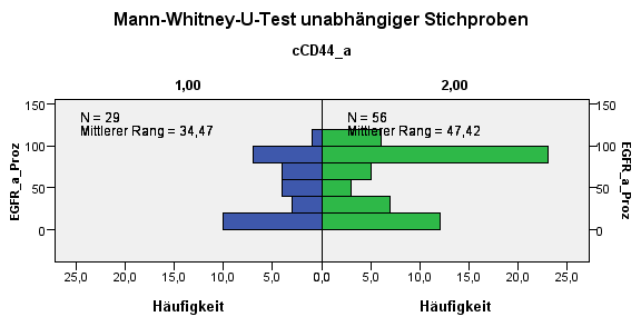


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.087,500
Wilcoxon-W	1.615,500
Teststatistik	1.087,500
Standardfehler	109,558
Standardisierte Teststatistik	2,186
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,029

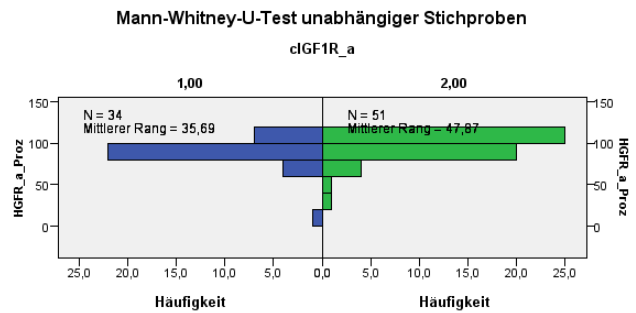


Gesamtanzahl	51
Mann-Whitney-U	416,000
Wilcoxon-W	552,000
Teststatistik	416,000
Standardfehler	48,989
Standardisierte Teststatistik	2,776
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,006

Abb. 42/43 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für Grading/EGF-R (Primaria) und L-Stadium/EGF-R (Primaria)

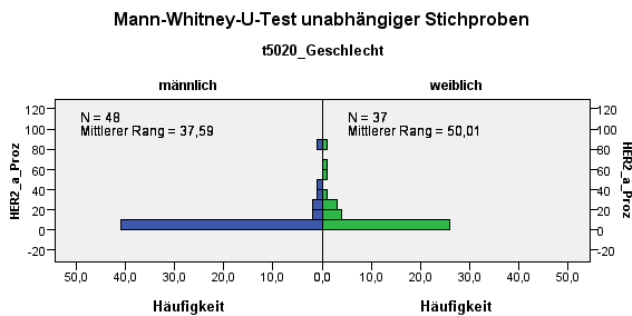


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.059,500
Wilcoxon-W	2.655,500
Teststatistik	1.059,500
Standardfehler	107,207
Standardisierte Teststatistik	2,309
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,021

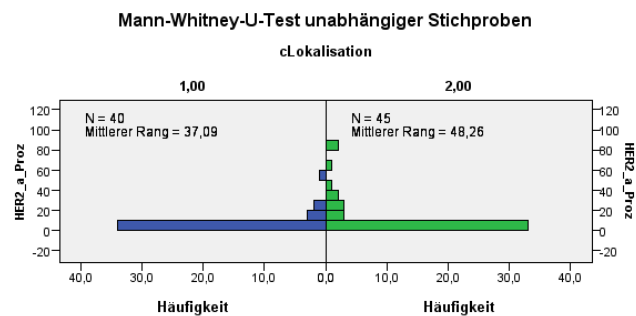


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.115,500
Wilcoxon-W	2.441,500
Teststatistik	1.115,500
Standardfehler	107,544
Standardisierte Teststatistik	2,311
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,021

Abb. 44/45 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für EGF-R/CD44v6 (Primaria) und IGF1-R/HGF-R (Primaria)

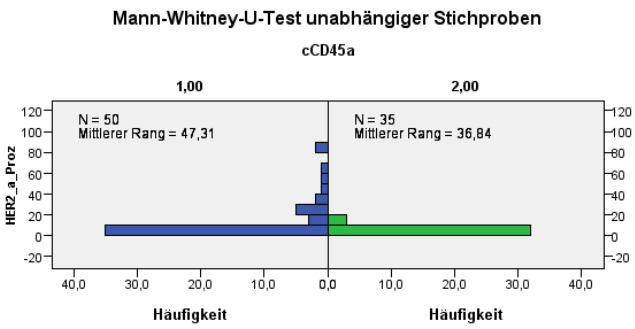


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.147,500
Wilcoxon-W	1.850,500
Teststatistik	1.147,500
Standardfehler	101,395
Standardisierte Teststatistik	2,559
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,010

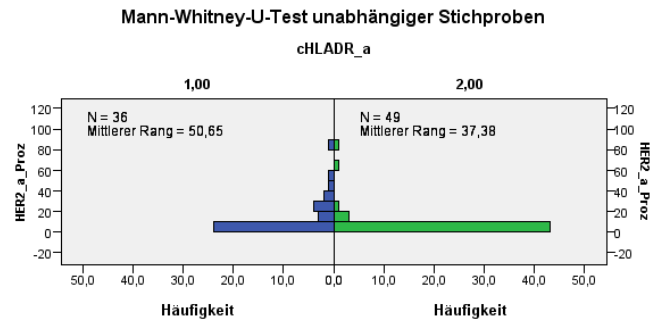


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.136,500
Wilcoxon-W	2.171,500
Teststatistik	1.136,500
Standardfehler	102,078
Standardisierte Teststatistik	2,317
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,021

Abb. 46/47 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für Geschlecht/Her2/neu (Primaria) und Lokalisation/Her2/neu (Primaria)

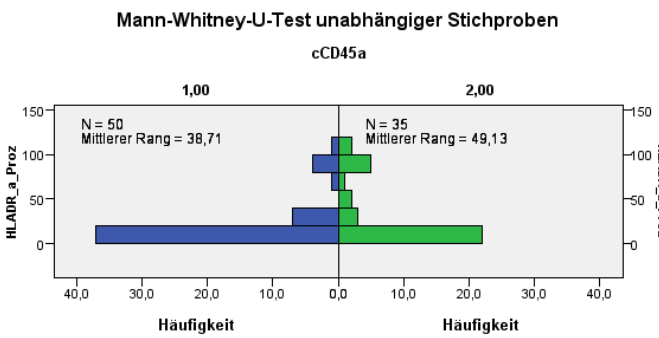


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	659,500
Wilcoxon-W	1.289,500
Teststatistik	659,500
Standardfehler	100,650
Standardisierte Teststatistik	-2,141
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,032

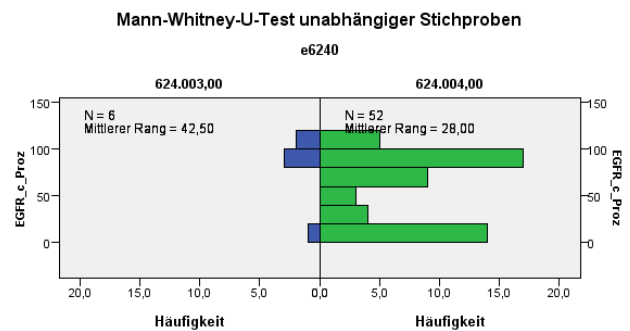


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	606,500
Wilcoxon-W	1.831,500
Teststatistik	606,500
Standardfehler	101,052
Standardisierte Teststatistik	-2,726
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,006

Abb. 48/49 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für CD45/Her2/neu (Primaria) und HLA-DR/Her2/neu (Primaria)

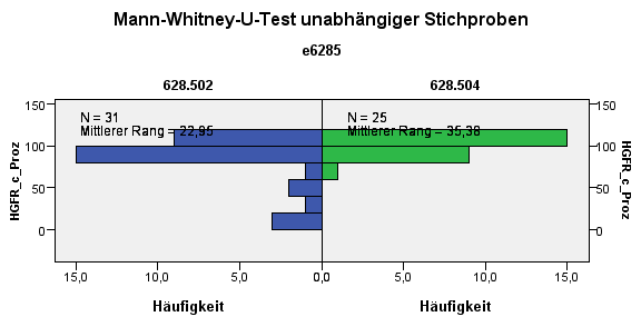


Gesamtanzahl	85
Mann-Whitney-U	1.089,500
Wilcoxon-W	1.719,500
Teststatistik	1.089,500
Standardfehler	107,357
Standardisierte Teststatistik	1,998
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,046

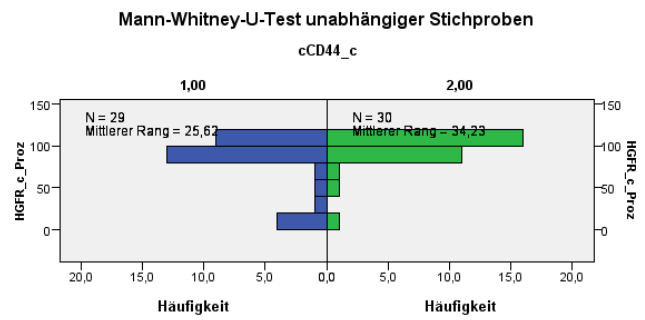


Gesamtanzahl	58
Mann-Whitney-U	78,000
Wilcoxon-W	1.456,000
Teststatistik	78,000
Standardfehler	38,905
Standardisierte Teststatistik	-2,005
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,045
Exakte Sig. (zweiseitiger Test)	,046

Abb. 50/51 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für CD45/HLA-DR (Primaria) und Histologie/EGF-R (Lebermetastasen)

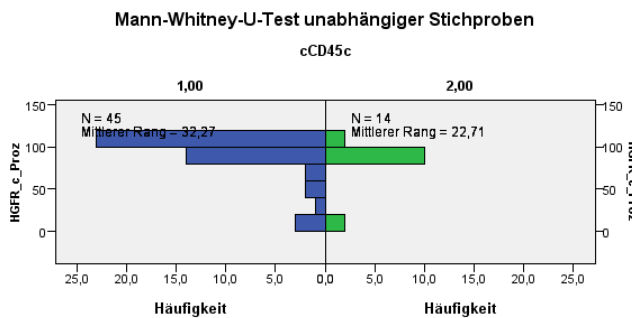


Gesamtanzahl	56
Mann-Whitney-U	559,500
Wilcoxon-W	884,500
Teststatistik	559,500
Standardfehler	58,005
Standardisierte Teststatistik	2,965
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,003

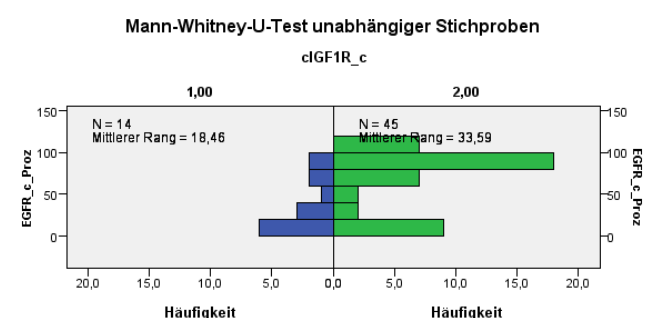


Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	562,000
Wilcoxon-W	1.027,000
Teststatistik	562,000
Standardfehler	63,182
Standardisierte Teststatistik	2,010
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,044

Abb. 52/53 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für CA19-9/HGF-R (Lebermetastasen) und CD44v6/HGF-R (Lebermetastasen)

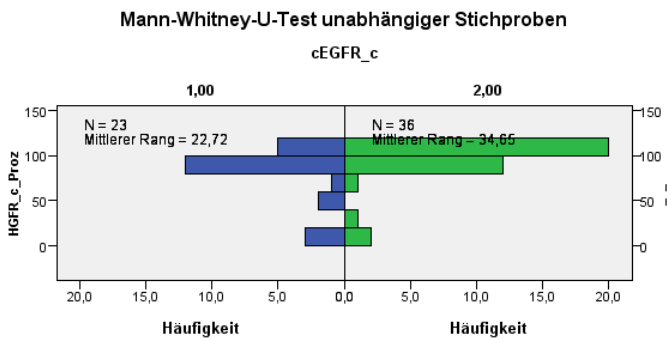


Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	213,000
Wilcoxon-W	318,000
Teststatistik	213,000
Standardfehler	53,765
Standardisierte Teststatistik	-1,897
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,058

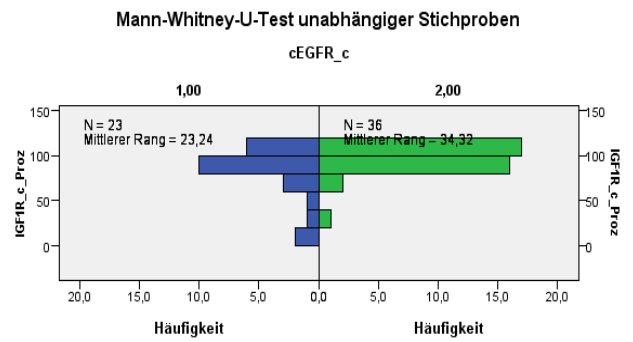


Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	476,500
Wilcoxon-W	1.511,500
Teststatistik	476,500
Standardfehler	55,767
Standardisierte Teststatistik	2,896
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,004

Abb. 54/55 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für CD45/HGF-R (Lebermetastasen) und IGF1-R und EGF-R (Lebermetastasen)

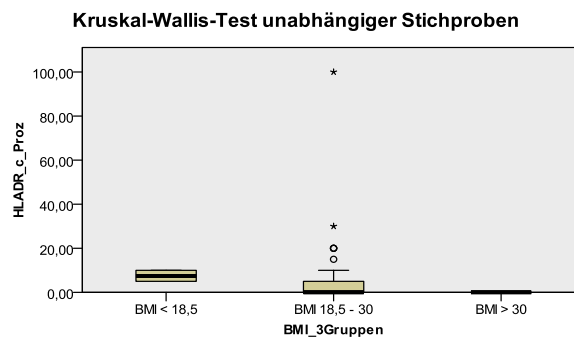


Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	581,500
Wilcoxon-W	1.247,500
Teststatistik	581,500
Standardfehler	61,638
Standardisierte Teststatistik	2,717
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,007



Gesamtanzahl	59
Mann-Whitney-U	569,500
Wilcoxon-W	1.235,500
Teststatistik	569,500
Standardfehler	62,013
Standardisierte Teststatistik	2,508
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,012

Abb. 56/57 graphische Darstellung des Mann-Whitney-U für EGF-R/HGF-R (Lebermetastasen) und EGF-R/IGF1-R (Lebermetastasen)



Gesamtanzahl	58
Teststatistik	6,520
Freiheitsgrade	2
Asymptotische Sig. (zweiseitiger Test)	,038

1. Die Teststatistik wird auf Bindungen angepasst.

Abb. 58: graphische Darstellung des Kruskal-Wallis-Tests für HLA-DR/BMI (Lebermetastasen)

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
1N Na-OH	Einmolare Natronlauge
5-FU	5-Fluorouracil
A	Adenosin
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AG	Arbeitsgemeinschaft
AG	Aktiengesellschaft
Akt/PKB	Proteinkinase B
al.	Altera
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Adenomatous poliposis coli Protein
APS	Adenosin-5-Phosphosulfat
ASA	American Society of Anaesthesiology
BMI	Body Mass Index
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Carcinoma
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CCD	charge coupled device
CD (44v6)	Cluster of differentiation (44 version 6)
CEA	Carcinoembryonic Antigen
cm	Zentimeter

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	Deleted in colorectal cancer Protein
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPD	Dihydropyrimidinehydrogenase
Dr. h. c.	Doktor honoris causa (Ehrendokortitel)
Dr. med.	Doktor der Medizin
Dr. rer. nat.	Doktor rerum naturalium (Doktor der Naturwissenschaften)
dsDNS	Doppelsträngige DNS
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktionskoeffizient
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Erb	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene
ERCC1	excision repair cross-complementation group 1
Erk	Extracellular signal-regulated kinases
EtBr	Ethidiumbromid
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOLFIRI	F olinic acid, 5- F luorouracil, I rinotecan
FOLFOX	F olinic acid, 5- F luorouracil, O xaliplatin
g	Gramm
g	Maß der Schwerebeschleunigung
G	Guanidin
GB	Gigabyte

GDP	Guanidindiphosphat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanidintriphosphat
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyll- Ethansulfonsäure
Her	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA-	Human Leucocyte Antigen
IGF1-R	Insulin like growth factor 1 receptor
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Inc.	Incorporation
JAK	Januskinase
KRas	Kirsten Ras
KRK	Kolorektales Karzinom
L-	Lymphgefäßinvasion
LOH	Loss of heterozygosity
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode
M	Molar
M-	Metastasierungsstatus
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg	Magnesium

mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mut	Mutation
N-	Nodaler Status
n=	numerum (Anzahl)
nm	Nanometer
p53	Protein 53
path.	pathologisch
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerasechainreaction (Polymerasekettenreaktion)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Privatdozent
PI3K	Phosphatidylinositol-3 –Kinase
PIGF	Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein
pM	Picomolar
Pn-	Perineuralscheideninfiltration
PPi	Pyrophosphat
Prof.	Professor
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
R-	Resektionsstatus
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RNS	Riboneukleinsäure
SN-38	aktiver Metabolit von Irinotecan

Src	Sarcoma
BFGF	β -fibrocyte growth factor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxyMethyl)aminoMethan
TS	Thymidilatsynthase
U	Units
UGT1A	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A
UICC	Union International Contre le Cancer
UK	United Kingdom
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-	(Vessel-)Gefäßinvasion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	versus
W	Watt
Wnt	Wingless-type Int-1
wt	Wildtyp
XDP	xeroderma pigmentosum group D
XRCC1	X-ray cross-complementing group 1

Literaturverzeichnis

1. Levi, F., et al., *Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 155-69.
2. Geddes, M., D. Balzi, and L. Tomatis, *Progress in the fight against cancer in EC countries: changes in mortality rates, 1970-90*. Eur J Cancer Prev, 1994. **3**(1): p. 31-44.
3. Krebs in Deutschland 2007/2008; 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012
4. Schmiegel, W., et al., *S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII)*. Z Gastroenterol, 2008. **48**(1): p. 65-136.
5. Lacy, A.M., et al., *Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial*. Lancet, 2002. **359**(9325): p. 2224-9.
6. Weeks, J.C., et al., *Short-term quality-of-life outcomes following laparoscopic-assisted colectomy vs open colectomy for colon cancer: a randomized trial*. JAMA, 2002. **287**(3): p. 321-8.
7. Ohtani, H., et al., *A meta-analysis of the short- and long-term results of randomized controlled trials that compared laparoscopy-assisted and open colectomy for colon cancer*. J Cancer, 2012. **3**: p. 49-57.
8. Roscio, F., et al., *Totally laparoscopic versus laparoscopic assisted right colectomy for cancer*. Int J Surg, 2012. **10**(6): p. 290-5.
9. Hermanek, P., S. Merkel, and W. Hohenberger, *Prognosis of Rectal Carcinoma after Multimodal Treatment: ypTNM Classification and Tumor Regression Grading Are Essential*. Anticancer Res, 2013. **33**(2): p. 559-66.
10. Compton, C.C., *Pathology report in colon cancer: what is prognostically important?* Dig Dis, 1999. **17**(2): p. 67-79.
11. Lippert, H., *Lehrbuch Anatomie*. 6. Auflage. 2003: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH München.
12. Ghazi, S., et al., *Analysis of colorectal cancer morphology in relation to sex, age, location, and family history*. J Gastroenterol, 2012. **47**(6): p. 619-34.
13. Fielding, L.P., et al., *Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT)*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(4): p. 325-44.
14. Sobin, L.H., *TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules*. Semin Surg Oncol, 2003. **21**(1): p. 19-22.
15. Nelson, H., et al., *Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(8): p. 583-96.
16. Pilipshen, S.J., et al., *Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer*. Cancer, 1984. **53**(6): p. 1354-62.
17. Matzel, K.E., S. Merkel, and W. Hohenberger, *[Local therapy principles in rectal carcinoma]*. Chirurg, 2003. **74**(10): p. 897-904.
18. Maak, M., et al., *Independent Validation of a Prognostic Genomic Signature (ColoPrint) for Patients With Stage II Colon Cancer*. Ann Surg, 2013.
19. Wolff Schmiegel, C.P., Rainer Porschen, Claus Rödel, Dirk Arnold, Anke and A. Reinacher-Schick, *Amendment zur S3-Leitlinie KRK, Themenkomplex VI – Die adjuvante Therapie des älteren Patienten*. Dtsch Arztebl Int. 2009 Dec;106(51-52):843-8., 2009.
20. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, 5-Fluorouracil. 2012; Available from:

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=53787460&loc=es_rss.

21. Showalter, S.L., et al., *Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward?* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(7): p. 986-94.
22. Gustavsson, B., et al., *Molecular determinants of efficacy for 5-FU-based treatments in advanced colorectal cancer: mRNA expression for 18 chemotherapy-related genes.* Int J Cancer, 2009. **124**(5): p. 1220-6.
23. Sadahiro, S., et al., *Association of right-sided tumors with high thymidine phosphorylase gene expression levels and the response to oral uracil and tegafur/leucovorin chemotherapy among patients with colorectal cancer.* Cancer Chemother Pharmacol, 2012. **70**(2): p. 285-91.
24. Meropol, N.J., et al., *Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(25): p. 4069-77.
25. Vallbohmer, D., et al., *DPD is a molecular determinant of capecitabine efficacy in colorectal cancer.* Int J Oncol, 2007. **31**(2): p. 413-8.
26. Soong, R., et al., *Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy.* Ann Oncol, 2008. **19**(5): p. 915-9.
27. Gnoni, A., et al., *Pharmacokinetic and metabolism determinants of fluoropyrimidines and oxaliplatin activity in treatment of colorectal patients.* Curr Drug Metab, 2011. **12**(10): p. 918-31.
28. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Oxaliplatin.* 2012; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=134337390&loc=es_rss.
29. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Irinotecan.* 2012; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=53788707&loc=es_rss.
30. McLeod, H.L., et al., *Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741.* J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3227-33.
31. Martinez-Balibrea, E., et al., *UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy.* Br J Cancer, 2010. **103**(4): p. 581-9.
32. Jin, K., et al., *Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review).* Oncol Lett, 2012. **3**(1): p. 11-15.
33. al., G.H.e., *INNERE MEDIZIN*2008.
34. Kanas, G.P., et al., *Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors.* Clin Epidemiol, 2012. **4**: p. 283-301.
35. Tzeng, C.W. and T.A. Aloia, *Colorectal liver metastases.* J Gastrointest Surg, 2013. **17**(1): p. 195-202.
36. Fong, Y., et al., *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases.* Ann Surg, 1999. **230**(3): p. 309-18; discussion 318-21.
37. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Bevacizumab.* 2008; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24801580&loc=es_rss.

38. Kabbinavar, F.F., et al., *Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial*. J Clin Oncol, 2005. **23**(16): p. 3697-705.
39. Asghar, U., E. Hawkes, and D. Cunningham, *Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2010. **9**(5): p. 274-81.
40. de Gramont, A., et al., *Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(12): p. 1225-33.
41. Martinelli, E., et al., *Emerging VEGF-receptor inhibitors for colorectal cancer*. Expert Opin Emerg Drugs, 2013. **18**(1): p. 25-37.
42. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Cetuximab*. 2011; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=495888&loc=es_rss.
43. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Panitumumab*. 2008; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=50070211&loc=es_rss.
44. De Roock, W., et al., *KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. Ann Oncol, 2008. **19**(3): p. 508-15.
45. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1626-34.
46. Van Cutsem, E.J. and J. Oliveira, *Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2008. **19 Suppl 2**: p. ii33-4.
47. Wang, C.C. and J. Li, *An update on chemotherapy of colorectal liver metastases*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(1): p. 25-33.
48. Spaulding, D.C. and B.O. Spaulding, *Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors*. Semin Oncol, 2002. **29**(5 Suppl 14): p. 45-54.
49. McKay, J.A., et al., *Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases*. Eur J Cancer, 2002. **38**(17): p. 2258-64.
50. Spano, J.P., et al., *Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival*. Ann Oncol, 2005. **16**(1): p. 102-8.
51. Scartozzi, M., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies*. J Clin Oncol, 2004. **22**(23): p. 4772-8.
52. Saltz, L.B., et al., *Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1201-8.
53. Chung, K.Y., et al., *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry*. J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1803-10.
54. Centelles, J.J., *General aspects of colorectal cancer*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 139268.
55. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 692-6.
56. Benvenuti, S., et al., *Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies*. Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2643-8.

57. Loupakis, F., et al., *KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(4): p. 715-21.
58. Peeters, M., et al., *Mutant KRAS Codon 12 and 13 Alleles in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Assessment As Prognostic and Predictive Biomarkers of Response to Panitumumab*. J Clin Oncol, 2012.
59. Yokota, T., *Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers?* Anticancer Agents Med Chem, 2012. **12**(2): p. 163-71.
60. De Roock, W., et al., *Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. JAMA, 2010. **304**(16): p. 1812-20.
61. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
62. Rizzo, S., et al., *Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy?* Cancer Treat Rev, 2010. **36 Suppl 3**: p. S56-61.
63. Roth, A.D., et al., *Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial*. J Clin Oncol, 2010. **28**(3): p. 466-74.
64. Tie, J., et al., *Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation*. Int J Cancer, 2011. **128**(9): p. 2075-84.
65. Nordling, C.O., *A new theory on cancer-inducing mechanism*. Br J Cancer, 1953. **7**(1): p. 68-72.
66. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
67. Moran, A., et al., *Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance*. World J Gastrointest Oncol, 2010. **2**(3): p. 151-8.
68. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
69. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
70. Cervantes, A., et al., *Current questions for the treatment of advanced gastric cancer*. Cancer Treat Rev, 2013. **39**(1): p. 60-7.
71. Kavanagh, D.O., et al., *Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer?* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 1.
72. Ciardiello, F. and N. Normanno, *HER2 signaling and resistance to the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab: a further step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(6): p. 472-4.
73. Martin, V., et al., *HER2 gene copy number status may influence clinical efficacy to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer patients*. Br J Cancer, 2013. **108**(3): p. 668-75.
74. HGNC. *IGF1R insulin-like growth factor 1 receptor [Homo sapiens]* 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3480>.
75. Vincent, A.M. and E.L. Feldman, *Control of cell survival by IGF signaling pathways*. Growth Horm IGF Res, 2002. **12**(4): p. 193-7.
76. Bertrand, F.E., et al., *Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1254-60.
77. Shiratsuchi, I., et al., *Expression of IGF-1 and IGF-1R and their relation to clinicopathological factors in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(7): p. 2541-5.

78. Takahari, D., et al., *Relationships of insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor expression to clinical outcomes in patients with colorectal cancer*. *Oncology*, 2009. **76**(1): p. 42-8.
79. Huang, F., L.A. Xu, and S. Khambata-Ford, *Correlation between gene expression of IGF-1R pathway markers and cetuximab benefit in metastatic colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(4): p. 1156-66.
80. Abounader, R., et al., *Regulation of c-Met-dependent gene expression by PTEN*. *Oncogene*, 2004. **23**(57): p. 9173-82.
81. Inno, A., et al., *Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer?* *Clin Colorectal Cancer*, 2011. **10**(4): p. 325-32.
82. Isaksson-Mettavainio, M., et al., *c-Met expression in primary tumors and their corresponding distant metastases*. *Mol Med Rep*, 2008. **1**(6): p. 787-90.
83. Shattuck, D.L., et al., *Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(5): p. 1471-7.
84. Comoglio, P.M., S. Giordano, and L. Trusolino, *Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(6): p. 504-16.
85. HGNC. *CD44 molecule (Indian blood group) [Homo sapiens]* 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/960>.
86. Doerks, T., et al., *Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions*. *Genome Res*, 2002. **12**(1): p. 47-56.
87. Zhang, J.C., et al., *Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(7): p. 1482-6.
88. Tremmel, M., et al., *A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis*. *Blood*, 2009. **114**(25): p. 5236-44.
89. Banky, B., et al., *Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression*. *Mol Cancer*, 2012. **11**: p. 83.
90. Herrlich, P., S. Pals, and H. Ponta, *CD44 in colon cancer*. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(7-8): p. 1110-2.
91. Amcure. 2013; Available from: <http://amcure.com/research-and-development/>.
92. HGNC. *MKI67 antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 [Homo sapiens]* 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4288>.
93. Tang, L.H., et al., *Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods*. *Am J Surg Pathol*, 2012. **36**(12): p. 1761-70.
94. Isola, J.J., et al., *Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count*. *Cancer*, 1990. **65**(5): p. 1180-4.
95. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
96. Gerdes, J., *Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies*. *Semin Cancer Biol*, 1990. **1**(3): p. 199-206.
97. Ma, Y.L., et al., *Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer*. *Med Oncol*, 2010. **27**(2): p. 304-9.
98. HGNC. *PTPRC protein tyrosine phosphatase, receptor type, C [Homo sapiens]* 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5788>.

99. Chew, A., et al., *SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22047.
100. Neumann, J., *Immunbiologie*. Vol. 1. Auflage. 2008: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
101. Seward, R.J., et al., *Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic-refractory Lyme arthritis*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(3): p. M110 002477.
102. Walsh, M.D., et al., *HLA-DR expression is associated with better prognosis in sporadic Australian clinicopathological Stage C colorectal cancers*. Int J Cancer, 2009. **125**(5): p. 1231-7.
103. Michael-Robinson, J.M., et al., *Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status*. Gut, 2001. **48**(3): p. 360-6.
104. de Bruin, E.C., et al., *Epithelial human leukocyte antigen-DR expression predicts reduced recurrence rates and prolonged survival in rectal cancer patients*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1073-9.
105. Moller, P., et al., *Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma*. Cancer Res, 1991. **51**(2): p. 729-36.
106. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
107. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status*. J Clin Oncol, 2011. **29**(15): p. 2011-9.
108. Bao, W.G., et al., *Biobanking of Fresh-frozen Human Colon Tissues: Impact of Tissue Ex-vivo Ischemia Times and Storage Periods on RNA Quality*. Ann Surg Oncol, 2012.
109. Adkins, S. and M. Burmeister, *Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations*. Anal Biochem, 1996. **240**(1): p. 17-23.
110. Chen, Q.Y., et al., *Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile blue, with DNA and its application to nucleic acids assay*. Analyst, 1999. **124**(6): p. 901-6.
111. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Nile blue*. 2007; Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24897446>.
112. Thieme Chemistry (Hrsg.): RÖMPP Online - Version 3.1. Georg Thieme Verlag KG
113. Fersch, F., *Deskriptive Statistik*. Vol. 3. Auflage. Physica-Verlag Würzburg.
114. Invitrogen TRIzol® Reagent and TRIzol® LS Reagent Protocol; Available from: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/productnotes/F_Trizol%20and%20Trizol%20LS-041018-RD-TL-HL0506021.pdf.
115. Mühlhard, C., *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 6. Auflage. 2009: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
116. Qiagen. *QIAamp DNA Micro Handbook*. 2010 [cited 2nd editon; Available from: <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Micro-Kit#resources>.
117. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Database, *Eosin*. 2012; Available from: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=134991888&loc=es_rss.
118. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing*. J Mol Diagn, 2005. **7**(3): p. 413-21.

119. Poehlmann, A., et al., *K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique*. *Pathol Res Pract*, 2007. **203**(7): p. 489-97.
120. Jahnson, M., Rothhämel, S., *Gentechnische Methoden*, 4. Auflage, 2009: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
121. Qiagen. *Principles of Pyrosequencing*. 2013; Available from: <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454&mn1=1366&mn2=1367>.
122. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA*. *Nature*, 1977. **265**(5596): p. 687-95.
123. Chen, C.Y., S.C. Shiesh, and S.J. Wu, *Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis*. *Clin Chem*, 2004. **50**(3): p. 481-9.
124. Seth, R., et al., *Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer*. *Gut*, 2009. **58**(9): p. 1234-41.
125. van Houdt, W.J., et al., *Oncogenic KRAS desensitizes colorectal tumor cells to epidermal growth factor receptor inhibition and activation*. *Neoplasia*, 2010. **12**(6): p. 443-52.
126. Van Schaeybroeck, S., et al., *Oncogenic Kras promotes chemotherapy-induced growth factor shedding via ADAM17*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 1071-80.
127. Ch. Wittekind, H.-J.M., F. Bootz, *TNM Klassifikation maligner Tumoren 2005* (6. Auflage): Springer Verlag Berlin.
128. Sharma, S.G. and M.L. Gulley, *BRAF mutation testing in colorectal cancer*. *Arch Pathol Lab Med*, 2010. **134**(8): p. 1225-8.
129. Benedix, F., et al., *Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival*. *Dis Colon Rectum*, 2010. **53**(1): p. 57-64.
130. Zlobec, I., et al., *Prognostic and predictive value of TOPK stratified by KRAS and BRAF gene alterations in sporadic, hereditary and metastatic colorectal cancer patients*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(1): p. 151-61.
131. Roth, A.D., et al., *Integrated Analysis of Molecular and Clinical Prognostic Factors in Stage II/III Colon Cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(21): p. 1635-46.
132. Sun, L.C., et al., *Preoperative serum carcinoembryonic antigen, albumin and age are supplementary to UICC staging systems in predicting survival for colorectal cancer patients undergoing surgical treatment*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 288.
133. Garouniatis, A., et al., *FAK, CD44v6, c-Met and EGFR in colorectal cancer parameters: tumour progression, metastasis, patient survival and receptor crosstalk*. *Int J Colorectal Dis*, 2012.
134. Barault, L., et al., *Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(10): p. 2255-9.
135. Ma, Y., et al., *Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53916.
136. Nitsche, U., et al., *Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective*. *Ann Surg*, 2011. **254**(5): p. 793-800; discussion 800-1.
137. UICC, *TNM classification of malignant tumours 7th edition 2010*.
138. Betge, J., et al., *Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting*. *Cancer*, 2012. **118**(3): p. 628-38.
139. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S et al., *Carcinoma of the colon and rectum*. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System*. Lyon, France: IARC Press; 2000:105-119.

140. Deschoolmeester, V., et al., *A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy*. *Oncologist*, 2010. **15**(7): p. 699-731.
141. Catalano, V., et al., *Prognosis of mucinous histology for patients with radically resected stage II and III colon cancer*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(1): p. 135-41.
142. Su, B.-B., *Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection*. *World Journal of Gastroenterology*, 2012. **18**(17): p. 2121.
143. Li, M., et al., *Comparison of carcinoembryonic antigen prognostic value in serum and tumour tissue of patients with colorectal cancer*. *Colorectal Dis*, 2009. **11**(3): p. 276-81.
144. Kim, G., et al., *Usefulness of carcinoembryonic antigen for monitoring tumor progression during palliative chemotherapy in metastatic colorectal cancer*. *Yonsei Med J*, 2013. **54**(1): p. 116-22.
145. Reiter, W., et al., *Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(6D): p. 5195-8.
146. Gupta, M.K., et al., *Measurement of a monoclonal-antibody-defined antigen (CA19-9) in the sera of patients with malignant and nonmalignant diseases. Comparison with carcinoembryonic antigen*. *Cancer*, 1985. **56**(2): p. 277-83.
147. Benedix, F., et al., *Colon carcinoma--classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite?--Analysis of 29,568 patients*. *Eur J Surg Oncol*, 2011. **37**(2): p. 134-9.
148. Hansen, I.O. and P. Jess, *Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review*. *Dan Med J*, 2012. **59**(6): p. A4444.
149. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Engl J Med*, 1988. **319**(9): p. 525-32.
150. Knijn, N., et al., *KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients*. *Br J Cancer*, 2011. **104**(6): p. 1020-6.
151. Umeda, Y., et al., *Poor prognosis of KRAS or BRAF mutant colorectal liver metastasis without microsatellite instability*. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2012.
152. Neumann, J., et al., *Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer*. *Pathol Res Pract*, 2009. **205**(12): p. 858-62.
153. Nosh, K., et al., *A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(5): p. 1609-20 e1-3.
154. Ayez, N., et al., *Is the clinical risk score for patients with colorectal liver metastases still useable in the era of effective neoadjuvant chemotherapy?* *Ann Surg Oncol*, 2011. **18**(10): p. 2757-63.
155. Catalano, V., et al., *Mucinous histology predicts for poor response rate and overall survival of patients with colorectal cancer and treated with first-line oxaliplatin-and/or irinotecan-based chemotherapy*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(6): p. 881-7.
156. Park, J.H., et al., *Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(4): p. 1045-55.
157. Kaneko, Y., et al., *Degraded DNA may induce discordance of KRAS status between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases*. *Int J Clin Oncol*, 2013.
158. Gaedcke, J., et al., *KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy*. *Radiother Oncol*, 2010. **94**(1): p. 76-81.

159. Macedo, M.P., et al., *Multiple mutations in the Kras gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports*. Int J Colorectal Dis, 2011. **26**(10): p. 1241-8.
160. Bazan, V., *Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype*. Annals of Oncology, 2002. **13**(9): p. 1438-1446.
161. Winder, T., et al., *Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(22): p. 5591-602.
162. Ii, M., et al., *The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(15): p. 5048-59.
163. Wan, P.T., et al., *Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF*. Cell, 2004. **116**(6): p. 855-67.
164. Tol, J., I.D. Nagtegaal, and C.J. Punt, *BRAF mutation in metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(1): p. 98-9.
165. Benedix, F., et al., *Influence of anatomical subsite on the incidence of microsatellite instability, and KRAS and BRAF mutation rates in patients with colon carcinoma*. Pathol Res Pract, 2012. **208**(10): p. 592-7.
166. Safaee Ardekani, G., et al., *The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47054.
167. Rajagopalan, H., et al., *Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 934.
168. Agendia. *ColoPrint*. 2013; Available from: <http://www.agendia.com/pages/coloprint/173.php>.
169. Bolocan, A., et al., *Prognostic and predictive factors in colorectal cancer*. Chirurgia (Bucur), 2012. **107**(5): p. 555-63.
170. Jurgensmeier, J.M., et al., *Prognostic and predictive value of VEGF, sVEGFR-2 and CEA in mCRC studies comparing cediranib, bevacizumab and chemotherapy*. Br J Cancer, 2013.
171. Schmiegel, W., et al., *Capecitabine/irinotecan or capecitabine/oxaliplatin in combination with bevacizumab is effective and safe as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: a randomized phase II study of the AIO colorectal study group*. Ann Oncol, 2013.
172. Cassano, A., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor, mitogen-activated protein kinase and p53 in human colorectal cancer*. Anticancer Res, 2002. **22**(4): p. 2179-84.
173. Fakih, M., *The evolving role of VEGF-targeted therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2013.
174. Pohl, M., et al., *Biomarkers of anti-angiogenic therapy in metastatic colorectal cancer (mCRC): original data and review of the literature*. Z Gastroenterol, 2011. **49**(10): p. 1398-406.
175. Liska, D., et al., *HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(3): p. 472-82.
176. Fuerst, D., et al., *HLA polymorphisms influence the development of skin rash arising from treatment with EGF receptor inhibitors*. Pharmacogenomics, 2012. **13**(13): p. 1469-76.
177. LaBonte, M.J., et al., *The dual EGFR/HER2 inhibitor lapatinib synergistically enhances the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat in colorectal cancer models*. Cancer Res, 2011. **71**(10): p. 3635-48.
178. NCCN Practice Guidelines in Oncology—v.1.2009 Breast Cancer. National Comprehensive Cancer Network; 2009

179. Saghatchian, M., et al., *Additional prognostic value of the 70-gene signature (MammaPrint((R))) among breast cancer patients with 4-9 positive lymph nodes.* Breast, 2013.
180. Habel, L.A., et al., *A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients.* Breast Cancer Res, 2006. **8**(3): p. R25.
181. Kelley, R.K. and A.P. Venook, *Prognostic and predictive markers in stage II colon cancer: is there a role for gene expression profiling?* Clin Colorectal Cancer, 2011. **10**(2): p. 73-80.
182. Kochs, E., H.A. Adams, C. Spies, *Anästhesiologie*, 2. Auflage 2008: Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
183. IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, V.A., NY: IBM Corp. , 2011.
184. Hsu, S.M. and L. Raine, *Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry.* J Histochem Cytochem, 1981. **29**(11): p. 1349-53.
185. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics.* Am J Clin Pathol, 1981. **75**(6): p. 816-21.
186. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies.* Am J Clin Pathol, 1981. **75**(5): p. 734-8.
187. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.* J Histochem Cytochem, 1981. **29**(4): p. 577-80.
188. Hofmann, M., et al., *Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study.* Histopathology, 2008. **52**(7): p. 797-805.
189. Ruschoff, J., et al., *HER2 diagnostics in gastric cancer-guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing.* Virchows Arch, 2010. **457**(3): p. 299-307.