

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner)

## Hepatische vs. Peritoneale Metastasierung beim Kolorektalen Karzinom: Identifizierung von Biomarkern im Primärtumor

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

vorgelegt von  
Julia Lisa Löhrs  
aus München  
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Angele

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Ewers

Priv. Doz. Dr. Johann Spatz

Prof. Dr. David Horst

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 03. 2017

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	iii
Tabellenverzeichnis .....	iv
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathologie des kolorektalen Karzinoms	3
2.2 Karzinomentstehung.....	4
2.3 Stammzellkonzept .....	10
2.3.1 CSC's: Cancer Stem Cells.....	11
2.3.2 Stammzellmarker.....	12
2.4 Metastasierungswege und Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms.....	13
2.5 Behandlungsmöglichkeiten des kolorektalen Karzinoms.....	14
2.6 Theoretische Grundlagen der untersuchten Marker .....	18
2.6.1 <i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> .....	18
2.6.2 <i>p53</i> .....	20
2.6.3 $\beta$ -Catenin .....	20
2.6.4 CD133 und CD44.....	22
2.6.5 hMLH1 und hMSH2.....	23
3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	25
4 Material und Methoden.....	27
4.1 Auswahl des Patientenkollektivs und Zusammensetzung der Vergleichsgruppen .....	27
4.2 Material.....	30
4.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	30
4.2.1.1 Geräte.....	30
4.2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	31
4.3 Methoden .....	33
4.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben .....	33
4.3.2 <i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> Mutationsanalyse .....	33
4.3.3 Immunhistochemie.....	42
4.3.4 Scoring der Immunhistochemie.....	44

4.4	Statistische Methodik und Software .....	48
5	Ergebnisse .....	49
6	Diskussion.....	58
7	Literaturverzeichnis.....	78
8	Anhang .....	88
	8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	88
	8.2 Danksagung.....	90
9	Eidesstattliche Erklärung.....	91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell einer Krypte des Kolons nach (8) .....	5
Abbildung 2: Der Wnt-Signaltransduktionsweg nach Logan et al. (17).....	7
Abbildung 3: Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Modell von Fearon und Vogelstein (1990) (19), modifiziert von Toribara et al. (23) .....	9
Abbildung 4: Der EGFR-Signaltransduktionsweg nach Walther et al. 2009 (58)	18
Abbildung 5: Die duale Funktion von $\beta$ -Catenin nach (68).....	22
Abbildung 6: Aufbau PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation und Vacuum Prep Tool nach (92) .....	39
Abbildung 7: Pyrogramme der <i>KRAS</i> - und <i>BRAF</i> -Mutationsanalysen (Pfeile weisen auf die mutierte Base hin) .....	41
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung der Marker $\beta$ -Catenin (hohe Expression: A, niedrige Expression B), CD44 (hohe Expression: C, niedrige Expression D), CD133 (hohe Expression: E, niedrige Expression F), 200-fache Vergrößerung.....	45
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung der Marker hMLH1 (hohe Expression: G, niedrige Expression H) und p53 (hohe Expression: I, niedrige Expression J), 200-fache Vergrößerung. ....	47
Abbildung 10: Histogramme der Korrelation von $\beta$ -Catenin (A), CD44 (B), CD133 (C), <i>KRAS</i> -Mutation (J), <i>BRAF</i> -Mutation (K), <i>p53</i> -Mutation (L) sowie die verschiedenen Markerkombinationen (D – I) mit den verschiedenen Metastasierungsmustern. ....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verschiedenen Karzinogenesewege des (sporadischen) kolorektalen Karzinoms, modifiziert nach (26, 30).....	10
Tabelle 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2010, nach (56).....	17
Tabelle 3: Die häufigsten Mutationen auf Kodon 12 und 13 in 400 Fällen metastasierter Kolonkarzinome mit <i>KRAS</i> -Mutation. ....	19
Tabelle 4: Korrelation klinisch-pathologischer Patientendaten (entsprechend des TNM-Systems nach der UICC-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms 2010) mit den untersuchten Metastasierungsmustern....	29
Tabelle 5: Verwendete Geräte .....	30
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 7: Verwendete Reagenzien .....	32
Tabelle 8: Mischungsverhältnis der einzelnen Gebrauchslösungen .....	35
Tabelle 9: PCR-Mix.....	36
Tabelle 10: Verwendete Primer für die PCR.....	36
Tabelle 11: Zusammensetzung des <i>beads</i> -Mix.....	38
Tabelle 12: Sequenzierungsprimer der Pyrosequenzierung .....	39
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	42
Tabelle 14: Reagenzien TRIS-Puffer .....	43
Tabelle 15: Verwendete Arbeitsprogramme .....	48
Tabelle 16: Klinisch-Pathologische Patientendaten in Korrelation mit den getesteten Biomarkern .....	53
Tabelle 17: Korrelation der untersuchten Biomarker mit den verschiedenen Metastasierungsmustern.....	54
Tabelle 18: Korrelation der untersuchten Biomarker und Biomarkerkombinationen mit den unterschiedlichen Metastasierungsmustern .....	56

# 1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten Krebsarten in der westlichen Welt und zeichnet sich durch seine hohe Mortalität aus. Prognosebestimmend ist die Entwicklung von Fernmetastasen, die schlechteste Prognose haben dabei Tumore, die eine Peritonealkarzinose entwickeln. Dies ist verglichen mit einer Lebermetastasierung ein seltenes Ereignis, aber aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten ist eine frühzeitige Unterscheidung von hoher Relevanz. Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Identifizierung von Biomarkern die mit den einzelnen Metastasierungsmustern korrelieren. Möglich ist das beispielsweise durch eine molekularpathologischen Klassifikation der Tumore: Als vielversprechend gilt die Analyse von Mutationen im Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Signaltransduktionsweg, Tumorsuppressorgenen, den Mismatch Reparatur Defekt (MMRD)-Genen und vor allem die der Expression von Stammzellmarkern. Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg wie die der Protoonkogene *KRAS* oder *BRAF* beeinflussen möglicherweise das Ausbreitungsmuster und sind relevant für das Ansprechen auf die Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens *p53* stellt einen wichtigen Schritt in der Karzinogenese dar und es gibt Hinweise darauf, dass sich die bis heute bekannten Karzinogenesewege hinsichtlich des Vorhandenseins der *p53* Mutation unterscheiden. Auch anhand des Auftretens eines MMR-Defekts lassen sich aktuell schon Rückschlüsse auf Wachstum und Prognose ziehen. Als sehr erfolgsversprechend gilt die Analyse der Expression des Signal- und Strukturproteins  $\beta$ -Catenin und besonders die der Stammzellmarker CD133 und CD44. Sie könnten eine Klassifikation der einzelnen Subgruppen erlauben und gelten als potentielle Ziele neuer Therapien. In dieser Arbeit machte man sich bereits bestehende Erkenntnisse zu Nutze um eine spezielle Auswahl an zu untersuchenden Markern zu treffen. Ziel war die Identifizierung von Biomarkern, die mit dem Metastasierungsmuster korrelieren und die Überprüfung der sehr heterogenen Aussagen bezüglich der Relevanz der einzelnen untersuchten Marker. Dazu wurden in einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie insgesamt 124 Primärtumore untersucht. 37 Fälle des Kollektivs wiesen eine Lebermetastasierung auf, 18 Fälle

eine Peritonealkarzinose und 13 Fälle wiesen beides auf. Als Kontrollgruppe fungierten 56 Fälle die in einem 5-Jahres Follow-up keine Metastasen entwickelten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumore die Lebermetastasen entwickelten eine signifikant erhöhte Expression der untersuchten Biomarker aufwiesen, wobei die Kombination der Stammzellmarker mit  $\beta$ -Catenin die Signifikanz noch verbesserte. In dieser Gruppe traten auch vermehrt Mutationen im *p53* Gen auf. In der Gruppe der Peritonealkarzinosen ließ sich keine erhöhte Expression der Marker  $\beta$ -Catenin, CD133 und CD44 nachweisen, aber vermehrt Mutationen im *BRAF* Gen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathologie des kolorektalen Karzinoms

Mit weltweit 608.700 Todesfällen im Jahr 2008 gehört das kolorektale Karzinom zu einer der häufigsten Krebsarten (1). Es zeichnet sich durch eine hohe Inzidenz und Mortalität aus, wobei die Inzidenz in Australien, Europa und Nordamerika am höchsten ist. Bezogen auf die Geschlechterverteilung ist es die am dritthäufigsten vorkommende Krebsart bei Männern, bei weiblichen Patienten liegt es an zweiter Stelle (1). Das Haupterkrankungsalter der Patienten ist bei beiden Geschlechtern ungefähr gleich verteilt und liegt zu mehr als 90% jenseits des 50. Lebensjahres (1). Im Hinblick auf die Mortalität ist das kolorektale Karzinom eine der führenden Todesursachen bezogen auf die Gesamtheit aller Krebserkrankungen (1): Die relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Stadien eingeteilt nach der Union Internationale contre le Cancer (UICC) liegt bei 60 %, Patienten mit einem UICC Stadium IV Tumor erreichen aber nur Überlebensraten von 8,1% (2, 3).

Die unterschiedlichen Überlebensraten machen es zum Ziel zahlreicher Forschungen, sei es zur Prävention, Diagnostik oder Therapie, denn trotz seiner hohen Inzidenz sind Kriterien, die die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms beeinflussen oder voraussagen können nur unzureichend bekannt.

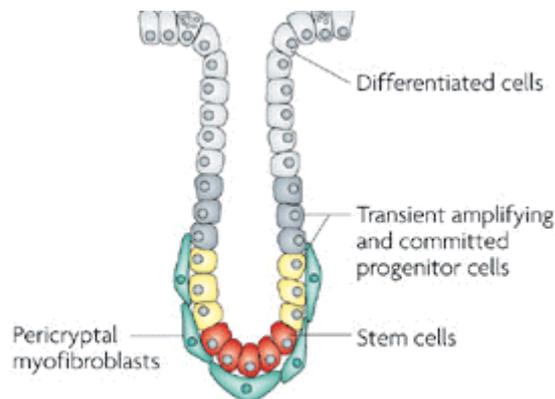
Heute bereits bekannte Faktoren die zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms beitragen sind z. B. das Vorhandensein von Adenomen des Kolons, erbliche Defekte wie bei der Familiären adenomatösen Polypose (FAP), oder der HNPCC (Hereditary non polyposis colon cancer), eine positive Familienanamnese, Adipositas und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (4, 5). Als Risikofaktor spielen Adenome des Kolons mit Abstand die größte Rolle. Bei über 95% aller Tumore des Dickdarms handelt es sich um Adenome und Karzinome. Den viel kleineren Rest machen die seltenen neuroendokrinen Tumoren und Stromatumoren aus (6, 7). Diese Arbeit befasst sich allein mit den Karzinomen, im Speziellen den Adenokarzinomen, malignen Tumoren, die aus epithelalem Gewebe hervorgehen.

Über 90% der Karzinome entstehen sporadisch, weisen eine multifaktorielle Genese auf und es gelten die oben genannten Risikofaktoren. Weitere Risikofaktoren, speziell für die Adenomentstehung sind ballaststoffarme Ernährung und der übermäßige Verzehr von rotem Fleisch (4). Die restlichen ca. 10% der kolorektalen Karzinome entstehen auf dem Boden hereditärer Syndrome wie z. B. der FAP, einem autosomal dominant vererbten Syndrom, bei dem es zur Mutation im *APC*-Gen kommt, so dass die Betroffenen ab dem 20. Lebensjahr hunderte von Polypen entwickeln. Das Risiko an Krebs zu erkranken liegt bei annähernd 100%. Die zweite Erkrankung die mit der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen assoziiert ist, ist das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC) oder Lynch-Syndrom. Ebenfalls eine autosomal vererbte Erkrankung, deren Mutation sich auf verschiedenen Mismatch-Reparatur-Genen befindet. Sie führt eher zu Entwicklung rechtsseitig gelegener kolorektaler Karzinome und wird meist später entdeckt. Des Weiteren können chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis Ulcerosa zur Entwicklung von Karzinomen führen, meist aber erst nach langjährigem Verlauf (6). Anhand dieser Zahlen wird ersichtlich, dass sich der überwiegende Teil der kolorektalen Karzinome auf dem Boden somatischer Mutationen entwickelt und nur ein geringer Anteil aufgrund erblicher Strukturdefekte entsteht.

## 2.2 Karzinomentstehung

Um die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms nachzuvollziehen, ist es notwendig sich mit dem Aufbau der Dickdarmschleimhaut und der den lokalen Gegebenheiten folgenden Adenomentwicklung auseinanderzusetzen. Die Dickdarmschleimhaut besteht wie die des restlichen Darms aus Mukosa (bestehend aus *lamina epithelialis mucosae*, *lamina propria mucosae* und *lamina muscularis mucosae*) und Submukosa, welche das für den Dickdarm typische Oberflächenrelief aus Krypten bilden. Die Zellen in den Krypten sind folgendermaßen organisiert: An der Kryptenbasis befindet sich das sog. Stammzellkompartiment, zur Spitze hin reifere Epithelzellen (8, 9). Aus den basal gelegenen Stammzellen entwickeln sich alle vier reifen Zelltypen des Kolons: Enterozyten, Becherzellen,

enteroendokrine Zellen und Paneth-Zellen. Im Laufe ihrer Entwicklung wandern die unterschiedlichen Zelltypen in Richtung Kryptenspitze um dort abgestoßen zu werden (siehe Abb.1). Der gesamte Prozess dauert zwischen 2 und 7 Tagen (10).



**Abbildung 1:** Modell einer Krypte des Kolons nach (8)

An der Kryptenbasis befindet sich das Stammzellkompartiment (rot), zur Kryptenspitze hin zunehmend ausdifferenzierte Zellen, dazwischen Stammzellen nach asymmetrischer Teilung, die TA-Zellen (gelb).

Die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms kann nach heutigem Wissenstand prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen: Erstens auf dem Weg der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz nach einem Modell von Fearon und Vogelstein (11), zweitens entlang der sog. "serratierten Route", es existiert zudem auch ein Mischtyp. 80-90 % der Adenokarzinome entwickeln sich über die Adenom-Karzinom-Sequenz. Grundlage der Theorie der Adenom-Karzinom-Sequenz ist, dass sich aus einem Adenom, einer gutartigen Vermehrung Zellen epithelialen Ursprungs, durch Mutationen schrittweise ein bösartiger Tumor entwickelt (11, 12). Adenome kommen bei ca. der Hälfte aller Menschen in der westlichen Welt vor, dass sich aus einem Adenom ein bösartiger Tumor entwickelt geschieht aber nur in einem von 10 Fällen (7). Ob sich aus einem Adenom ein Karzinom entwickelt, hängt von verschiedenen Faktoren ab, zum Beispiel vom histologischen Typ, der Größe und der Anzahl der Adenome (7).

Der histologische Typ eines Adenoms kann entweder tubulär, tubulovillös oder villös sein, das tubuläre tritt dabei am häufigsten auf. Die Unterscheidung wird anhand des histologischen Wachstumsmusters getroffen: So setzen sich tubuläre

Adenome z. B. zum überwiegendem Teil aus verzweigten tubulären Drüsen zusammen, während villöse Adenome eher finger-, bzw. zottenartige Wachstumsstrukturen besitzen und zumeist größer sind als tubuläre Adenome. Was das Entartungsrisiko betrifft, ist dieses bei einem Adenom vom villösen Typ am größten und steigt bei Adenomen, die größer als 1 cm sind an (7).

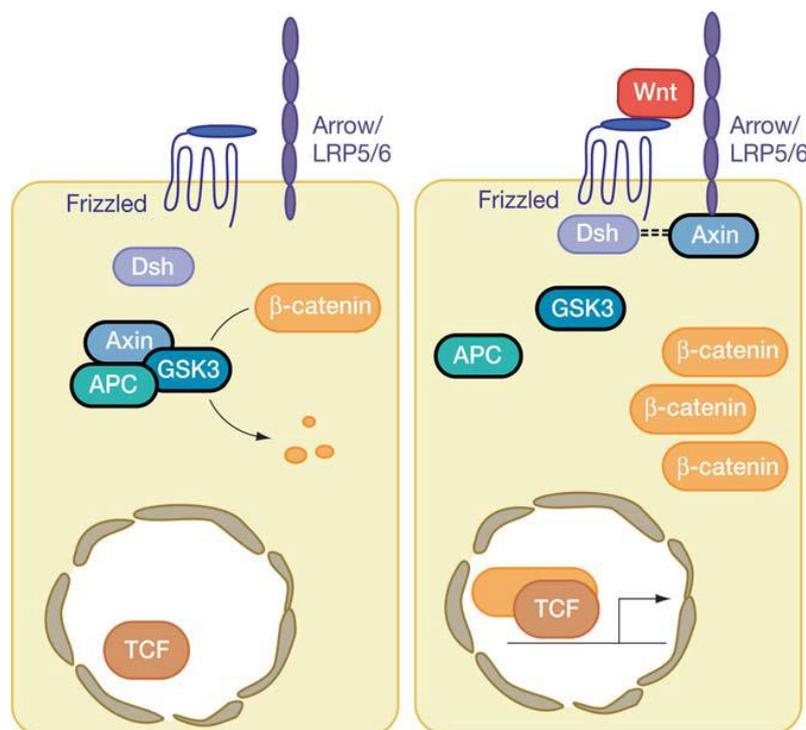
Ein weiterer Subtyp des Adenoms ist das sog. sessile serratierte Adenom (SSA). Dieses folgt jedoch einem anderen Entstehungsmechanismus, der "serratierten Route", als das tubuläre oder villöse Adenom, die sich als "klassische Adenome" zusammenfassen lassen und wird deshalb gesondert betrachtet.

Darüber hinaus ist die Beurteilung der Adenome anhand des "Dysplasie-Grades" von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung einer malignen Neoplasie. Man teilt die Adenome histopathologisch in "low-grade"- und "high-grade" Dysplasie ein. "Low-grade Dysplasie" Adenome, fallen in die Kategorie "benigne Vorläuferläsion" und zählen zu den fakultativen Präkanzerosen. Adenome des Kolons mit "high-grade Dysplasie" und Ausbreitung innerhalb der Mukosa, aber nicht über die *lamina muscularis mucosae* hinaus, gelten nach den Kriterien des American Joint Committee on Cancer (AJCC) als Vorläuferstufe eines malignen Tumors und obligate Präkanzerose (7, 13, 14).

Malignität zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass normale Steuerungsmechanismen der Zelle ausgeschaltet werden und der Körper nicht in das überschießende Wachstum eingreifen kann. Wachstums- und Apoptoseregulation der Zellen unterliegen dabei komplizierten Mechanismen. Einer der bekanntesten und maßgeblich an der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms beteiligten Signaltransduktionswege ist der Wnt-Signalweg, auf dessen Grundlage die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz von Fearon und Vogelstein basiert (11).

Wnt-Proteine sind Signalproteine und gehören zu einer Familie extrazellulärer Glykoproteine, von denen heute 19 verschiedene bekannt sind (15). Durch die Bindung an den Transmembran-Rezeptor Frizzled (Fz) und den low-density lipoprotein receptor-related protein-Rezeptor (LRP) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt deren intrazelluläres Zielprotein  $\beta$ -Catenin ist (16): Fehlt die Aktivierung der Signalkaskade durch ausbleibende Bindung von Wnt an einen der Transmembran-Rezeptoren, so wird  $\beta$ -Catenin in einem "Destruktionskomplex", bestehend aus APC (Adenomatosis Polyposis Coli), GSK3 $\beta$  (glycogen synthase

kinase-3 $\beta$ ) und Axin von der GSK3 $\beta$  phosphoryliert und anschließend in einem Proteasom abgebaut (17). Erfolgt aber die Bindung von Wnt an den Frizzled-Rezeptor startet der sog. kanonische Wnt-Signalweg (siehe Abb.2). Durch den Wnt-Fz-Rezeptorkomplex wird das intrazelluläre Protein Dishevelled (Dsh) aktiviert. Dsh hemmt wiederum den Destruktionskomplex, sodass  $\beta$ -Catenin intrazellulär akkumuliert und in den Zellkern wandert. Hier bildet es mit den Transkriptionsfaktoren der T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef)-Familie einen Komplex und fördert so die Amplifikation bestimmter Zielgene, die bedeutsam für die Zellproliferation sind z.B. C-myc und LGR5 (12, 16-18). Zusammengefasst kann man also sagen, dass je mehr Wnt-Moleküle an den Frizzled-Rezeptor binden, desto weniger  $\beta$ -Catenin wird abgebaut und desto mehr wächst und teilt sich die Zelle.

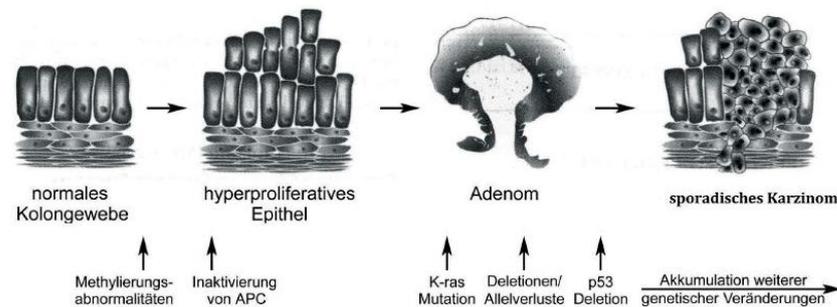


**Abbildung 2:** Der Wnt-Signaltransduktionsweg nach Logan et al. (17)

Linke Seite: Bindet kein Wnt-Molekül an den Frizzled-Rezeptor wird  $\beta$ -Catenin durch den Destruktionskomplex, bestehend aus Axin, APC und GSK3 $\beta$  abgebaut, es erfolgt keine Tcf kontrollierte Transkription. Rechte Seite: Wnt bindet an den Frizzled-Rezeptor und der Abbau von  $\beta$ -Catenin wird durch die Aktivierung von Dsh und Axin gehemmt. Als Folge akkumuliert  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und im Zellkern und fördert über die Interaktion mit Tcf die Amplifikation bestimmter Zielgene.

Daraus wird ersichtlich, dass Zellwachstum und Differenzierung fein abgestimmten Mechanismen folgen. Kommt es in der Signalkaskade zu einem Fehler aufgrund einer Mutation entweder eines der Tumorsuppressorgene, also Genen deren Proteinprodukte der Regulierung des Zellwachstums dienen, oder einer Mutation eines Protoonkogens, Genen deren Genprodukte Zellproliferation induzieren, so kann das unkontrolliertes Zellwachstum zu Folge haben. In der Adenom- bzw. Karzinomentstehung des Kolons handelt es sich dabei nicht um eine einzelne Mutation, sondern um mehrere. Diese Theorie der sog. Adenom-Karzinomsequenz wurde 1988 von Fearon und Vogelstein erstmals vorgestellt (11, 19) (siehe Abb. 3). Am Anfang der Adenomentwicklung steht die Mutation im *APC*-Gen. *APC* nimmt eine entscheidende Rolle im Zellzyklus ein, es ist eines der Tumorsuppressorgene und besitzt nach Kinzler und Vogelstein eine sog. "Gatekeeper"-Funktion (20): *APC* hat die Aufgabe, Apoptose und Proliferation der Zellen im Gleichgewicht zu halten. Entdeckt wurde die Bedeutung von *APC* in der Entstehung von Adenomen bei Untersuchungen zu hereditären Syndromen mit der Entwicklung kolorektaler Karzinome, der FAP und der HNPCC. Bei der autosomal-dominant vererbten FAP, bilden sich über Jahre hunderte Polypen im Kolon, deren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms bei nahezu 100% liegt. Die zugrundeliegende Mutation wurde auf dem *APC*-Gen lokalisiert (21). Es entwickelt aber nicht jeder Träger der vererbten Variante des mutierten *APC*-Gens ein kolorektales Karzinom. Das führte zu der Annahme, dass der entscheidende Schritt in der Karzinomentstehung eine zusätzliche somatische Mutation auf dem Allel des Chromosoms des gesunden Elternteils sein muss (20). Grundgedanke ist, dass es sich bei der Karzinogenese um einen mehrstufigen Prozess handelt, bei dem die Reihenfolge in der einzelne Mutationen auftreten die Voraussetzung zur Karzinomentwicklung darstellt. Wegweisend waren Beobachtungen, dass z. B. eine Mutation im Tumorsuppressorgen *p53* allein nicht zur Entwicklung eines Karzinoms führt. Ist jedoch der "Gatekeeper" *APC* ausgefallen und folgt im weiteren Verlauf eine Mutation des *p53*-Gens, so entwickelt sich aus einem Adenom mit höherer Wahrscheinlichkeit ein invasiv wachsender Tumor (11, 20). Laut Theorie der Adenom-Karzinom-Sequenz sind zur Ausbildung eines Malignoms also sequentielle Mutationen in mehreren Genen

notwendig, unter anderem folgen im Verlauf Mutationen des *RAS*-Gens, des *BRAF*-Gens und des *p53*-Gens (11, 19, 22) (siehe Abb. 3).



**Abbildung 3:** Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Modell von Fearon und Vogelstein (1990)(19), modifiziert von Toribara et al. (23)

Darstellung der schrittweisen Entwicklung einzelner Mutationen, deren Akkumulation schließlich zu der Entwicklung eines sporadischen kolorektalen Karzinoms führt.

Der Zeitraum in dem sich ein Adenom über die verschiedenen Mutationen zu einem invasiven Tumor entwickelt kann bis zu 10 Jahre betragen (24, 25). Ein weiterer Entstehungsmechanismus des sporadischen kolorektalen Karzinoms stellt die sog. "serratierte Route" dar (26). Bei den Läsionen die sich auf diesem Weg entwickeln handelt es sich um morphologisch und histologisch von den klassischen Adenomen abzugrenzende Formen: Dazu zählen nach neuesten Erkenntnissen der hyperplastische Polyp (HP), das sessile serratierte Adenom (SSA), das traditionelle serratierte Adenom (TSA) und das serratierte Adenokarzinom (27, 28). Sie weisen typische Wachstumsmuster auf, wie eine Hyperserratierung/Serratierung und eine T- und L-förmige Kryptenstruktur (28, 29). Am Anfang dieses alternativen Karzinogeneseweges, der auf einer Dysregulation des RAS-RAF-MAPK-Signalwegs beruht, steht entweder eine Mutation in dem Protoonkogen *KRAS* oder *BRAF*, deren Funktion im Verlauf noch erläutert wird. Diese führen letztendlich ebenfalls zu einer gestörten Apoptoseregulation, mit der Folge, dass die Zellen "überaltern". Im Verlauf kommt es zu einer Hypermethylierung spezieller Genpromoter, den CpG-Islands, die wichtige Faktoren in der Transkriptionsregulation darstellen. Aufgrund dieser Hypermethylierung werden bestimmte Gene, die für die Kontrolle des Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen oder Reparaturgene sind, ausgeschaltet. Darunter sind z. B. *p16* und *hLMH1*. Ein Ausfall des DNA-Mismatch-Reparaturgens *hLMH1*

kann in der betroffenen Zelle zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) führen. Diesen Weg der Karzinomentwicklung bezeichnet man als den sog. CpG-Island-Methylation-Phänotyp (CIMP). Folglich finden sich in Karzinomen, die sich entlang der serratierten Route entwickeln oft ein mutiertes *BRAF*-Gen, hypermethylierte CpG-Islands und eine MSI. Seltener und vor allem eher in den TSAs lassen sich ein mutiertes *KRAS*-Gen und weniger hypermethylierte Regionen (CIMP-low) ausmachen.

Zusammenfassend gibt es nach heutigem Wissenstand drei mögliche Wege, auf denen sich das sporadische kolorektale Karzinom entwickeln kann, s. Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Die verschiedenen Karzinogenesewege des (sporadischen) kolorektalen Karzinoms, modifiziert nach (26, 30)

Karzinogeneseweg	Präkanzeröse Läsion	Initiale Mutation	Folgende genetische Veränderungen	Häufigkeit des Auftretens	MSI Status
Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz	Adenom	<i>APC</i>	<i>KRAS, p53</i>	57%	MSS
Mischtyp, CIMP low	Villöses Adenom oder TSA	<i>KRAS</i>	CpG-Islands Methylierung (CIMP low), <i>APC, p53</i>	20%	MSI-L oder MSS
Serratierte Route, CIMP high	SSA	<i>BRAF</i>	CpG-Islands Methylierung (CIMP high), <i>hMLH1</i>	20%	MSI-H (8% MSS oder MSI-L, Typ 2 nach Jass, J.R.)

hMLH1: human Mut L homologue, MSI: Mikrosatelliteninstabilität; MSI-H: MSI-High, 2 von 5 Mikrosatellitenmarkern sind instabil; MSI-L: MSI-Low, 1 Marker ist instabil; MSS: Mikrosatelliten stabil; SSA: Sessiles Serratiertes Adenom; TSA: Traditionelles Serratiertes Adenom

### 2.3 Stammzellkonzept

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die das Potential zur Selbsterneuerung besitzen und die Fähigkeit, differenzierte Zellen hervorzubringen. Sie sind meist nur in geringer Anzahl in den einzelnen Geweben zu finden, da sie aufgrund ihrer lebenslangen Persistenz und den ihnen zu eigenen Eigenschaften im Falle einer Mutation schnell eine klonale Dominanz entwickeln können (31, 32). Besonders wichtig ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in Geweben mit hohem

Zellumsatz wie in den Krypten des Gastrointestinaltrakts oder dem blutbildenden System (33). Erstmals entdeckt wurden Stammzellen im hämatopoietischen System, ausgehend von dieser Zellart bilden sich alle Zelllinien des Blutes (31). Zu Nutzen macht man sich diese Stammzellen heute z. B. bereits im Rahmen der Knochenmarkstransplantation. Die Besonderheit der Stammzellen ist die sog. asymmetrische Teilung: Wenn sich eine Stammzelle teilt, reproduziert sie einmal sich selbst und bildet gleichzeitig eine Transit Amplifying (TA) -Zelle, aus der dann die ausdifferenzierten Zellen hervorgehen (34). In der Schleimhaut des Kolons sitzen die Stammzellen an der Kryptenbasis, s. Abb. 1, vermehren sich durch asymmetrische Teilung und die ausdifferenzierten Zellen wandern im Verlauf in Richtung Kryptenspitze und werden abgestoßen.

### **2.3.1 CSC's: Cancer Stem Cells**

Tumore weisen eine hierarische Organisation aus sog. Cancer Stem Cells (CSC's) und differenzierten Zellen auf: Die CSC's selbst stellen nur einen kleinen Anteil aller Zellen des Tumors dar, besitzen aber das Potential zur Selbsterneuerung und Tumoringenieurung. Den weit größeren Anteil machen die aus den CSC's und Transit Amplifying Cells (TA's) hervorgehenden differenzierten Tochterzellen aus. Es gilt heute die Meinung, dass Tumoren nicht nur eine einfache Vermehrung monoklonaler, entarteter Zellen sind, sondern vielmehr als Verbände von Zellen abnormen Wachstums, entsprungen aus einer kleinen Anzahl pathologisch transformierter CSC's zu betrachten sind (31, 35). Bei den CSC's handelt es sich also um eine Subpopulation in der Tumorzellmasse, die Stammzelleigenschaften aufweist und in der Lage ist, alle Zellen innerhalb des Tumors zu produzieren (32). Sie erhalten durch meist mehrfache genetische Mutationen einen Selektionsvorteil und können sich so im Gewebe ausbreiten (36). Woher die CSC's die Fähigkeit Tumorzellwachstum zu initiieren erhalten, ist noch ungeklärt (32). Untersuchungen zeigen, dass CSC's im Xenograft-Modell tumoringenieurende Eigenschaften besitzen und sich mittels geeigneter Biomarker im Tumorgewebe detektieren lassen. Zum Beispiel sind CSC's in der Lage in Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immundeficiency-Mäusen (NOD/SCID-Mäuse) eine humane Form der

Akuten Myeloischen Leukämie (AML) hervorzurufen (37). Durch die Stammzelleigenschaften sind CSC's befähigt sowohl eine Rolle in der Metastasierung zu spielen, als auch teilweise Resistenzen gegenüber bestimmten Chemotherapeutika zu entwickeln (31, 35). Auch beim kolorektalen Karzinoms scheint der Ursprung der Entartung in den CSC's zu liegen. Grund zu der Annahme ist unter anderem die Tatsache des hohen Zellumsatzes in den Krypten des Kolons, der den bereits ausdifferenzierten Zellen praktisch keine Zeit lässt, maligne zu entarten (33). Deshalb richtet sich der Fokus der Forschung auf das in der Kryptenbasis gelegene und dort zeitlebens verbleibende sog. Stammzellkompartiment (s. Abb.1). Durch Mutationen in den bereits erwähnten Signaltransduktionswegen erlangen eine oder mehrere CSC's die Fähigkeit sich öfter zu teilen und entwickeln durch Selektionsvorteile eine klonale Dominanz. So können sie sich in der Krypte ausbreiten und bilden ein Adenom. Zwei Theorien beschäftigen sich mit dem Ausbreitungsmuster innerhalb der Krypte: Auf der einen Seite existiert das sog. "Top-Down"- Modell, postuliert von der Vogelstein-Gruppe (38), auf der anderen Seite das "Bottom-Up"- Modell, das z. B. Preston et al. (39) in ihrer Arbeit beschreiben. Das "Top-down"- Modell besagt, dass sich ein Adenom von der Kryptenspitze hin zur Basis entwickelt, das "Bottom-up"- Modell beschreibt die Entwicklung eines Adenoms vom Kryptengrund hin in Richtung Dickdarmlumen. Diese zwei Modelle werden kontrovers diskutiert und es gibt Hinweise dafür, dass sich ein kolorektaler Tumor zuerst anhand des "Bottom-up"- Modells und mittels Kryptenteilung ausbreitet und im weiteren Verlauf die Ausbreitung über das "Top-down"- Modell voranschreitet (39).

### **2.3.2 Stammzellmarker**

Die molekularpathologische Charakterisierung der CSC-Phänotypen ist in der heutigen Zeit Forschungsschwerpunkt vieler wissenschaftlicher Arbeiten. Im Bereich des kolorektalen Karzinoms ist eine Charakterisierung von Interesse, da sie Aussagen über den Ursprung der Karzinome zulässt und auch nicht unwichtig für die spätere Entwicklung, z.B. die Metastasierungsmuster sind. Des Weiteren ist es vorrangiges Ziel der Krebstherapie die Erkrankung nach Möglichkeit kurativ zu

behandeln. Das setzt voraus mittels therapeutischer Intervention jede einzelne der entarteten Zellen eliminieren zu können. Besonders die, die das Tumorstadium initiieren und aufrecht erhalten. Da die CSC's jedoch nur einen sehr geringen Anteil der Zellen in den Krypten ausmachen und sich histologisch nicht von den schon differenzierten Zellen unterscheiden lassen, liegt das Augenmerk aktueller Forschung auf der Identifikation der CSC's anhand der ihnen eigenen Eigenschaften, den sog. Stammzellfaktoren. Das bedeutet z. B. die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, mit denen die Stammzellen phänotypisch charakterisiert werden können.

Auch in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ist es der Forschung gelungen, Stammzellen anhand bestimmter Oberflächenmarker zu identifizieren. Hier sind vor allem die Oberflächenantigene CD133 und CD44 zu nennen (40-43). Die aktuelle Studienlage weist darauf hin, dass sowohl CD133 als auch CD44 als geeignete Marker fungieren könnten, Aussagen über den Grad der Invasivität oder der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung zu treffen (44, 45). Wobei anzumerken ist, dass CD133 eher als Marker für die Metastasierung anzusehen ist und CD44 eine Rolle in der Initiierung des Tumorstadiums zu spielen scheint (46, 47).

## **2.4 Metastasierungswege und Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms**

Eine besondere Eigenschaft von malignen Tumoren besteht darin, dass sie die Fähigkeit zur Metastasenbildung besitzen. Das bedeutet, dass sich einzelne Tumorzellen aus dem lokalen Tumorverband lösen und über die Blutbahn oder die Lymphgefäße in anderes, tumorfremdes Gewebe einwandern. Dort erreichen sie in einer anderen Umgebung und anderen Bedingungen wiederum die Ausbildung eines neuen Tumors. Jeder Tumor folgt bei der Metastasenbildung bestimmten Rahmenbedingungen: Karzinome des Gastrointestinaltrakts bilden z. B. aufgrund der lokalen Gegebenheiten, hier dem Blutabfluss über die Vena Portae, vornehmlich Metastasen in der Leber. Andere Tumore "bevorzugen" aus bisher noch nicht genau bekannten Ursachen bestimmte Zielgewebe, die nicht in ihrem

direkten Lymph-oder Blutabflussgebiet liegen für die Metastasenbildung, wie z. B. das Prostatakarzinom Knochengewebe (48, 49).

Im Falle des kolorektalen Karzinoms gibt es mehrere Möglichkeiten der Tumorausbreitung: Eine Fernmetastasierung erfolgt am häufigsten in die Leber, seltener in die Lunge und sehr selten und mit der schlechtesten Prognose erfolgt eine lokale Metastasierung in das Peritoneum mit Ausbildung einer Peritonealkarzinose (50, 51). Auf dem Wege zur Entstehung einer Metastase spielen viele Faktoren zusammen: sie beginnt mit der Entwicklung eines invasiv wachsenden Tumors, der Migration in das Blutsystem (Invasion) und dem Überleben der Angriffe des körpereigenen Immunsystems im Blutstrom (Circulation) bis hin zur Besiedelung des neuen Organs (Extravasation, Kolonisation)(50, 52). Dabei ist es von der Art des Primärtumors abhängig, wie lange die einzelnen Schritte dauern. So entwickelt ein Brustkrebs, Stadium I über Jahre bis Jahrzehnte keine Metastase, das bedeutet es besteht eine lange Latenz zwischen Infiltration und Kolonisation. Ein kolorektales Karzinom dagegen braucht teils Jahrzehnte bis es sich aus einem Adenom entwickelt, jedoch nur wenig Zeit bis es durch Kolonisation Metastasen bildet (50). Der Status der Fernmetastasierung zum Diagnosezeitpunkt ist beim kolorektalen Karzinom von großer Bedeutung, da es sich um den wichtigsten Prognosefaktor für das Überleben handelt (52).

So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate eines Patienten mit einer Lebermetastasierung unter adäquater Therapie heute um die 40-60%, die 5-Jahres-Überlebensrate eines Patienten mit einer Peritonealkarzinose (ca. 10% der Patienten zum Diagnosezeitpunkt) im Durchschnitt zwischen 6 und 20 Monaten (53-55).

## **2.5 Behandlungsmöglichkeiten des kolorektalen Karzinoms**

Im Falle des kolorektalen Karzinoms richtet sich die Behandlung nach mehreren Faktoren. So werden einerseits den Patienten betreffende Faktoren, wie Alter und Vorerkrankungen in den Therapieplan miteinbezogen, andererseits aber auch speziell den Tumor betreffende. Unser Hauptaugenmerk liegt im Folgenden

auf den, den Tumor betreffenden Kriterien. Die Planung der Behandlung eines kolorektalen Karzinoms erfolgt grundsätzlich immer erst nach der histologischen Untersuchung des Tumors, da z. B. intraepitheliale Tumore nur lokal exzidiert werden.

Primär muss vor der Behandlung auch gesichert werden, ob es sich um ein Kolon- oder Rektumkarzinom handelt, da sie sich in ihrer Therapie unterscheiden. Da in dieser Arbeit sowohl Patienten mit Kolon- als auch mit Rektumkarzinomen eingeschlossen wurden, soll kurz auf die Therapie beider Lokalisationen eingegangen werden.

Laut Definition der aktuellen S3 Leitlinie (Version Juni 2013) gelten als Rektumkarzinome "Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist. Nach der 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 " (56).

Da die Therapiemöglichkeiten und Empfehlungen sehr umfangreich sind, soll hier nur ein kurzer Überblick gegeben werden: Prinzipiell kann man sagen, dass vor der eigentlichen Therapie immer eine Ausbreitungsdiagnostik erfolgen sollte, da die Frage nach bereits vorhandenen Metastasen und der lokalen Ausbreitung wie bereits erwähnt einen hohen prognostischen Wert besitzt. Um die Ausbreitung zu beurteilen, werden verschiedenste diagnostische Mittel genutzt, wie z.B. die Koloskopie, Sonographie, MRT oder PET-CT. Eine Einteilung der verschiedenen Tumorstadien ist Tabelle 2 zu entnehmen. Handelt es sich um einen Tumor ohne Metastasen erfolgt die Beurteilung der jeweiligen individuellen Faktoren des Patienten, wie Alter und Vorerkrankungen und nach Abschätzung des Operationsrisikos meist die primäre radikalchirurgische Exzision. Das Ausmaß der Exzision und der entfernten Lymphknoten richtet sich sowohl nach der genauen Lage im Verlauf des Kolons, als auch nach dem intraoperativen Staging. Ziel ist die Entfernung des Tumors, sodass möglichst kein Tumorgewebe mehr am Resektionsrand histologisch nachweisbar ist (R0) und die vollständige Entfernung des zur jeweiligen Gefäßversorgung des tumorbefallenen Darmabschnitts gehörenden Lymphabflussgebiets, um die weitere Ausbreitung des Tumors zu verhindern. So

wird bei einem Karzinom im Kolon descendens welches über die Aa. sigmoideae und die A. colica sinistra in die A. mesenterica inferior streuen würde, eine komplette linksseitige Hemikolektomie mit vollständiger Durchtrennung der A. mesenterica inferior und der Resektion der dazugehörigen Lymphknoten angestrebt (56).

Handelt es sich um ein Rektumkarzinom so muss geklärt werden, ob der Patient vor der Operation eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten soll. Dies ist abhängig vom jeweiligen UICC-Stadium: Empfohlen wird die neoadjuvante Radio- oder die kombinierte Radiochemotherapie vor allem bei einem UICC-Stadium II und III, aber auch in speziellen Fällen wie z. B. dem "Downsizing" (Verkleinerung) eines T4 Tumors. Nach erfolgter operativer Therapie erhalten Patienten mit einem Rektumkarzinom in vielen Fällen eine adjuvante Radiochemo- oder Chemotherapie um die Lokalrezidivrate gering zu halten.

(Neo-) Adjuvante Therapien im Bereich des Kolonkarzinoms kommen z. B. im Falle einer primären Metastasierung zum Einsatz oder auch in palliativen Situationen. Basierend auf aktuellen Studien, profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie vor allem Patienten mit UICC Stadium III, bei Stadium II ist die Studienlage unklar (55). In der Behandlung der Tumore im Bereich des Kolons und Rektums kommen folgende Chemotherapeutika standardmäßig zum Einsatz: 5-Floururacil (5-FU), Oxaliplatin und Irinotecan, seltener auch Capecitabin. Die gängigsten Therapieschemata sind entweder die Monotherapie mit 5-FU, das FOLFOX- oder FOLFIRI-Schema. Es handelt sich hierbei um unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Therapeutika. Desweiteren werden Metastasen, synchron oder metachron auftretend teilweise mit neoadjuvanter Chemotherapie behandelt. Sofern sie den Kriterien der Resektabilität entsprechen können sie auch primär reseziert werden oder auch teils mit anderen Methoden wie der z.B. der Radiofrequenzablation behandelt werden (56).

Empfohlen wird auch eine *KRAS*-Mutationsanalyse durchzuführen. Diese ist seit 2008 Voraussetzung bei der Planung der chemotherapeutischen Behandlung, da nur falls es sich bei dem Tumor um einen *KRAS*-Wildtyp handelt, eine anti-EGFR-Therapie mit z.B. Bevacizumab in Betracht gezogen werden kann (56, 57).

Handelt es sich bei dem Tumor um ein Kolonkarzinom mit einer (synchronen) Peritonealkarzinose, so ist die Prognose signifikant schlechter, da die Behand-

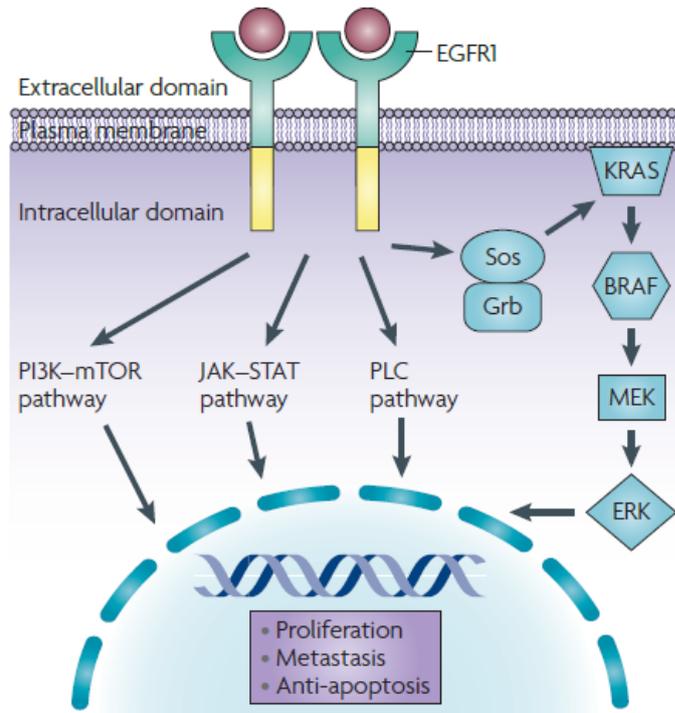
lungsmöglichkeiten hier stark eingeschränkt sind. Unter bestimmten Umständen kann eine hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) erwogen werden, die Studienlage dazu ist aber noch sehr dürftig und sie kann nur in bestimmten Zentren erfolgen. Auch hier ist momentan die radikale chirurgische Therapie mit eventuell folgender adjuvanter Chemotherapie noch das Standardverfahren.

**Tabelle 2:** Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2010, nach (56)

UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1 / T2	N0	M0
Stadium II	T3 / T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1 / N2	M0
IIIA	T1 / T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3 / T4	N1	M0
	T2 / T3	N2a	M0
	T1 / T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3 / T4a	N2b	M0
	T4b	N1 / N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

## 2.6 Theoretische Grundlagen der untersuchten Marker

### 2.6.1 *KRAS* und *BRAF*



**Abbildung 4:** Der EGFR-Signaltransduktionsweg nach Walther et al. 2009 (58)

EGFR-Signaltransduktionsweg: Durch Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor bildet dieser ein Homodimer auf der zytosolischen Seite und aktiviert mehrere Signalkaskaden. Über die Proteine Sos und Grb wird die KRAS-Signal-Kaskade gestartet: KRAS und sein Effektor BRAF aktivieren MEK/ERK und führen damit einer gesteigerten Transkription von Genen, die einen Einfluss auf z.B. die Zellproliferation und Apoptose besitzen.

*BRAF* und *KRAS* spielen eine Rolle in der Regulierung des MAPK-Signaltransduktionsweges (mitogen-aktivierten-Protein-Kinase-Signaltransduktionswegs). Es handelt sich bei *KRAS* und *BRAF* um sog. Proto-Onkogene. Eine Mutation in einem für ein Proto-Onkogen kodierendem Kodon kann zu einer Wachstumsenthemmung der betroffenen Zelle führen. Bei Mutationen des *KRAS*- oder *BRAF*-Gens führt eine Mutation zu einer Deregulierung des für Wachstum, Apoptose, Migration, Invasion und Angiogenese zuständigen EGFR-abhängigen Signaltransduktionweges, zu der der MAPK-Weg gehört. Durch die Bindung eines Liganden an das zur Familie der Tyrosinrezeptorkinasen gehörende EGFR-Transmembranprotein wird die Signalkaskade gestartet (s. Abb. 4).

Es folgt über die Proteine Grb (Growth factor receptor-binding protein) und Sos (Son of sevenless protein) die Aktivierung von KRAS und anschließend BRAF. Die Aktivierung der Serin-Threonin Kinase BRAF hat die Phosphorylierung von MEK (MAPK/ERK aktivierende Kinase) und anschließend ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), die zu der Gruppe der MAP-Kinasen gehört zur Folge. Die Aktivierung von ERK fördert dann die Expression von Genen des Zellwachstums. Wie man heute weiß, scheint der MAPK-Weg in bis zu 30% aller Krebsformen durch eine Mutation in einem der drei *RAS*-Gene (*KRAS*, *NRAS* und *HRAS*) entreguliert und überaktiv zu sein (59). Mutationen im *KRAS*-Gen kann man im Falle des Kolonkarzinoms in ca. 40-50% aller Fälle nachweisen (60, 61). Bei Karzinomen mit sog. *KRAS*-Wildtyp, lassen sich wiederum in 5 – 15 % Mutationen im *BRAF*-Gen nachweisen (7, 62). Mutationen im *KRAS*-Gen finden sich in ca. 95% der Fälle auf dem Kodon 12 und 13 des Exons 2 (7, 61), wobei es sich in 98% der Fälle um Missense-Mutationen handelt, bei denen der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Basenabfolge erfolgt. Eine Übersicht über die häufigsten Mutationen bezogen auf den Anteil an allen *KRAS*-Mutationen in einer Studie von Neumann et al. bietet Tabelle 3. Mutationen im *BRAF*-Gen befinden sich meist auf Exon 11 und 15, in ca. 90% in Exon 15 auf der Position des Kodons 600 (63).

**Tabelle 3:** Die häufigsten Mutationen auf Kodon 12 und 13 in 400 Fällen metastasierter Kolonkarzinome mit *KRAS*-Mutation aus einem Kollektiv von 1018 untersuchten Fällen modifiziert nach Neumann et al. 2009 (64).

<i>Kodon</i>	<i>Art der Punktmutation</i>	<i>Prozentsatz</i>
12	c.35G>A	36,0%
	c.35G>T	21,8%
	c.34G>T	8,0%
	c.34G>A	6,5%
	c.35G>C	6,0%
	c.34G>C	1,3%
13	c.38G>A	18,8%

### 2.6.2 *p53*

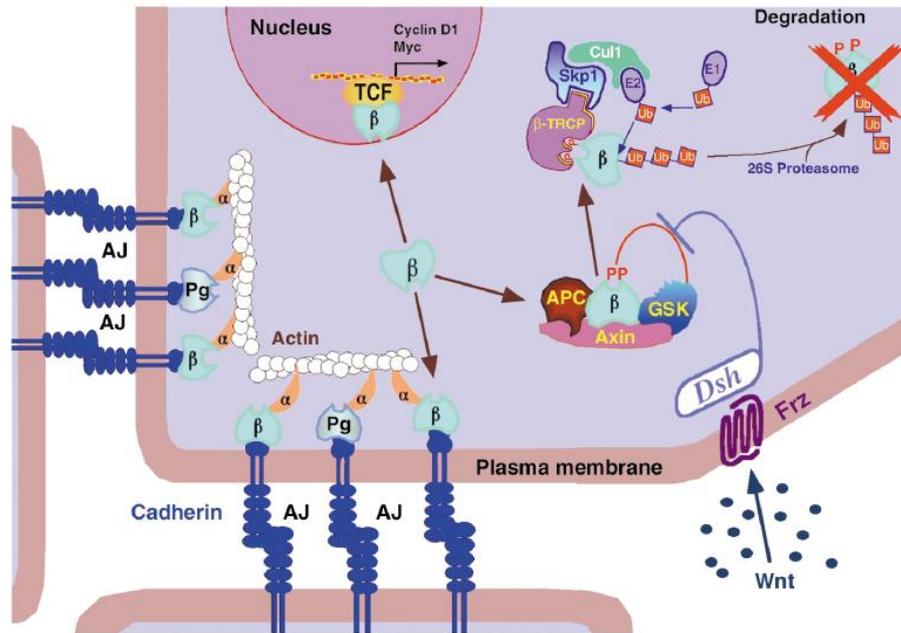
Das *p53*-Gen gehört zu der Familie der Tumorsuppressorgene. Es ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und damit Wachstum und Apoptose der Zelle (62, 65). Unter normalen Umständen wird *p53* im Falle eines DNA-Schadens vermehrt synthetisiert, was in der Zelle dazu führt, dass der Zellzyklus im Übergang von der  $G_1$ - in die S-Phase angehalten wird (66). *p53* initiiert während der Blockade des Zellzyklus die Synthese von DNA-Reparatur-Genen, sodass im Falle einer vollständigen DNA-Reparatur die Blockade wieder aufgehoben wird. Ist der DNA-Schaden aber irreparabel, so induziert *p53* die Apoptose (66). In der Krebsentstehung scheint eine *p53*-Mutation bei der Entwicklung multipler Tumorentitäten eine Rolle zu spielen, wie z.B. bei Kolon-, Ovarial-, oder Lungenkrebs. Es kann sich bei der Mutation des Tumorsuppressorgens sowohl um einen Verlust eines oder beider Allele auf Chromosom 17 handeln, als auch um eine sogenannte Missense-Mutation (66). In der Entstehung von Kolonkarzinomen lässt sich bei ca. 60-70% eine Mutation des *p53*-Gens nachweisen, bei der es sich in 95% um eine Punktmutation handelt, also eine Missense-Mutation (22). Der Verlust des Wildtyp-*p53* trägt zur Adenom-Karzinom-Transition im Rahmen der bereits erwähnten Adenom-Karzinom-Sequenz bei, also der Entwicklung eines bösartigen Karzinoms über verschiedene Mutationsabfolgen im Genom einer Zelle (s. Tab. 1 und Abb.3).

### 2.6.3 $\beta$ -Catenin

Wie bereits in der Erläuterung der einzelnen Signalwege, die bei der Entwicklung eines Kolonkarzinoms von Bedeutung sind erwähnt, erfüllt das Protein  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor (17, 18, 67). Es stellt aber auch einen Bestandteil der Zonula adhaerens dar und ist hier am Aufbau der Zonula Adhaerens Junctions (AJ, siehe Abb. 5) zwischen den Zellen eines Zellverbands beteiligt.  $\beta$ -Catenin befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zelle und ist an das Transmembranprotein E-Cadherin gebunden, welches die AJ's zwi-

schen den Zellen bildet. Durch die Zell-Zell-Verbindungen erhalten die Gewebeverbände eine geordnete Struktur und die Zellpolarität wird durch sie gewährleistet.  $\beta$ -Catenin stellt über  $\alpha$ -Catenin eine Verbindung von der Transmembranproteindomäne der AJ und dem  $\beta$ -Catenin-Aktin-Zytoskelett her (68). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ist  $\beta$ -Catenin im Zellkern lokalisiert. Durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges wird  $\beta$ -Catenin stabilisiert und akkumuliert im Zellkern. Diese Akkumulation führt dazu, dass über bestimmte Transkriptionsfaktoren, den Lymphoid Enhancer-Binding-Factor (LEF) und den T Cell Factor (TCF) die Proliferation und Entdifferenzierung gefördert werden. So wird verständlich, warum sich bei genauerer Betrachtung des Aufbaus der Kolonschleimhaut, die Zellen mit hoher Akkumulation des membranständigen  $\beta$ -Catenins an der Kryptenspitze befinden und eine niedrige Proliferation, aber hohe epitheliale Differenzierung aufweisen. Die Zellen wiederum, die eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin im Zellkern enthalten, vermehren sich an der Kryptenbasis und zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus (69).

$\beta$ -Catenin scheint durch diese Eigenschaften eine Rolle in der Entwicklung der Invasivität zu spielen: So wird häufig eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) an der Invasionsfront kolorektaler Karzinome gefunden (70). Bei der EMT erlangt der Tumor durch den mesenchymalen Phänotyp die Eigenschaft Zell-Zell-Kontakte zu lösen und in das Gewebe zu invadieren (71, 72). Die Proliferationsrate scheint dabei aber eher niedrig zu sein (73, 74). Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition ist ein natürlicher Vorgang, der in der Entwicklung und im Wachstum mehrzelliger Lebewesen eine große Rolle spielt. In der Tumorentwicklung führt eine vermehrte Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zellkern, vornehmlich an der Invasionsfront, wahrscheinlich zum Gewinn von Eigenschaften die die Metastasenbildung und Invasivität fördern: Zellen können sich dem Zellverband lösen, in die Blutbahn eintreten und schließlich am Ort der Metastasenbildung das weitere Wachstum initiieren (75).



**Abbildung 5:** Die duale Funktion von  $\beta$ -Catenin nach (68)

Durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an die Adhensions-Komponente der Cadherine bildet sich der sog. Cadherin-Catenin-Komplex und verbindet Cadherin dadurch mit zytoplasmatischem Actin.  $\beta$ -Catenin spielt auch eine Rolle im Wnt-Signalweg: Bindet Wnt an den Frizzled-Rezeptor wird über eine Signalkaskade der Abbau von  $\beta$ -Catenin in Proteasomen verhindert,  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Nucleus und führt zur Transkription bestimmter Zielgene.

#### 2.6.4 CD133 und CD44

Im Rahmen der Erläuterungen des sog. Stammzellkonzepts zur Entwicklung eines Kolonkarzinoms wurden bereits die Oberflächenmarker CD133 und CD44 erwähnt. CD133 ist die glykolisierte Form eines Oberflächenantigens, dem AC133. Einem Oberflächenmolekül bestehend aus fünf Transmembran-Domänen, das erstmals 1997 von Yin et al. auf CD34+ hämatopoietischen Stammzellen isoliert wurde (76). CD133 selbst kommt auf differenzierten Zellen, z. B. Plasmamembranausstülpungen von Epithelzellen vor. Sowohl die physiologische Funktion von CD133, als auch seine Rolle in der Tumorgenese sind noch nicht ausreichend geklärt. Es gibt unterschiedliche Meinungen zu der Bedeutung von CD133: Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass CD133 entscheidend an der Dysregulation der Proliferation während der Tumorgenese beteiligt ist (41), andererseits postulieren einige Studien, dass CD133 keinen Einfluss auf das Tumorstadium habe, jedoch trotzdem in den sog. Stammzellen angereichert ist, was es wichtig für die Detektion der Stammzellen innerhalb des Tumors macht (44).

Ein weiteres als potentieller Stammzellmarker identifiziertes Oberflächenantigen ist CD44. CD44 ist ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein, das z. B. als Rezeptor für Hyaluronsäure dient. Hyaluronsäure spielt eine große Rolle im Aufbau und der Erneuerung verschiedener Gewebe, somit scheint CD44 wichtig in der Tumorentwicklung zu sein (47). Darüber hinaus fungiert es als Rezeptor für einige Wachstumsfaktoren und als Verbindung zwischen Zellwand und Extrazellulärmatrix (47). Aufgrund der Tatsache, dass CD44 zu Veränderungen der Zellmorphologie (erhöhtes CD44 führt zu einer mehr "mesenchymalen" Morphologie) und der Zellmigration beiträgt, ist anzunehmen, dass CD44 ebenfalls für die EMT bedeutsam ist (77). Der Kerngedanke der EMT in Bezug auf das Tumorwachstum ist, dass im Laufe der Karzinomentstehung ortsansässige epitheliale Tumorzellen Eigenschaften von mesenchymalen Zellen entwickeln, wie z. B. eine Veränderung der Zellmembran-Cadherine und eine Umkehrung der Zell-Polarität (77). So wandeln sich die Zellen durch die EMT zu invasions- und abwanderungs- und damit zur Metastasierung fähigen Zellen (72, 78).

### **2.6.5 hMLH1 und hMSH2**

Diese Marker bilden die Untersuchungsgrundlage für die Detektion des sog. Mismatch Reparatur Defekts (MMRD). Ein MMRD kann eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zur Folge haben. Diese findet sich vor allem in Tumoren bei Patienten mit Lynchsyndrom oder aber bei den ca. 15 % der sporadisch auftretenden Kolonkarzinome die sich über die serratierte Route entwickeln (s. Tab.1) (79, 80). Die serratierte Route der Karzinomentstehung zeichnet sich dadurch aus, dass einerseits bis zu 70% der Karzinome eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen und oftmals Mutationen der für BRAF und KRAS kodierenden Gene zu finden sind (81).

Während der DNA-Replikation sorgen bestimmte Reparaturproteine dafür, dass in der Basenpaarung aufgetretene Fehler wieder repariert werden. Die Gene die für diese DNA-Polymerasen kodieren sind die sog. "mismatch-repair"-Gene. Zu diesen Mismatch-Reparatur Genen gehören unter anderem *hMLH1* (human Mut L Homologue 1) und *hMSH2* (human Mut S Homologue 2) (82). Dabei liegt die Mutation die einen MMR-Defekt zur Folge hat zu 50% auf dem *hMLH1* Gen und

zu 40% auf *hSMH2* (83). Gene können aber nicht nur durch eine Mutation einen Funktionsverlust erfahren, sondern auch mittels einer Hypermethylierung ausgeschaltet werden, sog. "Silencing". DNA-Methylierung bedeutet, dass an bestimmten Stellen des Genoms, den CpG-Islands, durch DNA-Methyltransferasen Methylgruppen an die DNA gekoppelt werden, was dazu führt, dass das betroffene Gen ausgeschaltet wird (Silencing) (79, 81). Bei den Genprodukten von *hMLH1* und *hMSH2*, den Genen des Mismatch-Reparatur Systems (MMR) führt die Hypermethylierung der CpG-Islands zu einem Ausfall der Proteinexpression. Dadurch werden erstens Mutationen durch das fehlerhafte MMR-System nicht mehr erkannt und zweitens teilweise Veränderungen in der Länge der sog. Mikrosatelliten-DNA nicht repariert. Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen die im gesamten Genom verteilt zu finden sind, meist in nichtkodierenden Abschnitten des Genoms. Durch die veränderten Längen der Mikrosatelliten lassen sich die Tumorzellen von Normalgewebe unterscheiden. Befinden sich die repetitiven Sequenzen in kodierenden Sequenzen, was selten der Fall ist, so kann eine Längenänderung zu einer Inaktivierung des Gens führen und zu einer Wachstumsenthemmung führen (79). Bei sporadischen kolorektalen Karzinomen tritt vorwiegend ein *hMLH1*-Verlust durch Methylierung des Promoters auf, Mutationen finden sich hingegen nur bei einem HNPCC. Eine Hypermethylierung von *hMLH1* ist in 90% (83) der MMR-Defekt positiven Tumore zu finden. Aufgrund der strengen Selektion des Kollektivs, wurden bereits alle HNPCC-Fälle im Vorfeld ausgeschlossen, daher ist in dieser Studie nur ein *hMLH1* Verlust zu erwarten. Durch die zusätzliche Analyse von *hMSH2* können jedoch auch die fälschlich eingeschlossenen HNPCC- Fälle ausgeschlossen werden.

### 3 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Fortschritte in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist dieses immer noch die zweit- bis dritthäufigste Todesursache in der westlichen Welt (1). Durch die Untersuchung der Entstehungsmechanismen und durch die Differenzierung einzelner Subgruppen wird erwartet, bessere Behandlungsmöglichkeiten zu identifizieren und dadurch je nach Stadium und Art des Tumors individuelle Therapiekonzepte zu entwickeln.

Je nach Lokalisation der Metastase unterscheiden sich die Überlebensraten erheblich untereinander. Es wird angenommen, dass anhand von Biomarkern bereits in frühen Stadien der Tumorentwicklung Rückschlüsse auf die mögliche Ausbreitung gezogen werden können (84). Es wurden bereits einige Faktoren identifiziert, die prognostisch auf die Entwicklung einer Peritonealkarzinose hinweisen: Lemmens et al. konnten in ihrer Studie z. B. hohe T und N Stadien, schlechte Differenzierung und vermehrt rechtsseitig auftretende Karzinome als Risikofaktoren ausmachen (84, 85), diese Faktoren besitzen aber nicht ausreichend prognostischen oder prädiktiven Wert.

Diese Arbeit untersucht die Expression mehrerer erfolgsversprechender Marker im Zusammenhang mit den verschiedenen Ausbreitungsmustern des Kolonkarzinoms. Hierbei stützt man sich auf bereits bestehende Erkenntnisse im Bereich der gewebe- und tumorspezifischen Zellbiologie und macht sich die fortschreitende Entwicklung im Bereich der Stammzellforschung zu Nutze. Folgenden Parameter wurden untersucht: Prädiktive Biomarker wie z.B. der Mutationsnachweis von *KRAS* und *BRAF*, die Expression des Tumorsuppressors p53, sowie die quantitative Expression der Stammzellmarker CD133, CD44 und des Strukturproteins  $\beta$ -Catenin, sowie die Expression von hMLH1 und hMSH2 zum Nachweis eines Mismatch-Reparatur-Defekts. Es wird angenommen, dass die untersuchten Marker einen Einfluss auf die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms haben und speziell das Ausbreitungsmuster beeinflussen. Es gilt herauszufinden, in welchen der Primärtumoren Mutationen der prädiktiven Biomarker auftreten, ob sich Stammzellfaktoren nachweisen lassen und ob sich Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen in der Expression der Stammzellmarker finden lassen. Auf

diese Arbeit bezogen: Zeigt ein lokal destruierender und dadurch eine Peritonealkarzinose hervorrufender Tumor ein anderes Expressionsmuster, als ein Tumor der hämatogen streut und Lebermetastasen ausbildet, oder der keine Metastasen ausbildet? Zusammenfassend war es das Ziel der Studie, mittels einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie die Hypothese zu prüfen, ob Muster in der Expression der untersuchten Biomarker existieren die Aussagen über das zu erwartende Wachstum der Tumoren zulassen. Ließen sich Unterschiede feststellen, könnte das ein Hinweis auf verschiedene Wege der Karzinogenese geben und mithilfe der genauen molekularpathologischen Charakterisierung der Tumore könnte in Zukunft vielleicht ein Testalgorithmus mit einem wissenschaftlich fundierten Markerspektrum entwickelt werden. Das könnte helfen, tumorspezifische zielgerichtete Therapien zu entwickeln und die individuelle Anpassung der Therapie könnte erlauben eine Metastasierung, lokal oder fern zu verhindern.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Auswahl des Patientenkollektivs und Zusammensetzung der Vergleichsgruppen

Die vorliegende Arbeit wurde als retrospektive klinisch-experimentelle Fall-Kontrollstudie geplant. Die Datenerhebung erfolgte an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München anhand eines Datensatzes zu allen Patienten die aufgrund eines kolorektalen Karzinoms im Zeitraum zwischen 2003 und 2012 an der Klinik behandelt wurden. Im Rahmen der Studie wurde jeweils eine Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose, eine Gruppe mit einer Lebermetastasierung und eine Gruppe, die sowohl eine Lebermetastasierung als auch eine Peritonealkarzinose aufwies herausgefiltert. Die Datensammlung erfolgte mit im System archivierten Patientenakten, teilweise mittels klinikinterner SAP-Suche, teilweise durch manuelle Durchsicht noch nicht digitalisierter Akten. Zur Analyse der einzelnen Fälle wurden sowohl klinikinterne Daten wie Anamnese, Operations-Berichte, Laborparameter und Arztbriefe herangezogen, als auch klinikexterne Befunde, wie Berichte aus der Pathologie, Hausarztberichte und bereits vorliegende Akten aus anderen Krankenhäusern. Unvollständige Akten wurden soweit möglich anhand telefonischer Interviews, z.B. die Nachsorge oder das Überleben betreffend vervollständigt. Auf diese Weise gelang es aus einer Gruppe von ca. 3000 in diesem Zeitraum behandelte Patienten drei sehr spezielle Gruppen zu selektieren: Eine Gruppe von 74 Patienten mit alleiniger Lebermetastasierung, eine Gruppe mit Lebermetastasen und Peritonealkarzinose von 31 Patienten und eine Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose von 32 Patienten. Ausgeschlossen wurden Patienten mit nachgewiesener HNPCC oder FAP oder anderen hereditären Formen des Kolonkarzinoms. Des Weiteren wurden die Gruppen durch die Tatsache verkleinert, dass nicht zu allen Fällen Präparate in der Pathologie vorhanden waren, im Rahmen der Färbungen keine Tumoranteile in den Präparaten zu finden oder die Materialmenge zu gering war. Es resultierten letztendlich Gruppengrößen von 37 Fällen mit alleiniger Lebermetastasierung, 13 Fälle mit Metastasen in der Leber

und im Peritoneum und 18 Fälle mit reiner Peritonealkarzinose. Bei den in die Berechnungen eingeschlossenen Fällen handelt es sich nur um die Primärtumoren, um keine verfälschten Ergebnisse wegen in die Berechnung mit einbezogener Metastasen zu erhalten.

Die Fälle wurden der Vollständigkeit halber so genau wie möglich bezüglich verschiedenster im Verlauf aufgetretener Behandlungen und Laborwerte erfasst. Hierbei wurden Parameter wie der genaue Tumordurchmesser, die Anzahl positiver Lymphknoten, neoadjuvante Therapien, Voroperationen, Tumormarker etc. erfasst. Es handelt sich um Daten zum Verlauf der Tumormarker CEA und CA 19-9, die aufgrund einiger Studienergebnisse als Verlaufsparemeter und Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms herangezogen werden können (54, 86-88). Bezüglich der neoadjuvanten Behandlungen und der verschiedenen chirurgischen Interventionen wurden die jeweiligen Eckdaten zu Beginn, Abbruch und Verlauf erhoben. Diese sind aber für diese Studie nicht mit in die Auswertungen eingeflossen und deshalb nicht in einer Tabelle dargestellt.

Als Kontrollgruppe fungiert ein Patientenkollektiv von 56 Fällen die zwischen 1994 und 2000 an der Ludwig-Maximilians-Universität behandelt wurden und retrospektiv aus dem Archiv des Pathologischen Instituts ausgewählt wurden. Es wurden nur Patienten eingeschlossen, die ein 5-jähriges metastasenfreies Überleben zeigten. Die Fall-Gruppen sind bezüglich Alters- und Geschlechterverteilung mit der Kontrollgruppe vergleichbar (s. Tabelle 4). Die Daten der Patienten wurden irreversibel anonymisiert und verschlüsselt. Die Studie wurde gemäß den Empfehlungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Als Arbeitssystem für die Sammlung, Archivierung und Verarbeitung der anonymisierten Daten diente das Datenverarbeitungsprogramm Microsoft Excel 2007®. Eine Übersicht über das Patientenkollektiv und einen Teil der erhobenen klinischen Daten ist Tabelle 4 zu entnehmen. Die Daten bezüglich Alters- und Geschlechterverteilung sowie zu den Tumorstadien des Kollektivs sind vergleichbar mit den Werten der Gesamtheit der Patienten mit kolorektalem Karzinom in Deutschland und den USA, sodass die Ergebnisse als repräsentativ gewertet werden können (89, 90).

**Tabelle 4:** Korrelation klinisch-pathologischer Patientendaten (entsprechend des TNM-Systems nach der UICC-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms 2010) mit den untersuchten Metastasierungsmustern

	Keine Metastasen	Peritonealkarzinose	Leber- metastasen	Beides	p
Alle Fälle	124 (100)	56 (45.2)	37 (29.8)	13 (10.5)	
Alter in Jahren					
<65	50 (40.3)	20 (35.7)	16 (43.2)	5 (38.5)	0.719
≥65	74 (59.7)	36 (62.3)	21 (56.8)	8 (61.5)	
Keine Daten verfügbar					
Geschlecht					
männlich	62 (50.0)	23 (41.1)	23 (62.2)	5 (38.5)	0.135
weiblich	62 (50.0)	33 (58.9)	14 (37.8)	8 (61.5)	
T Stadium (UICC)					
T1	1 (0.8)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	<b>0.00000098</b>
T2	7 (5.6)	5 (8.9)	2 (5.4)	0 (0)	
T3	88 (71.0)	42 (75.0)	34 (91.9)	7 (53.8)	
T4	26 (21.0)	8 (14.3)	0 (0)	5 (38.6)	
Keine Daten verfügbar	2 (1.6)		1 (2.7)	1 (7.7)	
Nodal Status					
N0	53 (42.7)	40 (71.4)	11 (29.7)	1 (7.7)	<b>0.00000005</b>
N+	69 (55.6)	16 (28.6)	25 (67.6)	11 (84.6)	
Keine Daten verfügbar	2 (1.6)		1 (2.7)	1 (7.7)	
Differenzierungsgrad (WHO)					
G1	1 (0.8)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	0.354
G2	48 (38.7)	16 (28.6)	19 (51.4)	7 (53.8)	
G3	70 (56.4)	37 (66.1)	17 (45.9)	5 (38.6)	
G4	2 (1.6)	2 (3.6)	0 (0)	0 (0)	
Keine Daten verfügbar	3 (2.4)	1 (5.6)	1 (2.7)	1 (7.7)	

## 4.2 Material

### 4.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Chemikalien

#### 4.2.1.1 Geräte

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Gerätschaften sind Tabelle 5 zu entnehmen.

**Tabelle 5:** Verwendete Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller</i>
<i>BenchMark<sup>®</sup> XT</i>	BenchMark <sup>®</sup> XT	Ventana Medical Systems, Roche Groupe, Schweiz
<i>DNA Arbeitsplatz, steril</i>	DNA/RNA UV Cleaner UVC/T-M	lab4you, Berlin, Deutschland
<i>Heizplatte</i>	Präzitherm	Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Deutschland
<i>Lichtmikroskop</i>	Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
<i>Mikrowelle</i>	HF24524	Siemens AG, München, Deutschland
<i>Pipetten, 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl</i>	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Pyrosequencer</i>	PyroMark <sup>™</sup> Q24 Pyrosequencer	Biotage AB, Uppsala, Schweden
<i>Pyrosequencer Kartusche</i>	PyroMark <sup>™</sup> Q24 Reagent Cartridge	Pyrosequencing AB, Biotage AB, Uppsala, Schweden
<i>Schüttelplatte</i>	Monoshake	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Tischzentrifuge</i>		neoLab, Heidelberg, Deutschland
<i>Thermo-Mixer</i>	Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Thermocycler PCR</i>	Mastercycler <sup>®</sup> vapo-protect	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Vacuum Prep Workstation</i>	PyroMark <sup>™</sup> Q24 Vacuum Prep Workstation	Pyrosequencing AB, Biotage AB, Uppsala, Schweden
<i>Vakuum Pumpe</i>	Dry Vacuum Pump	Welch Vacuum Technology, Gardner Denver Thomas Inc., Niles, USA
<i>Vortexer</i>	Vortex Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA

#### 4.2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Materialien und Reagenzien sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Collecting Tubes 2ml</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Handschuhe</i>	Arwen GmbH, Schloß Holte-Stukenbrock, Deutschland
<i>Objektträger</i>	Menzel-Gläser SuperFrost Ultra Plus Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
<i>PCR-Platte</i>	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
<i>PCR-Strip caps</i>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<i>Pipettenspitzen</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>PyroMark™ Q24 Plate</i>	Biotage AB, Uppsala, Schweden
<i>PyroMark Q24 Vacuum Prep Troughs</i>	Pyrosequencing AB, Biotage AB, Uppsala, Schweden
<i>QIAamp MiniElute® Columns</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Skalpelle</i>	neoLab, Heidelberg, Deutschland
<i>Tubes 0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 7:** Verwendete Reagenzien

<i>Reagenzien</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Annealing Buffer</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Aqua Bidest.</i>	H. Kerndl GmbH, Feldkirchen, D
<i>Binding Buffer</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Buffer ATL</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Buffer AL</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Buffer AW1</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Buffer AW2</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Buffer ATE</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Denaturation Solution</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>dNTPs</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Ethanol (reinst.)</i>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>H<sub>2</sub>O (steril)</i>	B.Braun, Melsungen, Deutschland
<i>HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Human Genomic DNA Male</i>	Promega Corp., Fitchburg, USA
<i>PCR Primer D361, D362, D364, D365, D376, D377</i>	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>PCR Puffer, 10xBuffer</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>PyroMark Gold Q24 Reagents</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Reagenzien Immunhistochemie: <math>\beta</math>-Catenin, CD44, CD133, p53 für BenchMark XT</i>	Ventana Medical Systems, Roche Groupe, Schweiz
<i>Reagenzien MLH1, MSH2 Vectastain ABC-Kit Elite Universal</i>	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
<i>Sequenzierungs Primer D363, D366, D378</i>	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>Streptavidin Sepharose High Performance (beads)</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
<i>Xylol (reinst.)</i>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Für alle Färbungen in dieser Studie wurden aus formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded tissue*) mittels eines Mikrotoms pro Präparat 15 jeweils 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die so entstandenen Präparate entparaffiniert um sie so für die einzelnen Färbungen vorzubereiten.

Die Entparaffinierung erfolgt durch das Auswaschen des Paraffins in einer Alkoholreihe. Dabei wurden die Objektträger für 3x10 Minuten in Becken mit 100% Xylol und für 3x10 Minuten in 100% Ethanol eingebracht und anschließend luftgetrocknet.

Um das Tumorareal zu identifizieren, wurde jeweils ein Schnitt jeder Reihe in der Übersichtsfärbung "Hämatoxylin-Eosin" (H)E gefärbt. Dieser wurde dann unter dem Lichtmikroskop von einem erfahrenen Pathologen (J.N.) auf Eignung untersucht und soweit vorhanden, das Tumorareal mit einem wasserfesten Stift markiert.

### 4.3.2 *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse

Die markierten HE-Schnitte dienten als Vorlage um auf den entparaffinierten Leerschnitten das zur DNA-Isolierung geeignete Areal zu markieren. Hierzu wurde die Markierung der HE-Schnitte durch Übereinanderlegen der Schnitte und Nachzeichnen der Linie auf die Leerschnitte übertragen.

Anschließend wurde jeweils soweit möglich ein ca. 0,5 cm<sup>2</sup> messender Teil des als Tumorgewebe identifizierten Areals mittels Skalpell unter dem Lichtmikroskop abgekratzt. Das Material jedes einzelnen Präparates wurde in separaten Tubes mit 180 µl ATL und 20 µl Proteinkinase K aus dem QIAamp® FFPE Tissue Kit durch kurzes Vortexen vermischt. Daraufhin erfolgte die Inkubation des Materials in einem Thermo-Mixer für 1 Stunde bei 56°C und dann für 10 Minuten bei 90°C.

Die Reinigung der DNA aus dem Zelllysat erfolgte automatisiert gemäß Herstellerprotokoll mithilfe eines QIAcube® Gerätes und den Reagenzien des QIAamp® FFPE Tissue Kit. Genaue Angaben zu den dafür verwendeten Lösungen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Die Amplifizierung der gereinigten DNA wurde mithilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) erreicht.

### *PCR, Prinzip und Durchführung*

#### *Prinzip:*

Mittels der PCR wird die gezielte Vermehrung einzelner DNA-Abschnitte ermöglicht. Das Amplifizieren ist notwendig um für die folgenden Mutationsanalysen genügend Material zur Verfügung zu haben. Eine PCR lässt sich in drei Schritte gliedern: Denaturierung, Annealing und Extension und kann nur in einem ganz bestimmten Puffermilieu und bestimmten Temperaturbedingungen ablaufen.

#### Schritt 1: Denaturierung.

Bei der sog. Denaturierung handelt es sich um das Auftrennen des doppelsträngigen DNA-Stranges in seine zwei Einzelstränge. Dazu wird die DNA für 30 Sekunden auf 95° Celsius erhitzt. Um dann die Rückbildung eines Doppelstrangs zu verhindern, wird das Produkt rasch wieder abgekühlt.

#### Schritt 2: Annealing

"Annealing" bezeichnet die Anlagerung des Primers an die als Einzelstrang vorliegende DNA. Ein Primer ist ein kurzes Stück einzelsträngige DNA die sich unter bestimmten Bedingungen an seinen, ebenfalls als Einzelstrang vorliegenden Gegenpart (komplementäre DNA) anlagern kann und dann als Ausgangspunkt der DNA-Synthese für die Polymerasen dient. Die dazu benötigte Temperatur ist von dem verwendeten Primer abhängig. Ist die Temperatur zu hoch, kann der Primer nicht an die komplementäre Sequenz binden, bei zu niedrigen Temperaturen bindet er aber auch an anderen Stellen an die DNA. Üblicherweise handelt es sich um Temperaturen von 60°-72° Celsius. Sobald ein Primer an die DNA gebunden ist, beginnen die Polymerasen mit der DNA Synthese.

#### Schritt 3: Extension

Die nun vorliegenden DNA-Primer-Verbindungen werden von den DNA-Polymerasen am 3'-Ende der Primer erkannt und folgen dann mit der Synthese

dem DNA-Strang. Zur Synthese sind Magnesiumionen und freie Nukleotide (Desoxyribonucleosidtriphosphate; dNTPs) notwendig. Die Synthese kann nur unter der optimalen Arbeitstemperatur der Polymerase erfolgen, die 72° Celsius beträgt. Inkorrekte DNA-Primer-Verbindungen lösen sich bei dieser Temperatur wieder, sodass fehlerhafte Produkte dadurch vermieden werden. Korrekte Verbindungen werden verlängert, sodass am Ende eines Zyklus aus anfänglich einem doppelsträngigen DNA-Strang zwei doppelsträngige DNA-Stränge werden.

Es werden sowohl bei der PCR von *KRAS* als auch bei *BRAF* 50 Zyklen durchlaufen. Verwendet wird dafür ein Thermocycler, der die exakten Zeit- und Temperaturabläufe generiert. Durch die erheblichen Temperaturschwankungen während des PCR-Zyklus ist die Verwendung einer hitzestabilen Polymerase notwendig.

#### *PCR KRAS und BRAF, Durchführung*

Zusammen mit zweifach destilliertem Wasser (Aqua Bidest oder Abd.) wurden die einzelnen Primerlösungen nach Herstellerangaben verdünnt. Die Mischungsverhältnisse der einzelnen Gebrauchslösungen sind Tabelle 8 zu entnehmen.

**Tabelle 8:** Mischungsverhältnis der einzelnen Gebrauchslösungen

<i>PCR Gebrauchslösungen</i>	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P4</i>
	20µl D361	20µl D364	20µl D376
	20µl D362	20µl D365	20µl D377
	60µl H <sub>2</sub> O, steril	60µl H <sub>2</sub> O, steril	60µl H <sub>2</sub> O, steril

Aus diesen Gebrauchslösungen wurde der jeweilige PCR-Mix hergestellt, s. Tabelle 9. Die Zusammensetzung ist bis auf die verwendeten Primer bei *KRAS* (Ogino, P1 und Poehlmann, P2) und *BRAF* (P4)) dieselbe. Die Basensequenzen der einzelnen Primer sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** PCR-Mix

<i>PCR Mix</i>	<i>Menge</i>
<i>H<sub>2</sub>O, steril</i>	32,60 µl
<i>10xbuffer</i>	4,00 µl incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub>
<i>dNTP</i>	0,40 µl
<i>Primer-Mix</i>	0,80 µl
<i>Taq-Pol</i>	0,20 µl

Die Herstellung des PCR-Mix erfolgte an einem UV-sterilisierten Arbeitsplatz. Zu den 38 µl Primer-Mix wurden anschließend 2 µl DNA pipettiert, sodass der fertige PCR-Ansatz 40 µl Volumen pro Probe betrug. Im Thermocycler erfolgte sowohl bei *KRAS* als auch bei *BRAF* einmalig ein anfänglicher Aktivierungsschritt von 15 Minuten bei 95°C. Darauf folgend 50 Zyklen, bestehend aus dem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden Länge bei 95°C, dem Annealing, 30 Sekunden bei 60°C und dem Elongationsschritt bei 72°C für 30 Sekunden. Nach Ablauf der 50 Zyklen folgt noch ein letzter 10 minütiger Elongationsschritt bei 72°C. Jede PCR enthielt als Positivkontrolle eine Wildtyp DNA und eine Negativkontrolle, die nur ein H<sub>2</sub>O-Mix, ohne DNA enthielt.

**Tabelle 10:** Verwendete Primer für die PCR

<i>Primer KRAS</i>	<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
<i>P1</i>	Ogino D361 KRAS-Pyro-F1	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
<i>P1</i>	Ogino D362 KRAS-Pyro-R1-BIO	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT
<i>P2</i>	Poehlmann D364 KRAS-Pyro-F2-BIO	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG
<i>P2</i>	Poehlmann D365 KRAS-Pyro-R2	TCGTCCACAAAATGATTCTGAA
<i>Primer BRAF</i>		
<i>P4</i>	D376 BRAF-Ex15-Pyro-F1	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
<i>P4</i>	D377 BRAF-Ex15-Pyro-R1-BIO	TCCAGACAACTGTTCAAAGTAT

Um in den PCR-Proben zu detektieren, ob eine Mutation im *KRAS* oder *BRAF*-Gen im Bereich der ausgewählten Exons vorhanden ist, bedient man sich der Methodik der Pyrosequenzierung.

### *Pyrosequenzierung; Prinzip, Ablauf und Auswertung*

#### *Prinzip:*

Das Prinzip der Pyrosequenzierung bezeichnet eine automatisierte Methode der Sichtbarmachung der Basenfolge eines DNA-Stranges mittels Chemolumineszenz (Lichtsignalen). Durch Pyrosequenzierung wird die Basensequenz in Echtzeit (während der Arbeit der Polymerase) detektiert.

Sie lässt sich in fünf Schritte aufteilen:

1. Schritt: Ausgangsmaterial für eine Pyrosequenzierung ist eine denaturierte, einzelsträngige DNA, die mittels eines "Adapter"-Primers, der biotinyliert sein muss an sog. *beads* (Agarosekügelchen) gekoppelt ist. Die Denaturierung erfolgt durch eine Denaturierungslösung. Die Lösung wird entfernt und zurück bleibt der mittels dem biotinylierten Primer an die *beads* gebundene Einzelstrang. Die Basenfolge wird mithilfe eines Sequenzierprimers detektiert. In der für die Lichtreaktion nötigen Mischung befinden sich außerdem die Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie die zugehörigen Substrate, Adenosin 5' Phosphosulfat (APS) und Luciferin.
2. Schritt: Der Sequenzierprimer bildet den Startpunkt für die DNA-Polymerase, die nach Zugabe des ersten der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) mit der Synthese des komplementären DNA-Stranges beginnt. Mit jeder erfolgreich eingebauten, zum Matrizenstrang komplementären Base wird Pyrophosphat (PPi) frei, proportional zu der Menge der eingebauten Basen.
3. Schritt: Durch die ATP-Sulfurylase wird aus den Substraten PPi und APS Adenosintriphosphat (ATP). Das Enzym Luziferase nutzt das ATP dazu, Luziferin in Oxyluziferin umzuwandeln, wobei ein Lichtsignal entsteht. Die Menge des bei dieser Reaktion freiwerdenden Lichts entspricht der Menge der verbrauchten ATPs und wird mittels einem sog. Charge Coupled Device (CCD)-Chip quantifiziert und kann graphisch dargestellt werden. Die so verarbeiteten Lichtsignale erscheinen als "Peaks" im Pyrogramm.
4. Schritt: Das Enzym Apyrase baut Nukleotide, die nicht eingebaut wurden und die nicht verwendeten ATPs ab. Sobald der Abbau vollständig ist, wird das nächste dNTP hinzugegeben und der Zyklus beginnt wieder bei Schritt 2.

5.Schritt: Die dNTPs werden einzeln hinzugegeben, dabei ist zu erwähnen, dass statt Desoxyadenosintriphosphat (dATP) Desoxyadenosin-alpha-thio-triphosphat (dATP-S) verwendet werden muss. Ersteres ist zwar ein Substrat der DNA-Polymerase, nicht aber der Luziferase, da es von ihr nicht erkannt wird. Zusammenfassend wird also im Laufe einer Pyrosequenzierungsreaktion der Komplementär-DNA-Strang gebildet dessen genaue Basensequenz dann anhand der Höhe des Peaks im Pyrogramm ermittelt werden kann (91).

#### *Vorbereitung für die Pyrosequenzierung:*

Die Vorbereitung der Pyrosequenzierung erfolgte nach Angaben der Hersteller mittels einer PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation. Die verwendeten Reagenzien sind den einzelnen Tabellen zu entnehmen.

#### 1.Schritt: Vorbereitung der PCR-Platte

Um den *beads*-Mix herzustellen wurden diese durch vorsichtiges Schütteln des Fläschchens gelöst und alle Lösungen auf Raumtemperatur gebracht. Die genaue Zusammensetzung ist Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des *beads*-Mix

<i>beads-Mix</i>	<i>Menge</i>
Beads	2 µl
<i>binding buffer</i>	40 µl
<i>H<sub>2</sub>O, steril</i>	23 µl

Es wurden jeweils 65 µl des *beads*-Mix in eine Vertiefung der PCR-Platte pipettiert und dazu je 15 µl des PCR Produkts einer DNA Probe. Anschließend erfolgte die Mischung der Komponenten mittels einer Schüttelplatte bei 1400rpm über 5-10 Minuten.

#### 2.Schritt: Vorbereitung der Pyromark Q24 Platte

Zu 2,5 µl der Gebrauchslösung des jeweiligen Primers, die aus dem vorher nach Herstellerangaben mir Abd. verdünnten, gevortexten und zentrifugierten Sequenzierungsprimer besteht, wurden 22,5 µl Annealing Buffer hinzugegeben und jeweils 25 µl in einen Napf der Pyromark Q24 Platte gegeben. Die für die Herstellung der jeweiligen Gebrauchslösung verwendeten Sequenzierungsprimer sind Tabelle 12 zu entnehmen.

**Tabelle 12:** Sequenzierungsprimer der Pyrosequenzierung

Sequenzierungsprimer KRAS	Name		Sequenz
P1	Ogino	D363 KRAS-Pyro-S1	TGTGGTAGTTGGAGCT
P2	Poehlmann	D366 KRAS-Pyro-S2	GCACTCTTGCCTACG
Sequenzierungsprimer BRAF			
P4		D378 BRAF-Ex15-Pyro-S1	GTAAAAATAGGTGATTTTGG

Die Denaturierung und anschließende Extraktion der *beads* und der daran gebundenen Einzelstränge der DNA erfolgte mithilfe der PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation und des Vacuum Tools, s. Abb. 6. Die PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation enthält 5 Becken, in denen sich die jeweils für die verschiedenen Schritte notwendigen Flüssigkeiten befinden:

Becken 1: 70% Ethanol

Becken 2: Denaturation Solution

Becken 3: Washing Buffer

Becken 4,5,6 (P): Abd.

**Abbildung 6:** Aufbau PyroMark™ Q24 Vacuum Prep Workstation und Vacuum Prep Tool nach (92)



Mit dem Vacuum Prep Tool, s. Abb. 6 wird der *beads*-Mix aus den Nöpfchen der PCR-Platte gesaugt und unter anhaltendem Vakuum-Sog werden die Ansaugstiftchen des Vacuum Prep Tools für jeweils 5-10 Sekunden in die Flüssigkeiten in Becken 1, dann 2 und danach 3 gehalten. Dabei erfolgt die Trennung der DNA Stränge durch die Denaturation Solution und die Abspülung der "überschüssigen", nicht an die *beads* gebundenen Stränge mittels des Washing Buffers. Anschließend wird das Vacuum Prep Tool für 5 Sekunden in der Vertikale an der Luft getrocknet und dann in Position genau über der Pyromark Q24 Platte gebracht, sodass sich jeweils ein mit *beads* beladenes Ansaugstiftchen über einer Vertiefung mit der Sequenzierungsprimer-Lösung befindet. Jetzt wird das Vakuum ausgeschaltet und das Vacuum Tool in die Vertiefungen der Pyromark Q24 Platte gesenkt und leicht bewegt. Dadurch lösen sich die *beads* von den Ansaugstiftchen und fallen in die Primerlösung. Das Vacuum Prep Tool wird anschließend durch Spülung mittels Abd. gereinigt und getrocknet. Die Pyromark Q24 Platte wird nun für 2 Minuten auf einer Heizplatte auf 80°C erhitzt und dann für 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wird sie in den Pyrosequencer eingesetzt, dessen Cartridge gemäß Herstellerangaben mit Substrat, Enzym und Nukleotiden befüllt wurde und der Pyrosequencer gestartet. Die einzelnen Läufe des Pyrosequenzers wurden jeweils im Vorfeld auf dem Computer mittels der Pyromark Q24 Software erstellt und auf einem USB-Stick gespeichert.

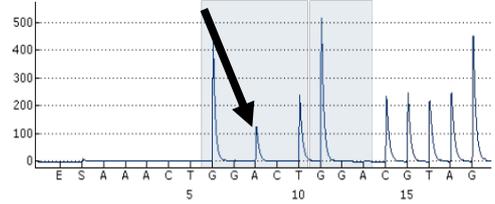
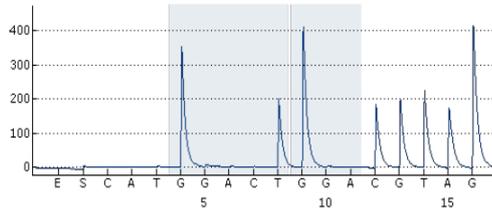
#### *Auswertung:*

Die Daten jedes Pyrosequenzierungslaufes werden auf einem USB Stick gespeichert und anschließend mit dem AQ Pyrogram Report der Pyromark Q24 Software analysiert. Mithilfe des Programms lassen sich sog. Pyrogramme erstellen, die mittels Höhenunterschieden der einzelnen Peaks eine Unterscheidung in Wildtyp oder Mutation zulassen, s. Abb. 7. Es gab bei jedem Lauf eine Positivkontrolle mit einer Wildtyp-DNA (Promega Human Genomic DNA Male) und eine Negativkontrolle mit einem H<sub>2</sub>O-Mix um Verunreinigungen zu detektieren.

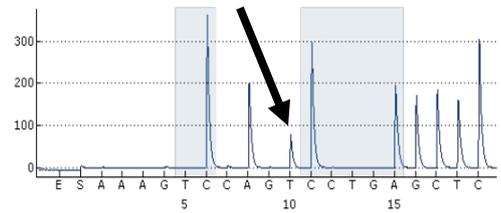
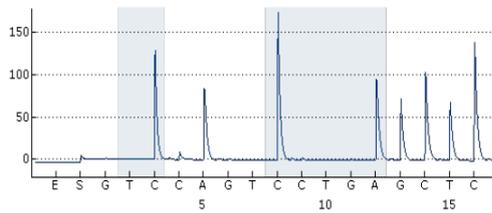
**Wildtyp**

**Mutation**

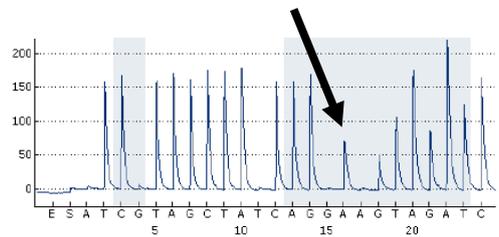
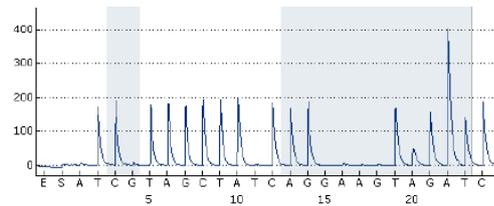
*KRAS* Exon 2 Ogino



*KRAS* Exon 2 Pöhlmann



*BRAF* Exon 15



**Abbildung 7:** Pyrogramme der *KRAS*- und *BRAF*-Mutationsanalysen (Pfeile weisen auf die mutierte Base hin)

### 4.3.3 Immunhistochemie

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden standardmäßig 5µm FFPE Gewebeproben verwendet. Eine genauere Auflistung aller verwendeten Antikörper ist Tabelle 13 zu entnehmen.

**Tabelle 13:** Übersicht über die verwendeten Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Gewinnung</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Detektionssystem</i>
<i>β-Catenin</i>	Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ	monoklonaler Mausantikörper	clone 14	Gebrauchsfertig	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
<i>CD44</i>	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ	monoklonaler Mausantikörper	G44-26	1:500	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
<i>CD133</i>	Miltenyi Biotec, Auburn, CA	monoklonaler Mausantikörper	AC133	1:50	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
<i>p53</i>	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA	monoklonaler Mausantikörper	DO-7	1:1000	Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit
<i>MLH1</i>	Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK	monoklonaler Mausantikörper	ES05	1:80	Vectastain ABC-Kit Elite Universal
<i>MSH2</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	monoklonaler Mausantikörper	FE-11	1:200	Vectastain ABC-Kit Elite Universal

Unter der Verwendung der in Tabelle 13 aufgelisteten Antikörper und der automatischen Färbung des BenchMark XT IHC/ISH Färbemoduls von Ventana erfolgte die Detektion der Expression von *p53*, *β-Catenin*, *CD133* und *CD44*.

#### *hMLH1 und hMSH2*

Die Färbung der Marker *hMLH1* und *hMSH2* erfolgte manuell. Auf die mit Hilfe einer Mikrowelle primäre hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung mit dem Target Unmasking Fluid folgt zur Blockierung der endogenen Peroxidase die Zugabe von 7,5% Wasserstoffperoxid. Nach einem Waschschrift und der Zugabe des blocking serum (ABC-Kit) kann der spezifische Antikörper (primärer Antikörper *hMLH1* oder *hMSH2*) zugegeben werden. Unter Verwendung eines biotinylierten sekundären Antikörpers, zur Bindung an den primären Antikörper, aus dem Vectastain

ABC-Kit Elite Universal und Chromogen (Enzymkomplex mit chromogenem Substrat) wird das Antigen durch enzymatische Aktivierung des Chromogens sichtbar gemacht. Dazwischen liegen jeweils einzelne Waschschrirte mit TRIS-Puffer. Reagenzien und Mengenangaben zur Herstellung des hier verwendeten 0,05 M TRIS-Puffers sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Gewebeproben wurden anschließend mit Hematoxylin (Gill's Formula) gegengefärbt und in Glyceringelatine eingedeckt. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 13 zu entnehmen, alle weiteren verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 14:** Reagenzien TRIS-Puffer

<i>Reagenzien</i>	<i>Menge</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Natriumchlorid</i>	43,9 g	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>TRIZMA® hydrochloride</i>	34,25 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>TRIZMA® base</i>	4,5 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>	5 l	H. Kerndl GmbH, Feldkirchen, Deutschland

#### 4.3.4 Scoring der Immunhistochemie

Alle Präparate wurden von zwei Untersuchern (J.N. und L.L.) unabhängig und verblindet bewertet. Die Fälle waren bezüglich Gruppenzugehörigkeit und Patientendaten verschlüsselt. Die Ergebnisse der Untersucher wurden am Ende verglichen. Bei ca. 15 % der Fälle traten Unterschiede in der Bewertung zwischen den Untersuchern auf (engl.:inter-observer variability). In diesem Fall wurde das Präparat nochmals gemeinsam untersucht und ein Konsens-Score gebildet, der dann in die Berechnungen einging. Bildbeispiele finden sich in Abb. 8 und 9.

##### $\beta$ -Catenin:

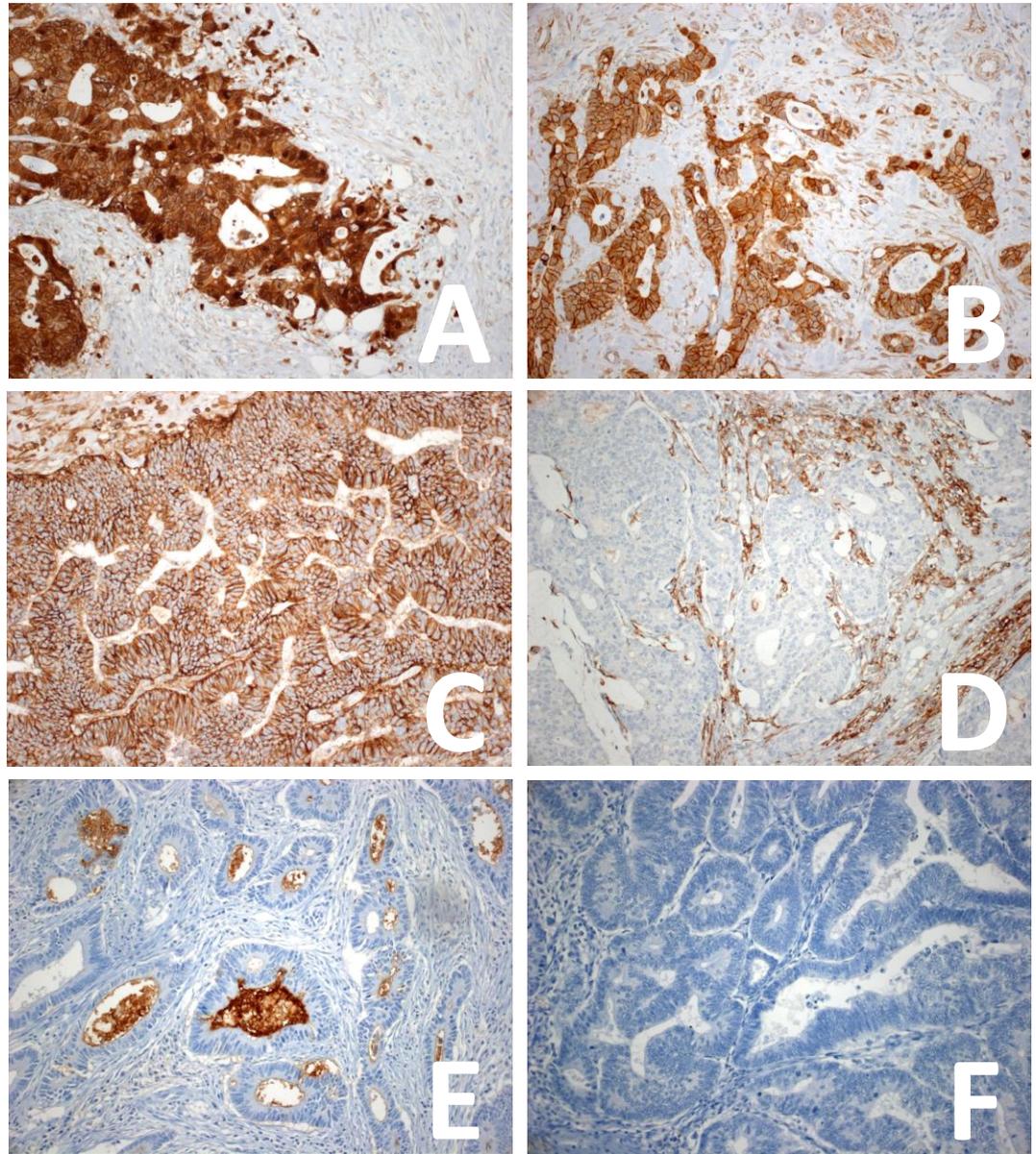
Zur Beurteilung der nukleären Expression von  $\beta$ -Catenin, wurde die Anzahl der  $\beta$ -Catenin positiv gefärbten Tumorzellen im ganzen Tumor in Gruppen eingeteilt: 0: negativ, 1: < 30% der Zellen zeigen eine nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin, 2: 30-60% sind positiv, 3: > 60% sind positiv. Anhand des prozentualen Anteils an Zellen mit nukleärer  $\beta$ -Catenin Expression wurden die Fälle in "niedrige Expression" (Gruppen 0 und 1) und "hohe Expression" (Gruppen 2 und 3) eingeteilt. Die Intensität der Färbung wurde dabei nicht in das Scoring mit einbezogen (45).

##### CD133:

Als positiv definiert wurde die Färbung der apikalen Zellmembran der Drüsenformationen oder des abgestoßenen Zell-Debris in den Tumordrüsen. Der semi-quantitative Score zur Einteilung der Positivität der Tumoren ist wie folgt: 1: niedrige Expression (< 50% positive Tumorzellen) und 2: hohe Expression ( $\geq$  50% positive Zellen). Die Präparate, die keine CD133-Expression aufweisen erhielten die Ziffer 0 (44).

##### CD44:

Der Score zur Auswertung der Expression von CD44 entspricht weitestgehend dem der CD133-Expression: < 50% der Zellen positiv bedeutet eine niedrige Expression,  $\geq$  50% der Zellen eine hohe Expression. Es wurde jedoch nur der prozentuale Anteil der CD44 positiven Tumorzellen in die Bewertung mit einbezogen (93).



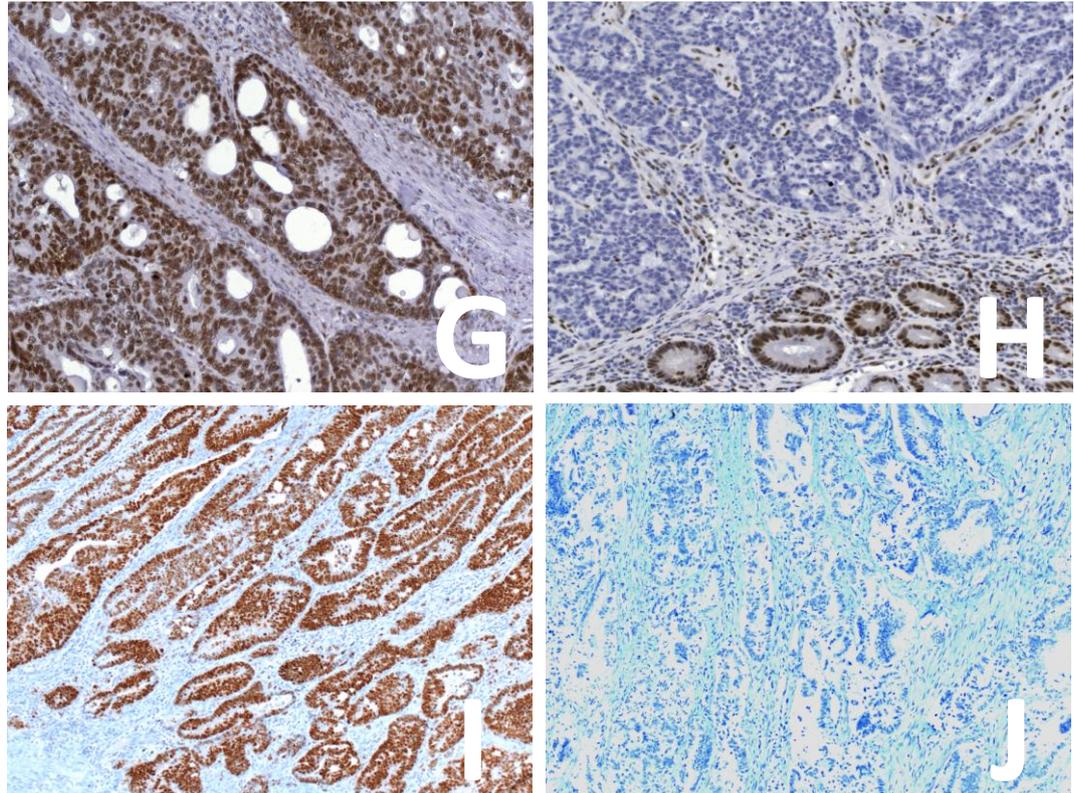
**Abbildung 8:** Immunhistochemische Färbung der Marker  $\beta$ -Catenin (hohe Expression: A, niedrige Expression B), CD44 (hohe Expression: C, niedrige Expression D), CD133 (hohe Expression: E, niedrige Expression F), 200-fache Vergrößerung.

#### hMLH1 und hMSH2:

Der Verlust der Expression von funktionsfähigem hMLH1 und hMSH2 stellt sich als Verlust der nukleären Färbung der Tumorzellen bei gleichzeitig erhaltener Färbung der Stromazellkerne dar. Diese sind die "negativ" klassifizierten Fälle und zeigen das Vorliegen eines MMR- Defekts an. Die als hMLH1 und hMSH2 positiv definierten Fälle, also Fälle ohne MMR-Defekt, zeigen eine nukleäre Expression sowohl in den malignen als auch den anderen Zellen des Präparats.

#### *p53*:

Die Detektion einer Deregulierung im *p53* Gen erfolgte durch Quantifizierung der Expression des *p53* Proteins, wobei eine starke Expression des Proteins in einer Mehrzahl der Tumorzellen auf eine Mutation schließen lässt (94, 95). Es wurde ein semiquantitativer Score gebildet, zusammengesetzt aus der Intensität der Färbung der Zellkerne und dem prozentualen Anteil an der gesamten Zellkernanzahl. Die Intensität wurde eingeteilt in: 0: keine Expression, 1: schwach, 2: mäßig und 3: stark positiv. Der Score bildet sich wie folgt: Die Expression wurde als niedrig, (=1) bewertet wenn <70% der Kerne positiv waren und eine Intensität von 0 oder 1 aufwiesen und als hoch, (=2), wenn  $\geq 70\%$  der Kerne positiv waren und eine Intensität mind. 2 aufwiesen.



**Abbildung 9:** Immunhistochemische Färbung der Marker hMLH1 (hohe Expression: G, niedrige Expression H) und p53 (hohe Expression: I, niedrige Expression J), 200-fache Vergrößerung.

#### 4.4 Statistische Methodik und Software

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Excel® 2007 von Microsoft verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm SPSS (SPSS v. 19.0, IBM Inc., Armonk, NY). Zur Prüfung der Hypothese wurde der  $\chi^2$ -Test nach Pearson verwendet. Mithilfe dieses Test lässt sich analysieren ob zwei Faktoren stochastisch unabhängig sind, bezogen auf diese Arbeit, ob Expressionsmuster existieren, die mit der Lokalisation der Fernmetastasen korrelieren. Als statistisch signifikant wurden asymptotische zweiseitige p-Werte kleiner als 0,05 gewertet, das bedeutet die sog. Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt 5%.

Alle in der Arbeit verwendeten Arbeitsprogramme sind Tabelle 15 zu entnehmen.

**Tabelle 15:** Verwendete Arbeitsprogramme

<i>Arbeitsprogramm</i>	<i>Hersteller</i>
<i>IBM SPSS Statistics</i>	IBM Corp., Armonk USA
<i>Microsoft Excel 2007</i>	Microsoft Corp., Redmond, USA
<i>PyroMark Q24 Software</i>	Biotage AB, Uppsala, Schweden

## 5 Ergebnisse

Um Rückschlüsse auf etwaige Unterschiede im Verteilungsmuster der einzelnen Biomarker zwischen den unterschiedlichen Metastasierungsmöglichkeiten zu ziehen wurden die Ergebnisse der jeweiligen Färbungen mit den einzelnen Möglichkeiten der Metastasierung mittels univariater statistischer Test korreliert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16, 17 und 18 dargestellt, sowie in Abbildung 10.

### ***KRAS***

Die Mutationsanalyse von *KRAS* ergab im Vergleich der Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt zeigte sich bei insgesamt 27,5% (43 von 124 Fällen) eine Mutation auf Exon 2. Betrachtet man das Auftreten innerhalb der Untersuchungsgruppen tritt eine Mutation bei alleiniger Peritonealkarzinose in 11,1% (2 von 18) auf. Im Vergleich zu den hepatisch streuenden Tumoren, bei denen sich bei 27,0% (10 von 37 Fällen) eine Mutation detektieren ließ. Bezogen auf die klinischen Daten zeigt sich, dass 45,2% aller Patienten (56 von 124) einen positiven Nodalstatus und *KRAS*-Wildtyp aufweisen. Aber nur in 10,5% (13 von 124) der untersuchten kolorektalen Karzinome mit positivem Nodalstatus fand sich eine Mutation im Exon 2 des *KRAS*-Gens ( $p=0,011$ ).

### ***BRAF***

In der Gruppe der Fälle mit Lebermetastasierung und kombinierter Lebermetastasierung und Peritonealkarzinose ließ sich bei 6,0% (3 von 50) eine Mutation im *BRAF*-Gen Exon 15 nachweisen, in der Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose waren es 22,2% (4 von 18) ( $p = 0,027$ ). Dagegen wiesen 25,0% der Kontrollgruppe (14 von 56) ein mutiertes *BRAF* auf. Bezogen auf die klinischen Parameter zeigte sich, dass eine Mutation im *BRAF*-Gen häufig mit einem schlechteren Differenzierungsgrad assoziiert ist: *BRAF* Wildtyp ließ sich bei insgesamt 83,1% (103 Fälle) aller Patienten nachweisen, davon handelte es sich bei 41,7% (43 von 103 Wildtyp-Fällen) um einen G2 Tumor und bei 54,3% (58 von 103 Wildtyp-Fällen) um einen G3 Tumor. Eine Mutation zeigte sich bei insgesamt 16,9% (21 von 124

Fällen), davon handelte es sich bei 23,8% um G2 Tumoren ( 5 von 21), bei 57,1% (12 von 21) um G3 Tumore und bei 9,5% (2 von 21) um G4 Tumore ( $p=0,007$ ).

### **p53**

Im Bezug auf klinische Parameter ließ sich bei dem Marker p53 kein Unterschied in der Ausprägung der Expression feststellen. Innerhalb der Vergleichsgruppen zeigte sich jedoch ein Unterschied ( $p=0,042$ ): 48,2 % aller 56 Fälle in der Kontrollgruppe wiesen eine hohe Expression von p53 auf, bei der Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose waren es 22,2% (4 von 18) und bei der Gruppe mit Fernmetastasen 60,0% (30 von 50 Fällen). Dabei fand sich bei 56,8% (21 von 37 Fällen) in der Gruppe mit alleiniger Lebermetastasierung eine hohe p53 Expression und bei 69,2% (9 von 13) innerhalb der Gruppe die eine kombinierte Leber- und Peritonealausbreitung aufwiesen.

### **CD133**

Insgesamt zeigte sich bei 77,4% (96 von 124) eine niedrige CD133 Expression und bei 22,6% (28 von 124) eine hohe Expression. Bezogen auf die Formen der Metastasierung ließ sich folgendes feststellen: Patienten der Vergleichsgruppe mit einem metastasenfremigen Überleben von 5 Jahren zeigten in 12,5% der Fälle (7 von 56) eine hohe CD133 Expression. Die Gruppe der Patienten mit alleiniger Peritonealkarzinose zeigten 11,1% (2 von 18 Fällen) eine hohe CD133 Expression. Im Falle der Gruppe mit einer Lebermetastasierung fand sich bei 45,9% (17 von 37) der Patienten eine hohe CD133 Expression und bei der Gruppe die sowohl eine Peritonealkarzinose als auch eine Lebermetastasierung entwickelten waren es 15,4% (2 von 13). Daraus lässt sich ableiten, dass eine Fernmetastasierung mit erhöhter CD133 Expression einhergeht ( $p=0,001$ ). Es zeigt sich, dass eine hohe CD133 Expression insgesamt mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von Metastasen verbunden ist: 75% (21 von 28) der Fälle mit hoher CD133 Expression gehören zur M1 Gruppe ( $p=0,018$ ).

**CD44**

Eine hohe CD44 Expression ließ sich bei 47,6% (59 von 124) der Fälle nachweisen. Dabei wiesen 23,2% der Kontrollgruppe (13 von 56), 55,6% der Peritonealkarzinose-Fälle (10 von 18) und 70,3% aller Fälle mit reiner Lebermetastasierung (26 von 37) eine hohe CD44 Expression auf. Bei der Gruppe mit kombinierten Lebermetastasen und Peritonealkarzinose fand sich eine hohe Expression bei 77% (10 von 13 Fällen). Das zeigt, dass eine hohe CD44 Expression vermehrt mit der Ausbildung von Fernmetastasen verbunden ist ( $p=0,00001$ ). Teilt man die 124 Fälle nur in M1 (68 von 124 Fällen) und M0 (56 von 124 Fällen) und korreliert diese mit der CD44 Expression so ergibt sich ein P-Wert von  $p=0,0000008$ : 46 Fälle in der M1 Gruppe weisen eine hohe CD44 Expression auf, das entspricht 37,1 % aller Fälle und 67,6% der 68 M1 Fälle. Dagegen zeigen nur 10,5% (13 von 124) Fälle der M0 Gruppe eine hohe Expression, dies entspricht 23,2% (13 von 56). Die Gruppe M1 beinhaltet alle Fälle mit Leber-, Peritoneal-, und gleichzeitiger Leber- und Peritonealmetastasierung.

Betrachtet man die Korrelation von CD44 mit einem positiven Nodalstatus, den insgesamt 55,6% der Fälle aufweisen (69 von 124) so lässt sich feststellen, dass mit einem P-Wert von  $p=0,035$  eine hohe CD44 Expression mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen verbunden ist: Während in der Gruppe mit niedriger CD44 Expression 47,6 % einen positiven Nodalstatus aufwiesen (31 von 65 Fällen), weisen 64,4% (38 von 59) in der Gruppe mit hoher CD44 Expression einen positiven Lymphknotenstatus auf.

***β-Catenin***

Eine positive Korrelation ließ sich mit einer Signifikanz von  $p=0,00000002$  zwischen einer hohen  $\beta$ -Catenin Expression und den Vergleichsgruppen M1 und M0 nachweisen: Es zeigte sich bei 47,6% (59 von 124 Fällen) eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression, dabei befinden sich bezogen auf die Gruppen 70,5% (48 von 68) in der M1 Gruppe und 19,6% (11 von 56) in der M0 Gruppe. Eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin ist also insgesamt häufiger bei Primärtumoren nachzuweisen, die zu Metastasenbildung neigen. Schlüsselst man die M1 Gruppe in ihre Untergruppen auf so zeigt sich bei 66,7% (12 von 18) der Peritonealkarzinosefälle, bei 73% (27 von 37) der Lebermetastasenfälle und bei 69,2% (9 von 13) der Fälle einer

gleichzeitigen Leber-und Peritonealmetastasierung eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin ( $p=0,0000005$ ). Bezogen auf den Differenzierungsgrad ließ sich nachweisen, dass schlechtere Differenzierungsgrade wie G3 und G4 vermehrt eine niedrige  $\beta$ -Catenin Expression aufweisen: So zeigte sich diese bei 60,8% (45 von 74) der G3 und G4 Fälle. Die Tumorgade G1 und G2 wiesen dagegen in 61,2% (30 von 49) der G1 und G2 Fälle eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression auf.

### ***Kombination der Marker CD133, CD44 und $\beta$ -Catenin***

Die Markerkombination hohe CD133 und hohe  $\beta$ -Catenin Expression ließ sich bei 37,8% (14 von 37) der Gruppe mit reiner Lebermetastasierung gegenüber 5,6% (1 von 18) der Fälle mit Entwicklung einer Peritonealkarzinose nachweisen ( $p=0,00002$ ).

Die Markerkombination hohe CD44 und hohe  $\beta$ -Catenin Expression zeigte sich bei 48,6% der Fälle mit Lebermetastasierung (18 von 37) und bei 27,8% (5 von 18) der Fälle mit einer Peritonealkarzinose ( $p=0,0000003$ ).

Kombiniert man alle drei Marker miteinander so erreicht man eine noch höhere Signifikanz ( $p=0,0000000007$ ): Eine erhöhte nukleäre  $\beta$ -Catenin Expression, hohe CD44 Expression und/oder hohe CD133 Expression findet sich bei 27,8% (5 von 18) der Fälle der Peritonealkarzinosegruppe und bei 67,6% (25 von 37) der Fälle der Lebermetastasengruppe.

### ***MMR-Defekt***

Ein MMR-Defekt ließ sich bei 3,2% aller Patienten nachweisen (4 von 124). Eine signifikante Korrelation mit klinischen Parametern ließ sich nicht finden, jedoch zeigen sich einige Tendenzen: Unter den 4 Fällen mit MMR-Defekt, handelt es sich bei 75% (3 von 4) um weibliche Patienten, außerdem wiesen 100% einen positiven Nodalstatus auf und befanden sich in der M1 Gruppe. Dabei befinden sich 75% in der Gruppe mit der Entwicklung einer Peritonealkarzinose (3 von 4) und 25% (1 von 4) in der Gruppe mit einer Lebermetastasierung ( $p=0,002$ ).

**Tabelle 16:** Klinisch-Pathologische Patientendaten in Korrelation mit den getesteten Biomarkern (Prozentwerte sind in Klammern angegeben; Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant)

Merkmal	gesamt	BRAF Exon 15		KRAS Exon 2		MMR-Defekt		$\beta$ -Catenin		CD44		CD133		p53	
		Wt	Mutation	Wt	Mutation	ja	nein	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch	niedrig	hoch
Anzahl der Fälle	124 (100.0)	103 (83.0)	21 (16.9)	90 (72.6)	34 (27.4)	4 (3.2)	120 (96.8)	65 (52.4)	59 (47.6)	65 (52.4)	59 (47.6)	96 (77.4)	28 (22.6)	63 (50.8)	61 (49.2)
Alter in Jahren															
<65	50 (40.3)	44 (35.5)	6 (4.8)	37 (29.8)	13 (10.5)	2 (1.6)	48 (38.7)	21 (16.9)	29 (23.4)	17 (13.7)	33 (26.6)	39 (31.4)	11 (8.9)	25 (20.2)	25 (20.2)
≥65	74 (59.7)	59 (47.6)	15 (12.0)	53 (42.7)	21 (16.9)	2 (1.6)	72 (58.0)	44 (35.5)	30 (24.2)	48 (38.7)	26 (21.0)	57 (46.0)	17 (13.7)	38 (30.6)	36 (29.0)
Keine Daten verfügbar															
Geschlecht															
männlich	62 (50.0)	55 (44.4)	7 (5.6)	46 (37.0)	16 (12.9)	1 (0.8)	61 (49.2)	30 (25.8)	30 (24.2)	28 (22.6)	34 (27.4)	44 (35.5)	18 (14.5)	34 (27.4)	28 (22.6)
w weiblich	62 (50.0)	48 (38.7)	14 (11.3)	44 (35.5)	18 (14.5)	3 (2.4)	59 (47.6)	33 (26.6)	29 (23.4)	37 (29.8)	25 (20.2)	52 (42.0)	10 (8.0)	29 (23.4)	33 (26.6)
T Stadium (UICC)															
T1	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)
T2	7 (5.6)	5 (4.0)	2 (1.6)	5 (4.0)	2 (1.6)	0 (0)	7 (5.6)	4 (3.2)	3 (2.4)	5 (4.0)	2 (1.6)	7 (5.6)	0 (0)	4 (3.2)	3 (2.4)
T3	88 (71.0)	75 (60.5)	13 (10.5)	64 (51.6)	24 (19.4)	1 (0.8)	87 (70.2)	47 (38.0)	41 (33.0)	45 (36.3)	43 (34.7)	65 (52.4)	23 (18.5)	43 (34.7)	45 (36.3)
T4	26 (21.0)	21 (17.0)	5 (4.0)	19 (15.3)	7 (5.6)	3 (2.4)	23 (18.5)	12 (9.7)	14 (11.3)	14 (11.3)	12 (9.7)	22 (17.7)	4 (3.2)	16 (12.9)	10 (8.0)
Keine Daten verfügbar	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (1.6)	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)
Nodal Status															
N0	53 (42.7)	43 (34.7)	10 (8.0)	32 (25.8)	21 (17.0)	0 (0)	53 (42.7)	37 (29.8)	16 (12.9)	34 (27.4)	19 (15.3)	43 (34.7)	10 (8.0)	24 (19.4)	29 (23.4)
N+	69 (55.6)	59 (47.6)	10 (8.0)	56 (45.2)	13 (10.5)	4 (3.2)	65 (52.4)	27 (21.8)	42 (33.9)	31 (25.0)	38 (30.6)	52 (42.0)	17 (13.7)	39 (31.5)	30 (24.2)
Keine Daten verfügbar	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (1.6)	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	2 (1.6)
Metastasen															
M0	56 (45.2)	42 (33.9)	14 (11.3)	37 (29.8)	19 (15.3)	0 (0)	56 (45.2)	45 (36.3)	11 (8.9)	43 (34.7)	13 (10.5)	49 (39.5)	7 (5.6)	29 (23.4)	27 (21.8)
M1	68 (54.8)	61 (49.2)	7 (5.6)	53 (42.7)	15 (12.1)	4 (3.2)	64 (51.6)	20 (16.1)	48 (38.7)	22 (17.7)	46 (37.1)	47 (37.9)	21 (16.9)	34 (27.4)	34 (27.4)
Keine Daten verfügbar															
Differenzierungsgrad (WHO)															
G1	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)
G2	48 (38.7)	43 (34.7)	5 (4.0)	36 (29.0)	12 (9.7)	2 (1.6)	46 (37.1)	19 (15.3)	29 (23.4)	26 (21.0)	22 (17.7)	34 (27.4)	14 (11.3)	23 (18.5)	25 (20.2)
G3	70 (56.4)	58 (46.8)	12 (9.7)	48 (38.7)	22 (17.7)	2 (1.6)	68 (54.8)	43 (34.7)	27 (21.8)	36 (29.0)	34 (27.4)	57 (45.9)	13 (10.5)	39 (31.5)	31 (25.0)
G4	2 (1.6)	0 (0)	2 (1.6)	2 (1.6)	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)	2 (1.6)	2 (1.6)	2 (1.6)	0 (0)	2 (1.6)	0 (0)	0 (0)	2 (1.6)
Keine Daten verfügbar	3 (2.4)	1 (0.8)	2 (1.6)	3 (2.4)	0 (0)	0 (0)	3 (2.4)	1 (0.8)	2 (1.6)	0 (0)	3 (2.4)	2 (1.6)	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (1.6)

**Tabelle 17:** Korrelation der untersuchten Biomarker mit den verschiedenen Metastasierungsmustern (Prozentwerte sind in Klammern angegeben; Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant)

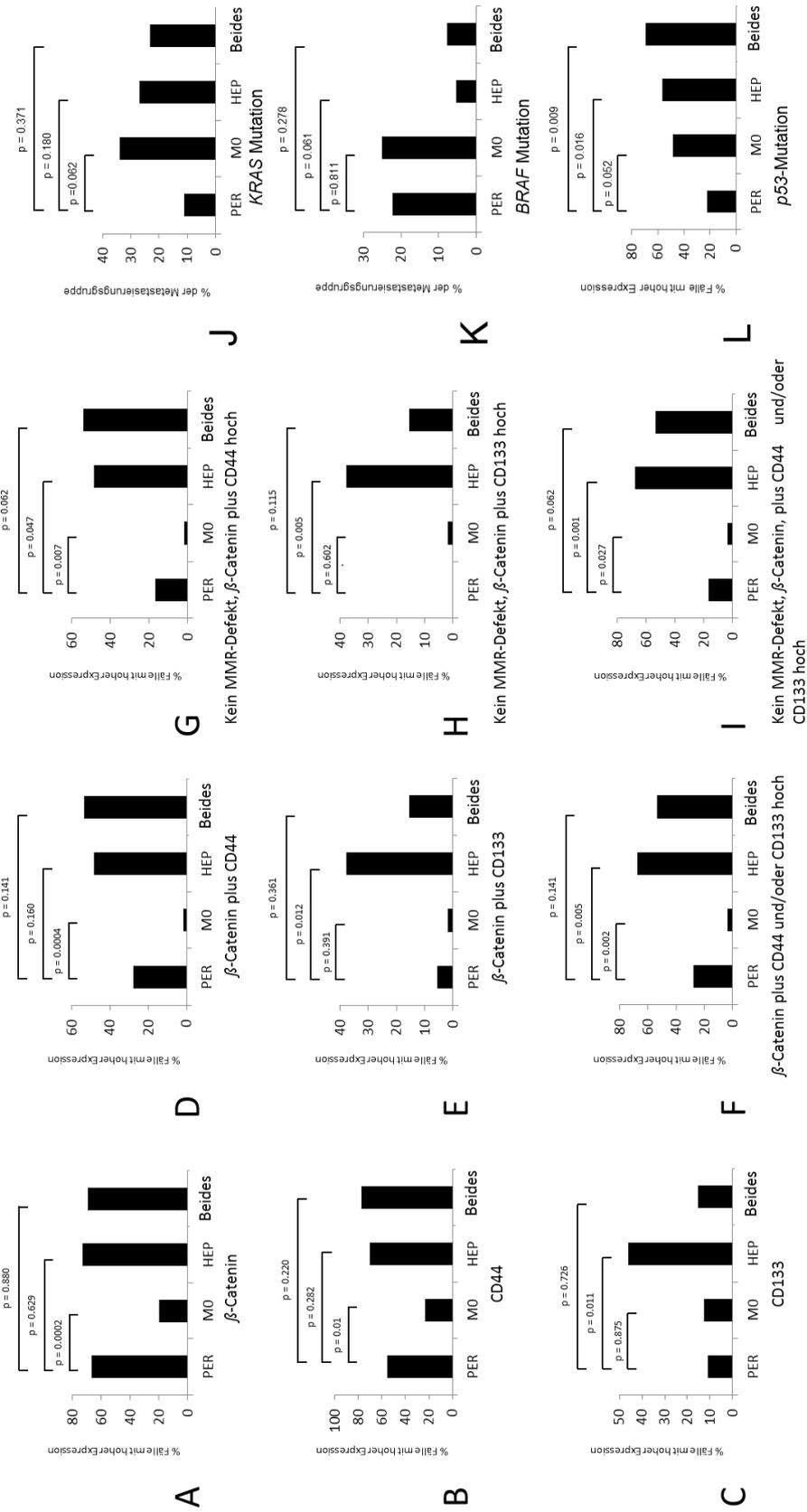
Merkmal	Alle Fälle	Keine Metastasen	Peritonealkarzinose	Metastasen	p	Leber- metastasen	Beides	p
gesamt	124 (100.0)	56 (45.2)	18 (14.5)	50 (40.3)		37 (29.8)	13 (10.5)	
<i>BRAF</i> Exon 15								
Wt	103 (83.0)	42 (75.0)	14 (77.8)	47 (94.0)	<b>0.027</b>	35 (94.6)	12 (92.3)	0.065
Mutation	21 (16.9)	14 (25.0)	4 (22.2)	3 (6.0)		2 (5.4)	1 (7.7)	
<i>KRAS</i> Exon 2								
Wt	90 (72.6)	37 (66.0)	16 (88.9)	37 (74.0)	0.161	27 (73.0)	10 (77.0)	0.293
Mutation	34 (27.4)	19 (33.9)	2 (11.1)	13 (26.0)		10 (27.0)	3 (23.0)	
MMR-Defekt								
ja	4 (3.2)	0 (0)	3 (16.7)	1 (2.0)	<b>0.002</b>	1 (2.7)	0 (0)	<b>0.005</b>
nein	120 (96.8)	56 (100.0)	15 (83.3)	49 (98.0)		36 (97.3)	13 (100.0)	
$\beta$ -Catenin								
niedrig	65 (52.4)	45 (80.4)	6 (33.3)	14 (28.0)	<b>0.00000011</b>	10 (27.0)	4 (30.8)	<b>0.000000484</b>
hoch	59 (47.6)	11 (19.6)	12 (66.7)	36 (72.0)		27 (73.0)	9 (69.2)	
CD44								
niedrig	65 (52.4)	43 (76.8)	8 (44.4)	14 (28.0)	<b>0.00000257</b>	11 (29.7)	3 (23.0)	<b>0.000000994</b>
hoch	59 (47.6)	13 (23.2)	10 (55.6)	36 (72.0)		26 (70.3)	10 (77.0)	
CD133								
niedrig	96 (77.4)	49 (87.5)	16 (88.9)	31 (62.0)	<b>0.003</b>	20 (54.0)	11 (84.6)	<b>0.001</b>
hoch	28 (22.6)	7 (12.5)	2 (11.1)	19 (38.0)		17 (46.0)	2 (15.4)	
p53								
niedrig	63 (50.8)	29 (51.8)	14 (77.8)	20 (40.0)	<b>0.022</b>	16 (43.2)	4 (30.8)	<b>0.042</b>
hoch	61 (49.2)	27 (48.2)	4 (22.2)	30 (60.0)		21 (56.8)	9 (69.2)	

***Kombination der Marker fehlender MMR-Defekt,  $\beta$ -Catenin, CD44 und CD133 Expression***

96,8% (120 von 124) der Fälle des gesamten Kollektivs weisen keinen MMR-Defekt auf. Vergleicht man hier die Expression von nukleärem  $\beta$ -Catenin, CD44 und CD133 lässt sich folgendes finden: In der M0-Gruppe zeigt sich bei 1,8 % (1 von 56) eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin und CD144 und bei 1,8% (1 von 56) eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin und CD133. Bei insgesamt 3,6% findet sich eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression, CD44 Expression und/oder eine hohe CD133 Expression (2 von 56). Verglichen mit der Gruppe der Peritonealkarzinose: Hier zeigen 20 % (3 von 15) eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression und gleichzeitig eine hohe CD44 Expression, kein Fall weist eine erhöhte  $\beta$ -Catenin und CD133 Expression auf und 20% (3 von 15) weisen eine hohe  $\beta$ -Catenin, CD44 und/oder gleichzeitige CD133 Expression auf. In der Gruppe der alleinigen Lebermetastasierung, die 36 Fälle umfasst zeigt sich bei 50% (18 von 36) eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin und CD44, bei 38,9% (14 von 36) eine hohe Expression von  $\beta$ -Catenin und CD133 und bei 69,4% (25 von 36) sowohl eine hohe  $\beta$ -Catenin, CD44 und/oder CD133 Expression ( $p=0,0000000001$ ).

**Tabelle 18:** Korrelation der untersuchten Biomarker und Biomarkerkombinationen mit den unterschiedlichen Metastasierungsmustern (Prozentwerte sind in Klammern angegeben; fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant)

Merkmal	Alle Fälle	Keine Metastasen	Peritonealkarzinose	Lebermetastasen	Beides	P
gesamt	124 (100.0)	56 (45.2)	18 (14.5)	37 (29.8)	13 (10.5)	
MMR-Defekt						
ja	4 (3.2)	0 (0)	3 (16.6)	1 (2.7)	0 (0)	<b>0.005</b>
nein	120 (96.8)	56 (100.0)	15 (83.3)	36 (97.3)	13 (100.0)	
$\beta$ -Catenin						
niedrig	65 (52.4)	45 (80.4)	6 (33.3)	10 (27.0)	4 (30.8)	<b>0.000000484</b>
hoch	59 (47.6)	11 (19.6)	12 (66.7)	27 (73.0)	9 (69.2)	
CD44						
niedrig	65 (52.4)	43 (76.8)	8 (44.4)	11 (29.7)	3 (23.0)	<b>0.00000994</b>
hoch	59 (47.6)	13 (23.2)	10 (55.6)	26 (70.3)	10 (77.0)	
CD133						
niedrig	96 (77.4)	49 (87.5)	16 (88.9)	20 (54.0)	11 (84.6)	<b>0.001</b>
hoch	28 (22.6)	7 (12.5)	2 (11.1)	17 (45.9)	2 (15.4)	
$\beta$ -Catenin und CD44						
hoch						
negativ	93 (75.0)	55 (98.2)	13 (72.2)	19 (51.4)	6 (46.2)	<b>0.00000033</b>
positiv	31 (25.0)	1 (1.8)	5 (27.8)	18 (48.6)	7 (53.8)	
$\beta$ -Catenin und CD133						
hoch						
negativ	106 (85.5)	55 (98.2)	17 (94.4)	23 (62.2)	11 (84.6)	<b>0.00002</b>
positiv	18 (14.5)	1 (1.8)	1 (5.6)	14 (37.8)	2 (15.4)	
$\beta$ -Catenin plus CD44 und/oder CD133						
hoch						
negativ	85 (68.5)	54 (96.4)	13 (72.2)	12 (32.4)	6 (46.2)	<b>0.000000007</b>
positiv	39 (31.5)	2 (3.6)	5 (27.8)	25 (67.6)	7 (53.8)	
kein MMR-Defekt, $\beta$ -Catenin und CD44						
hoch	120 (96.7)	56 (46.7)	15 (12.5)	36 (30.0)	13 (10.8)	
negativ	91 (75.8)	55 (98.2)	12 (66.7)	18 (48.6)	6 (46.2)	<b>0.0000001339</b>
positiv	29 (24.2)	1 (1.8)	3 (16.7)	18 (48.6)	7 (53.8)	
kein MMR-Defekt, $\beta$ -Catenin und CD133						
hoch	120 (96.7)	56 (46.7)	15 (12.5)	36 (30.0)	13 (10.8)	
negativ	103 (85.8)	55 (98.2)	15 (83.3)	22 (59.5)	11 (84.6)	<b>0.0000431</b>
positiv	17 (14.2)	1 (1.8)	0 (0)	14 (37.8)	2 (15.4)	
kein MMR-Defekt, $\beta$ -Catenin plus CD44 und/oder CD133						
hoch	120 (96.7)	56 (46.7)	15 (12.5)	36 (30.0)	13 (10.8)	
negativ	83 (69.2)	54 (96.4)	12 (66.7)	11 (29.8)	6 (46.2)	<b>0.0000000001</b>
positiv	37 (30.8)	2 (3.6)	3 (16.7)	25 (67.6)	7 (53.8)	



**Abbildung 10:** Histogramme der Korrelation von  $\beta$ -Catenin (A), CD44 (B), CD133 (C), KRAS-Mutation (J), BRAF-Mutation (K), p53-Mutation (L) sowie die verschiedenen Markerkombinationen (D – I) mit den verschiedenen Metastasierungsmustern.

MO = Keine Metastasen, PER = Peritonealkarzinose, HEP = Lebermetastasierung, Beides = Peritonealkarzinose, und Lebermetastasierung

## 6 Diskussion

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass sich das kolorektale Karzinom mit Hilfe von Biomarkern in einzelne Subgruppen einteilen lässt, die mit verschiedenen Metastasierungsmustern korrelieren. Mit Kenntnis der Biomarker und der möglichen Folgen einer Expression ließen sich in Zukunft vielleicht Rückschlüsse auf Prognose und Therapieansprechen ziehen. Zur Untersuchung dieser Theorie wurde ein sehr sorgfältig und speziell ausgewähltes Patientengut anhand etablierter Biomarker klassifiziert und diese in verschiedenen Kombinationen angewendet um eine bestmögliche Einordnung der Gruppen vorzunehmen.

### *Bedeutung der Expression der Marker $\beta$ -Catenin, CD44 und CD133 für das Ausbreitungsmuster*

Die Fernmetastasierung ist der prognosebestimmende Faktor des kolorektalen Karzinoms. Aufgrund der Tatsache, dass es aber auch Tumoren zu geben scheint, die eine nur eine Peritonealkarzinose entwickeln oder in keiner Form eine Metastasierung aufweisen, gilt es Marker zu identifizieren, die eine Aussage über das Metastasierungsrisiko zulassen. Da die Entwicklung sog. "Stammzell"-Eigenschaften laut heutigem Kenntnisstand die Tumorzellen dazu befähigt, Metastasen zu bilden, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Expression einzelner Stammzellmarker und deren Kombination um eine möglichst hohe Diskriminationsfähigkeit zu erhalten, s. Tabelle 18.

### *Korrelation mit klinischen Parametern*

In unserer Arbeit zeigte sich, dass eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression positiv mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,00077$ ) und mit der Ausbildung von Fernmetastasen ( $p = 0,00000011$ ) verbunden ist. Dies unterstützt die Theorie, dass  $\beta$ -Catenin wichtig im Zuge der Ausbreitung der Tumorzellen ist. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte  $\beta$ -Catenin Expression mit positiven Nodalstatus vergesellschaftet ist (96) und als ungünstiger Prognosefaktor gilt (97, 98).

### *Eine hohe CD133 Expression ist positiv mit einer Lebermetastasierung korreliert*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine positive Korrelation einer hohen CD133 Expression mit dem Vorhandensein einer Lebermetastasierung: In der M0 Gruppe weisen nur 5,6% (7 Fälle) eine hohe CD133 Expression auf, in der Peritonealkarzinose-Gruppe 1,6% (2 Fälle). Im Vergleich dazu sind es 13,7% (17 Fälle) in der Gruppe mit Lebermetastasen. Nimmt man noch die Gruppe hinzu, die sowohl Peritonealkarzinose als auch Lebermetastasen aufweist, erhöht sich der Prozentsatz auf 15,3% ( $p = 0,001$ ). Vergleicht man nur Peritonealkarzinose und Lebermetastase innerhalb der Metastasengruppe zeigen von 28 Fällen mit hoher CD133 Expression 60,7% eine Lebermetastasierung (67,8% Peritonealkarzinose und Lebermetastase) und nur 7,1% eine Peritonealkarzinose. Diese Korrelation konnten auch Horst et al. in einer Studie zeigen (44). Aufgrund dieser Tatsache ist anzunehmen, dass eine erhöhte Expression des Stammzellmarkers CD133 in den Primärtumoren möglicherweise eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum, Invasion und Ausbreitung in andere Organe spielt. Aber weder Horst et al. konnten in einer "knock-down" Studie eine Korrelation zwischen einer CD133 Expression und Tumorwachstum oder Ausbreitung feststellen (44), noch zeigten sich Unterschiede zwischen CD133+ und CD133- Zellen und ihren Fähigkeiten der Tumorentstehung in vitro einer Studie von Shmelkov et al. (99). Das heißt, dass in sowohl CD133+ als auch CD133- Zelllinien aus Tumoren Eigenschaften zur Metastasenbildung besaßen. Wenn CD133 laut heutigem Wissensstand auch keine funktionale Rolle spielen mag, so ist sein prognostischer Wert

gesichert: Patienten mit einer hohen CD133 Expression zeigen ein niedrigeres Gesamtüberleben. Da CD133 aber auch mit einer Lebermetastasierung korreliert und der Status der Metastasierung einen hohen Einfluss auf das Langzeitüberleben hat, besteht der Zusammenhang möglicherweise darin. Unabhängig von der Ursache dieses Zusammenhangs lässt sich aber mit der Analyse von CD133 eine Hochrisikogruppe detektieren (44, 100). Eine erhöhte CD133 Expression trat nur in 11,1% (2 Fällen) in der Gruppe mit der Entwicklung einer Peritonealkarzinose auf. Geht man davon aus es handelt sich um verschiedene Subgruppen, lässt das darauf schließen, dass dieser Subgruppe möglicherweise bestimmte Stammzeleigenschaften fehlen (100) und man anhand dieses Markers zum jetzigen Zeitpunkt zumindest eine Aussage über das wahrscheinliche Ausbreitungsmuster treffen kann.

*CD44 zeigt als alleiniger Marker wenig Relevanz in der Einschätzung des Ausbreitungsmusters*

Laut einigen Studien ist eine erhöhte Expression von CD44 mit einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Risiko einer Fernmetastasierung verbunden (101, 102), aber es existieren laut Horst et al. (93) auch Studien in denen die Aussagen bezüglich des prognostischen Werts abweichen. Auch in dieser Arbeit ließ sich eine Korrelation zwischen einer hohen CD44 Expression und einer Fernmetastasierung feststellen ( $p=0,00000257$ ). Vergleicht man nur die einzelnen Metastasierungsgruppen miteinander, ohne die Kontrollgruppe M0, so lässt sich keine Korrelation finden ( $p=0,401$ ) (Die Ergebnisse wurden in dieser Arbeit nicht in einer Tabelle dargestellt, siehe aber Neumann, Löhrs et al. " *Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer*" (100)). Es konnte also der Nachweis erbracht werden, dass eine erhöhte CD44 Expression mit dem Risiko einer Metastasierung vergesellschaftet ist, eine genaue Zuordnung zu einer Form der Metastasierung ist aber nicht möglich: Dadurch dass auch 21,7% innerhalb der Gruppe mit hoher CD44 Expression eine Peritonealkarzinose aufwiesen (10 Fälle), ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen einer Peritonealkarzinose und einer Lebermetastasierung zeigen. Möglicherweise könnte das an dem in der Studie

verwendeten Antikörper liegen. Wir verwendeten den G44-26 Klon. Dieser Antikörper detektiert alle CD44-Isoformen, was aufgrund der geringen Spezifität dazu führen könnte, die Anzahl der CD44 positiven Zellen überzubewerten (100). Der Antikörper wird in der Detektion von Stammzellen eingesetzt, sollte also im Normalfall geeignet sein, diese zu identifizieren (100). In unserem Fall hätte eine alleinige Analyse der CD44 Expression zwar die prognostisch ungünstigen Fälle herausfiltern können, es ließen sich aber keine sicheren Aussagen bezüglich der zu erwartenden Metastasierung treffen.

### *$\beta$ -Catenin besitzt als alleiniger Marker keine suffiziente Diskriminationsfähigkeit*

In dieser Arbeit konnte eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten nukleären  $\beta$ -Catenin Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen ( $p=0,00077$ ) und einer Metastasierung ( $p=0,00000011$ ) gezeigt werden. In einem Vergleich der einzelnen Subgruppen von M1 ließen sich keine Unterschiede feststellen, s. Neumann, Löhrs et al. (100). 25% (12 Fälle) mit Peritonealkarzinose gegenüber 56,3% (27 Fälle) mit Lebermetastasierung von den insgesamt 48 Fällen der M1 Gruppe zeigten eine hohe  $\beta$ -Catenin Expression. Dass die Überexpression von  $\beta$ -Catenin aufgrund seiner Rolle als Effektor im Wnt-Signalweg wichtig in der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen ist, ist schon länger bekannt (103). Da vor allem die Überexpression des nukleären  $\beta$ -Catenins die Zellen wahrscheinlich zu Migration und Invasion befähigt, ist die Verteilung desselben innerhalb des Tumors von entscheidender Bedeutung. So zeigt sich nukleäres  $\beta$ -Catenin vornehmlich an der sog. Invasionsfront, während innerhalb des Tumors membranständiges  $\beta$ -Catenin dominiert, so wie in normalen Gewebe auch (75, 103). Laut dem Migrating Cancer Stem Cell (MCS) Modell von Jung et al. (104) erlangen einige der Tumorzellen durch EMT, die sich durch eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin und die konsekutive Expression von  $\beta$ -Catenin Zielgenen auszeichnet und weitere, bis heute unbekannte Mutationen, sowie Einflüsse durch das umliegende Gewebe die Fähigkeit zur Invasion und zur Bildung von Metastasen. Es stellt sich die Frage, betrachtet man das MCS-Zell-Modell, ob es sich bei der Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose um eine eigene Tumorentität handeln könnte, die zwar gewisse Fähigkeiten, wie die der Invasion

in umliegendes Gewebe durch eine EMT erlangt, aber keine MCS entwickeln kann und nur lokal destruierend wächst. Das könnte die Ursache für die in der Arbeit in beiden Metastasierungsformen auftretende nukleäre  $\beta$ -Catenin Expression sein. Es gilt in weiteren Studien die Faktoren zu identifizieren, die in der schrittweisen Entwicklung einer EMT eine Rolle spielen und weiter zu den Eigenschaften der MCS-Zellen führen.

#### *Die Kombination einzelner Marker als möglicher Algorithmus*

Um die Diskriminierung zwischen den einzelnen Risikogruppen zu verbessern lassen sich die einzelnen Marker in verschiedenen Algorithmen kombinieren. Bei der Entwicklung der Theorie, dass eine Kombination einzelner Marker bessere Ergebnisse bezüglich der Unterscheidung zwischen den einzelnen Ausbreitungsmustern liefern könnte, stützen wir uns auf Studien, die das Auftreten derer behandelten: Du et al. postulieren, dass es fast nie zu einer Co-Expression von CD44 und CD133 kommt (93, 105) und wir konnten erstmalig zeigen, dass eine CD133 Expression bei Peritonealkarzinosen entwickelnden Tumoren so gut wie gar nicht vorkommt. Da auch die Analyse von  $\beta$ -Catenin allein keine ausreichende Diskriminationsfähigkeit zeigte und laut Horst et al. eine erhöhte nukleäre  $\beta$ -Catenin und CD133 Expression unabhängig voneinander auftreten (106), erschienen Kombinationen dieser drei Marker sinnvoll, um möglichst genau Unterschiede im Risiko der Ausbreitung zu detektieren. Vergleicht man die Kombinationen miteinander wird ersichtlich, dass die Anwendung aller drei Marker das Ergebnis mit der höchsten statistischen Signifikanz liefert, s. Abb. 10 und Tabelle 18. Mit einem p-Wert von  $p=0,0000000007$  zeigte sich die erhöhte Expression der Stammzellmarker in der Gruppe der Lebermetastasen im Vergleich zur Peritonealkarzinose. Auch bei alleinigem Vergleich der Metastasengruppen ohne die Kontrollgruppe, fand sich nun ein signifikanter Unterschied mit  $p=0,021$ . Die Kombinationen  $\beta$ -Catenin und erhöhte CD44 Expression, bzw.  $\beta$ -Catenin und erhöhte CD133 Expression zeigten dagegen Werte von  $p=0,00000033$ , bzw.  $p=0,00002$ . Die Möglichkeit, dass eine Kombination der Marker CD133 und  $\beta$ -Catenin mit einer ungünstigen Prognose in Stadium IIa Tumoren verbunden ist, konnten schon Horst et al. (106) in ihrer Studie aufzeigen, unsere Ergebnisse

stützen diese Theorie, da eine Fernmetastasierung den größten Einfluss auf das Gesamtüberleben hat.

Aufgrund des von Neumann et al. (45) kürzlich entwickelten Algorithmus wenden wir zur noch besseren Diskrimination eine Kombination der Marker "kein MMR-Defekt, hohe  $\beta$ -Catenin, CD133 und CD44 Expression" an. Neumann et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Markerkombination hMLH1 positiv (keine MSI),  $\beta$ -Catenin Expression erhöht und/oder CD133 Expression erhöht ein hohes Risiko einer Lebermetastasierung aufweisen (45), dagegen das Risiko für eine Metastasierung bei Verlust der hMLH1 Expression extrem gering war. Diese Ergebnisse dienten dieser Arbeit als Grundlage um mögliche Unterschiede zwischen der Peritonealkarzinose-Gruppe und der Lebermetastasen-Gruppe aufzudecken. In Anlehnung an diesen Algorithmus ließ sich folgendes feststellen: Mittels der Kombination "kein MMR Defekt,  $\beta$ -Catenin plus CD44 und/oder hohe CD133 Expression" erhielt man die höchste Diskriminierung zwischen den Gruppen ( $p=0,0000000001$ ). Die Kombination weist auf ein hohes Risiko zur Ausbildung von Fernmetastasen dieser Gruppe von Tumoren hin (25 von 36 Fällen). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der Gruppe der Peritonealkarzinose ausbildenden Tumore diese Kombination so gut wie gar nicht vorkommt (in 3 von 15 Fällen), s. auch Neumann, Löhrs et al.

### *Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg*

Laut aktuellem Wissenstand spielen Mutationen im EGFR-Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Tumoren (107, 108). Bezogen auf das Kolonkarzinom handelt es sich oft um eine Mutation im *KRAS*-Gen, die in ca. 40% (61) der Karzinome auftritt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Mutation im Exon 2 des *KRAS*-Gens in 27,4% der Fälle (34 von 124), dies ist etwas weniger als erwartet. Verschiedene Studien (109-111) konnten zeigen, dass eine Mutation im *KRAS*-Gen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in Tumoren vorkommen, die eine Lebermetastasierung hervorrufen. In unserer Studie ließ sich jedoch keine signifikante positive Korrelation zwischen mutiertem *KRAS* und einer Fernmetastasierung in die Leber feststellen: Es trat bei lediglich 27% (10 von 37) Fällen mit einer Lebermetastasierung eine Mutation auf dem *KRAS*-Gen auf. In der Kontrollgruppe ohne Metastasen wies ein prozentualer Anteil von 33,9% (19 Fälle) eine Mutation auf, der restliche Anteil von 66,1% zeigte einen *KRAS*-Wildtyp. Jedoch war in der Gruppe mit reiner Peritonealkarzinose das Auftreten einer *KRAS*-Mutation nur in 11,1% (2 von 18 Fällen) zu beobachten. Es besteht damit zwar keine statistische Signifikanz ( $p=0,161$ ), jedoch ist die Tendenz abzulesen, dass mutiertes *KRAS* häufiger in Fernmetastasen-bildenden Tumoren zu finden ist und seltener in sich lokal Ausbreitenden (109). Dieses Ergebnis würde die Theorie der unterschiedlichen Tumorgenesewege stützen. Warum sich so viele Fälle von mutiertem *KRAS* in der Kontrollgruppe finden, ist unklar. Obwohl die Mehrzahl der Lebermetastasen im 1. Jahr nach Diagnosestellung auftritt, besteht laut einer großen Studie von Landreau et al. auch in dem Zeitraum von 5 bis 10 Jahren nach Erstdiagnose ein Risiko von 2,2% eine Lebermetastasierung zu entwickeln (112). Der Grund warum der Anteil von mutiertem *KRAS* in der Gruppe der Lebermetastasierung in dieser Arbeit etwas kleiner ausfällt, aber auch der vergleichsweise hohe Wert in der Kontrollgruppe könnten der geringen Fallzahl geschuldet sein, die statistisch signifikante Aussagen erschwert. In anderen Studien betrug der Anteil der Fälle mit mutiertem *KRAS* an den metastasierten Fällen deutlich mehr. Es ist jedoch erwähnenswert, dass die Angaben zur Häufigkeit des Auftretens einer Mutation und dem Risiko der Fernmetastasierung zwischen den Studien sehr stark differie-

ren: Es werden Werte zwischen 30% und 54% angegeben (64, 110, 113). Diese unterschiedlichen Angaben lassen weitere Studien sinnvoll erscheinen um eine genaue Risikoevaluation vornehmen zu können.

Der prognostische Wert einer *KRAS*-Mutationsanalyse ist umstritten: Laut der RASCAL I und II Studien scheinen bestimmte Mutationen Einfluss auf das Gesamtüberleben bzw. das Risiko eines Wiederauftretens zu haben (61, 114, 115), was wiederum die PETACC-3 Studie nicht bestätigen konnte (114, 116). Auch die Angaben zum Auftreten einer Mutation des *KRAS*-Gens bezogen auf den Differenzierungsgrad und die klinische Relevanz sind unterschiedlich (58, 108, 114, 116). Aktuell gibt es Hinweise darauf, dass es möglicherweise Unterschiede in Prognose und Überleben zwischen den einzelnen vorkommenden Mutationen auf Exon 2 gibt (Übersicht über die häufigsten Typen, s. Tabelle 3) (114, 115). So scheint eine Mutation auf Kodon 13 eine aggressivere Form des kolorektalen Karzinoms darzustellen: Laut Modest et al. kommt es bei dieser Form häufiger sowohl zu Lymphknoten-, als auch zu Fernmetastasen (117), Faktoren, die eine ungünstige Prognose nach sich ziehen. In dieser Arbeit lassen sich keine signifikanten Aussagen bezüglich der Assoziation einer *KRAS*-Mutation mit klinischen Daten treffen, was eher die Theorie unterstützen würde, dass es keinen Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad oder Tumorstadium und damit der Prognose gibt. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine statistischen Auswertung bezüglich einzelner Mutationen (z.B. Kodon 12 oder 13) im Zusammenhang mit klinischen Parametern durchgeführt. Der prädiktive Nutzen einer *KRAS*-Mutationsanalyse gilt jedoch als gesichert, aufgrund der Tatsache, dass nur Patienten mit *KRAS*-Wildtyp auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR ansprechen (58, 63, 118). Verwendung finden die monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) und Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>), zugelassen sind diese nur für Tumorstadium IV und Patienten mit *KRAS*-Wildtyp. Sie werden entweder in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie (Irinotecan oder FOLFOX) oder bei Versagen der Erstlinientherapie als Monotherapie verabreicht (56, 119). Durch die Anwendung dieser zielgerichteten Therapie konnte in den letzten Jahren das Tumorprogressions-freie Überleben von Patienten mit Tumorstadium IV und *KRAS*-Wildtyp gesteigert werden (120, 121). Patienten mit einer *KRAS*-Mutation sprechen nicht

auf eine Therapie mit monoklonalen Anti-EGFR-Antikörpern an (57), aber auch nur ca. 60% der Patienten mit einem *KRAS*-Wildtyp profitieren von einer Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern (122). Daraus lässt sich schließen, dass es noch weitere Veränderungen geben muss, die die Resistenz gegen Epidermal-Growth-Factor-Receptor(EGFR)-Inhibitoren bewirken (57).

Zur Identifikation möglicher prädiktiver Biomarker, die das Therapieansprechen betreffen beschäftigten sich einige großangelegte randomisierte Studien, wie z. B. die CRYSTAL- und die OPUS-Studie mit Biomarkern, die ebenfalls in der EGFR-abhängigen Signaltransduktion eine Rolle spielen (121). Einer davon ist die Mutationsanalyse des *BRAF*-Gens, das auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Innerhalb der Fälle, die einen *KRAS*-Wildtyp aufweisen, lassen sich in ca. 5-15% Mutationen im *BRAF*-Gen detektieren (108, 110). In dieser Arbeit lag der Anteil der *BRAF*-Mutationen innerhalb der Gruppe mit *KRAS*-Wildtyp bei einem prozentualen Anteil von 23,3%. Wobei erwähnt werden muss, dass 66,7% in der Vergleichsgruppe ohne Metastasen auftraten (14 von 21 Fällen). Auch diese Abweichung vom zu erwartenden Ergebnis könnte auf die geringe Fallzahl zurückzuführen sein. Die Bedeutung einer *BRAF*-Mutationsanalyse als prädiktiver Biomarker wird kontrovers diskutiert. Es gibt Studien, die keinen prädiktiven Wert zeigen konnten, wie die OPUS und die CRYSTAL Studie: Eine Mutation auf dem *BRAF*-Gen brachte keinen Vorteil im Ansprechen auf eine Therapie mit Anti-EGFR-Rezeptor-Inhibitoren bei Patienten mit *KRAS*-Wildtyp (121, 123). De Roock et al. wiederum wiesen in einer Studie nach, dass eine Mutation auf dem *BRAF*-Gen durchaus einen positiven Effekt auf das progressionsfreie Überleben unter Anti-EGF-Rezeptor-Inhibitor-Therapie haben kann (122, 124). Aufgrund der abweichenden Ergebnisse in den einzelnen Studien, wird wohl in Zukunft noch mehr Aufmerksamkeit darauf verwendet werden müssen, die Rolle von BRAF als prädiktiven Marker zu definieren (125). Inwiefern eine Therapie mit sog. BRAF-Inhibitoren wie z.B. Vemurafenib auf das kolorektale Karzinom übertragbar ist und ob hier der *BRAF*-Mutationsstatus als prädiktiver Marker fungieren kann, ist bis heute ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt (121).

Der prognostische Wert einer *BRAF*-Mutation hingegen ist besser validiert (108, 110, 121).

In dieser Arbeit ließ sich in insgesamt 21 Fällen, das entspricht 16,9% des gesamten Kollektivs eine Mutation auf dem *BRAF*-Gen finden. Dieser Prozentsatz entspricht ungefähr dem zu erwartenden Wert von den in einer Metaanalyse von Clancy et al. angegebenen 7,4-14,8% (126). Laut Clancy et al. ist eine Mutation auf dem *BRAF*-Gen einerseits assoziiert mit weiblichen Geschlecht als auch mit schlechter Differenzierung und hohen Tumorstadien (126). Diese Aussagen konnten wir in dieser Arbeit bestätigen: Das Auftreten einer Mutation war signifikant ( $p=0,007$ ) mit einer schlechten Differenzierung assoziiert ( $66,7\% \geq G3$ ). Auch trat bei 18 von 21 Fällen mit mutiertem *BRAF*, das entspricht 85,7%, ein T-Stadium von mindestens T3 auf und es zeigte sich bei doppelt so vielen weiblichen Patienten ein mutiertes *BRAF* wie bei männlichen ( $66,7\% : 33,3\%$ ). Auch das Ergebnis, das Mutationen auf dem *BRAF*-Gen vermehrt in höherem Alter auftreten (15 Fälle in der Altersgruppe  $\geq 65$  gegenüber 6 Fällen in der Altersgruppe  $< 65$ ), ist bei Clancy et al. beschrieben (126). Von Yokota (2012) wird anhand von Ergebnissen seiner Metaanalyse außerdem postuliert, dass eine *BRAF*-Mutation assoziiert sei mit peritonealer Ausbreitung: 60% der Fälle mit peritonealer Ausbreitung gegenüber 15% mit der Ausbildung von Metastasen wiesen eine Mutation auf (127). Auch in unserer Studie lässt sich trotz der kleinen Fallzahl Ähnliches ablesen: Von 7 Fällen mit mutiertem *BRAF*-Gen, befinden sich 57,1% (4 Fälle) in der Gruppe mit alleiniger Peritonealkarzinose. Betrachtet man zusätzlich die Gruppe, in der es sowohl zu einer Peritonealkarzinose, als auch zu einer Fernmetastasierung gekommen ist, erhöht sich der Anteil auf 71,4%. Insgesamt scheint eine Mutation im *BRAF*-Gen eher auf eine schlechtere Prognose und ein höheres Risiko des Wiederauftretens eines Kolonkarzinoms hinzudeuten (127). Es gibt jedoch auch Studien, die eine *BRAF*-Mutation verbunden mit einer günstigen Prognose detektierten (30). Es ist jedoch schwierig, daraus sichere prognostische Schlüsse zu ziehen, denn laut Neumann et al. lässt sich der Biomarker BRAF nur in Kombination mit der Beurteilung der Mikrosatelliteninstabilität prognostisch sinnvoll einsetzen (121): Eine *BRAF*-Mutation die gemeinsam mit einer MSI-H (hohe Mikrosatelliteninstabilität) auftritt besitzt eine 5-Jahres-Überlebensrate von  $>70\%$  im Gegensatz zu Patienten, bei denen eine *BRAF*-Mutation in Verbindung mit MSS (keine Mikrosatelliteninstabilität) auftritt. Hier ist die Prognose ausgesprochen schlecht (30, 121).

### *Bedeutung der Analyse des MMR-Defekts*

Ein *MMR-Defekt* ließ sich in 3,2% aller Patienten nachweisen (4 Fälle). Es wurden bei der Auswahl des Kollektivs alle Fälle mit Verdacht auf das Vorliegen eines HNPCC ausgeschlossen, so dass es sich bei diesen Fällen ausschließlich um sporadische kolorektale Karzinome handelt, bei denen das Auftreten eines MMR-Defekts laut Untersuchungen bei ca. 15% (45, 83) liegt. In dieser Arbeit ist der kleine Prozentsatz möglicherweise auf die geringe Fallzahl zurückzuführen. Die Bedeutung eines MMR-Defekts liegt darin, dass MSI-Tumore sehr selten Fernmetastasen bilden. So können auch Patienten die bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes T3 Stadium mit positiven Lymphknotenstatus aber eine MSI aufweisen, eine recht günstige Prognose und ein signifikant besseres 5-Jahresüberleben zeigen (123, 128). Außerdem handelt es sich vermehrt um rechtsseitig auftretende Tumoren (45). Auch in unserem Kollektiv befanden sich 75% (3 von 4 Fällen) entweder im Caecum oder im Kolon ascendens. Trotz der geringen Fallzahl lässt sich ein Trend in Bezug auf die Ausbreitung über die Lymphknoten erkennen: 100% wiesen einen positiven Nodalstatus auf, dies ist jedoch bezogen auf die Fallzahl von insgesamt nur 4 Fällen. Laut Neumann et al. ist eine Lymphknoteninvasion zwar positiv mit einem Einbruch des Tumors in die Lymphgefäße korreliert, dieser aber nicht mit der Entwicklung von Fernmetastasen (121). In unserem Fall könnte es sein, dass es sich zwar um Tumore mit positiven Nodalstatus handelt, diese aber der Gruppe zugehörig sind, die trotzdem nur unter lokaler Ausbreitung und mit Einbruch in die Lymphgefäße wächst und nicht über den Blutkreislauf in die Leber metastasiert. Gestützt werden könnte diese Theorie durch die Tatsache, dass sich 3 der Fälle in der Gruppe mit Peritonealkarzinose befinden und nur 1 Fall in der Gruppe, die eine Lebermetastasierung entwickelt, also 75% lokal ausbreitend gewachsen sind. Im Umkehrschluss weisen nur 2,7% in der reinen Lebermetastasen Gruppe einen MMR-Defekt auf und somit höchstwahrscheinlich eine MSI. Der Anteil der eine Lebermetastasierung entwickelte liegt noch unter dem in der Literatur angegebenen Wert von 7,9% (121). Kombiniert man nun nur die Marker *BRAF* Wt/Mutation und MMR-Defekt vorhanden oder nicht, sähe die Einteilung möglicherweise fol-

gendermaßen aus: Es existiert eine Gruppe mit mutiertem *BRAF* und MSS (bzw. kein MMR-Defekt), die ein hohes Risiko für eine Fernmetastasierung aufweist, sowie eine Gruppe in der *BRAF* mutiert ist, mit zusätzlichem MMR-Defekt (MSI) und damit einem sehr geringen Risiko für eine Fernmetastasierung und einer günstigen Prognose. Wo die Gruppe mit Entwicklung einer Peritonealkarzinose einzuordnen ist, muss noch genauer untersucht werden. Es ließen sich in dieser Arbeit nur 4 Fälle mit einem MMR-Defekt und damit potenzieller Mikrosatelliteninstabilität finden, was fundierte Aussagen aufgrund der geringen Anzahl nicht zulässt. Aufgrund der in anderen Studien veröffentlichten Ergebnisse lässt sich aber ableiten, dass es sich hier um das Auftreten verschiedener, sich molekularpathologisch unterscheidenden Subtypen des kolorektalen Karzinoms handelt, s. Tabelle 1. Es gilt in Zukunft, die Tumoren noch differenzierter anhand ihres *KRAS/BRAF*-Mutationsstatus und des Vorhandenseins einer MSI/MSS einzuteilen, um so Rückschlüsse auf Prognose und Therapieansprechen zu erhalten.

Der prädiktive Wert einer MMR-Defekt Analyse wird schon seit längerem untersucht: Ein gängiges Chemotherapeutikum in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms ist 5-Fluoruracil (5-FU) (56). Dieses Chemotherapeutikum wirkt über eine Hemmung des Zellwachstums und setzt ein intaktes MMR-System voraus. So profitieren Patienten mit MSS bezogen auf das Gesamtüberleben von einer Therapie mit 5-FU, Patienten mit einer MSI nicht (128, 129). Es lässt sich nicht in allen MSI Fällen ein MMRD finden, da auch andere Mutationen zu einer MSI führen können (83). Da aber Mutationen in diesen Genen in über 90% (83) der MSI Tumore zu finden sind und es das Ziel sein sollte für den klinischen Alltag praktikable Algorithmen zu entwickeln, beschränkt sich diese Studie auf den Nachweis eines MMR-Defekts anhand des immunhistochemischen Nachweises von funktionsfähigem hMLH1 und/oder hMSH2. Laut Shia et al. und Stone et al. ist auch der immunhistochemische Nachweis eines Ausfalls von hMLH1 oder hMSH2 ausreichend um eine MSI nachzuweisen, da die Expressionsverluste der beiden Gene signifikant mit einer MSI korrelieren (121, 130). Würde man sich auf den Nachweis einer MSI anhand der Marker hMLH1 und hMSH2 beschränken, hätte man eine kostengünstige und gut verfügbare Möglichkeit in der Routinediagnostik, die Tumore prognostisch zu klassifizieren und den Nutzen einer Chemotherapie mit 5-FU einzuschätzen (121, 131, 132).

### *Nutzen einer p53 Diagnostik*

Eine Mutation im Tumorsuppressorgen *p53* spielt sowohl eine Rolle bei der Entwicklung eines Kolonkarzinoms auf dem sog. klassischen Weg, der mit einer Mutation auf dem *APC*-Gen beginnt, als auch beim sog. Mischtyp, s. Tabelle 1. In dieser Arbeit wiesen 49,2 % der Fälle eine hohe *p53* Expression auf, die auf eine Mutation hinweist. In der Literatur werden Werte zwischen 34%-65% (133, 134) angegeben. In dieser Arbeit zeigte sich keine Korrelation einer hohen *p53* Expression mit klinischen Parametern. Laut aktueller Studienlage (*The TP53 colorectal cancer international collaborative study*, Russo et al.) ist eine *p53* Expression vergesellschaftet mit einer distalen Lokalisation und höheren Tumorstadien. Möglicherweise tritt eine erhöhte *p53* Expression erst vermehrt in höheren Tumorstadien auf, da es sich um ein späteres Ereignis in der Mutationsfolge der Adenom-Karzinom-Sequenz handelt (135). Eine Auswirkung auf das Gesamtüberleben ließ sich bei alleiniger Analyse von *p53* in den meisten Studien aber nicht erkennen (133, 134). Es gibt allerdings auch Studien, die das Gegenteil postulieren: Liu et al. und Pancione et al. konnten zeigen, dass das Gesamtüberleben nach vollständiger Resektion des Tumors bei erhöhter *p53* Expression geringer ist (136) und das erhöhte *p53* mit einem größerem Risiko für Lebermetastasen und einem geringeren Gesamtüberleben verbunden ist (137). Auch scheinen *p53* exprimierende Karzinome schlechter auf konventionelle Chemotherapeutika anzusprechen (138). Laut Powell et al. spielt der Verlust von intaktem *p53* eine Rolle bei der Entwicklung der Fähigkeit Metastasen auszubilden (139). Auch in unserer Studie war das Auftreten von Metastasen mit erhöhter *p53* Expression korreliert ( $p = 0,022$ ). Anhand dieser unterschiedlichen Ergebnisse wird ersichtlich, wie heterogen die Aussagen bezüglich der Bedeutung einer *p53* Expression sind. Laut McGregor et al., besitzt eine alleinige Analyse der *p53* Expression z. B. weder prognostischen noch prädiktiven Wert (134). Da es sich bei dem Verlust eines funktionsfähigen *p53* aber um nur eines von mehreren aufeinanderfolgenden Ereignissen in der Karzinogenese handelt und es in verschiedenen Karzinogenesewegen eine Rolle spielt, könnte die Möglichkeit bestehen, dass die Analyse dieses Markers allein nicht suffizient genug ist, eine genaue molekular-

pathologische Typisierung des Tumors vorzunehmen (s. Abb.1 und Tabelle 1) und damit prädiktive oder prognostische Aussagen zu treffen. Deshalb wäre es sinnvoll eine p53 Analyse mit einer *KRAS*- oder *BRAF*/MSI-Analyse zu kombinieren (30).

*Bedeutung der Ergebnisse und kritische Betrachtung*

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich statistisch signifikante Unterschiede in der Expression einzelner Biomarker zwischen verschiedenen Metastasierungsmustern finden lassen und damit auf molekularpathologische Unterschiede rückgeschlossen werden kann. Was genau die Ursache dieser Unterschiede ist, bleibt noch zu klären. Es könnte sich bei den Stammzellfaktor-exprimierenden Tumoren um eine Hochrisikogruppe für Fernmetastasierung handeln, während unklar ist, ob es sich bei den Peritonealkarzinose entwickelnden Tumoren um eine eigene Subgruppe mit unterschiedlichen Entstehungsmechanismen und vornehmlich lokal-aggressivem Tumorwachstum handelt (100). Sicher jedoch ist, dass man, auch wenn man die genauen Abläufe der Entwicklung der Tumoren noch nicht kennt, Algorithmen basierend auf die Tumormarker betreffenden Erkenntnissen entwickeln kann, um Risikoeinschätzung und Therapieplanung vorzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass der von Neumann et al. entwickelte Algorithmus zur Unterscheidung der Risikogruppen "Lebermetastase" gegenüber "keine Metastasen" (45), auch auf die sehr seltene Gruppe mit Peritonealkarzinosen anwendbar ist (100). Es muss nun in weiteren Studien versucht werden, nicht nur zwischen Niedrigrisikogruppe ohne Metastasen und Hochrisikogruppe mit Fernmetastasierung zu unterscheiden, sondern zusätzliche Kriterien zu finden, die erlauben die Patientengruppe mit dem Risiko der Entwicklung einer Peritonealkarzinose von der Niedrigrisikogruppe ohne Metastasenentwicklung zu trennen. Möglicherweise könnte hierzu eine *BRAF* Analyse in Verbindung mit einem weiteren Marker in Betracht gezogen werden, diese Theorie benötigt jedoch weitere Untersuchungen. Auch müssen die Ergebnisse bezüglich der Repräsentativität, auch wenn sie teilweise eine hohe Signifikanz zeigen, kritisch betrachtet werden: Es wurde ein retrospektives Fall-Kontroll-Studiendesign verwendet. Um die Ergebnisse zu validieren wäre möglicherweise ein prospektives Studiendesign notwendig. Patienten mit einem kolorektalen Karzinom müssten vor der Entwicklung von Metastasen oder Peritonealkarzinose auf die Expression der Marker getestet und klassifiziert werden, um nach einem vorher festgelegten Follow-up Aussagen über die Richtigkeit der Vorhersagen treffen zu können. Auch handelt es sich bei der Entwicklung

einer Peritonealkarzinose um ein sehr seltenes Ereignis, dementsprechend klein ist die Fallzahl. Erwähnenswert ist aber, dass es sich bei dem untersuchten Kollektiv um ein sehr genau klassifiziertes und spezielles Kollektiv handelt. Es wurde streng selektiert, um eine Verzerrung durch z. B. zufällig eingeschlossene HNPCC-Fälle zu vermeiden, um so eine möglichst hohe Aussagekraft zu erhalten. In Anbetracht der Tatsache, dass sich diese Arbeit auf bereits bestehendes Wissen und wissenschaftlich fundierte Theorien stützt und viele Aussagen vorangegangener Studien bestätigen konnte, kann man die Ergebnisse dieser Arbeit als valide betrachten, es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

### *Ausblick und Anwendung*

Bei allen den der Arbeit zugrunde liegenden Tests handelt es sich um einfache, relativ kostengünstige Methoden, was für den klinischen Alltag sehr bedeutsam ist. Mit der Entwicklung eines einfachen Algorithmus zur Risikoeinschätzung, wäre es theoretisch möglich, frühzeitig durch den Einsatz neoadjuvanter Therapien und radikaler Operationstechniken in das Geschehen einzugreifen. In letzter Zeit besteht das Ziel der Forschung nicht nur darin zielgerichtete Therapien hervor-zubringen, sondern auch darin die Mechanismen aufzudecken, die eine Thera-pieresistenz hervorrufen. Erkenntnisse aus dem molekularpathologischen Be-reich tragen einen Teil dazu bei, solche Therapien zu entwickeln. Auch die in die-ser Arbeit untersuchten Marker sind potentielle Ziele solcher neuen Ansätze: So hat sich eine *KRAS*-Testung in der Routinediagnostik aufgrund der Anti-EGFR-Therapie bereits etabliert. Auch die Resistenz der MSI-Tumore gegenüber einer 5-FU Therapie, welches Teil der Standard-Erstlinientherapie ist, gilt als gesichert, was zu der Überlegung führt, bei der Therapieplanung den MSI/MSS Status zu testen (140). Aktuell erfolgt eine Testung nur bei Verdacht auf ein hereditäres Kolonkarzinom (HNPCC) (56). Das Tumorsuppressorgen *p53* gilt ebenfalls als po-tentieller Ansatzpunkt zielgerichteter Therapie: Es gibt Bestrebungen, in den Signaltransduktionsweg einzugreifen und dadurch den Wildtyp-Status wieder-herzustellen (138) oder die Sensibilität der Zellen für die Chemotherapie zu er-höhen (141). Da Mutationen im *p53*-Gen selten gleichzeitig mit Mutationen von *KRAS* und *BRAF* auftreten, würde eine Kombination mit Aussagen über den *KRAS/BRAF*- Status in Zukunft vielleicht an prädiktivem und prognostischem Wert gewinnen (135).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass eine CD44 Expression Angriffspunkt neuer zielgerichteter Therapien sein könnte. In einem Maus-Experiment konnten Sub-ramaniam et al. das Potenzial dieses Stammzellmarkers zeigen (142), indem sie das Verhalten und das Wachstum von Tumoren unter Veränderungen der CD44 Expression durch Eingreifen von Vektor-Plasmiden und die Reaktion auf Zytosta-tika untersuchten. Die Reaktion auf Chemotherapeutika spielt auch bei dem Stammzellmarker CD133 eine Rolle. Laut einer Übersichtsarbeit von Ren et al. zeigen CD133+ Zellen eine größere Resistenz gegenüber Chemotherapeutika

(143). Eine Analyse der CD133 Expression könnte also nicht nur Hinweise auf das Ausbreitungsmuster, sondern auch bezogen auf das Therapieansprechen geben. Die Entwicklung zielgerichteter Therapien, die auf  $\beta$ -Catenin abzielen steht noch Anfang, es gibt jedoch Studien, in denen sich bereits Erfolge zeigen ließen und mittels Eingriffen in den  $\beta$ -Catenin Signaltransduktionsweg das Tumorwachstum in vitro verringert werden konnte (144). Es ist ein großer Fortschritt Ziele auf molekularer Ebene identifizieren zu können, die möglicherweise als Angriffspunkte der Therapeutika dienen. Stammzellen nehmen hier eine Schlüsselposition ein, da sie laut heutigem Wissenstand eine treibende Kraft im Tumorwachstum sind. Sie selbst zeichnen sich durch asymmetrische Teilung, lange Überlebenszyklen und niedrige Teilungsraten aus. Die meisten Chemotherapeutika wirken jedoch auf Zellen mit hohen Teilungsraten, sodass die Stammzellen der Wirkung entkommen, im Körper verbleiben und zu einem Rezidiv führen können. Anhand der Marker könnte man primär den Tumor bezüglich Ausbreitungsmuster klassifizieren, die Zellen mit Stammzellmarkern identifizieren und gezielt z. B. in die Signaltransduktionswege in die die Stammzellmarker involviert sind eingreifen. Aufgrund der zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten wird deutlich, welches Potential in der Detektierung einzelner Marker steckt. Man muss noch sehr genau evaluieren, welche Marker in der Routinediagnostik wirtschaftlich und bezüglich ihrer Aussagekraft sinnvoll erscheinen. In dieser Arbeit konnten einige potentielle Marker die zweckdienlich wären identifiziert werden. Es gilt nun in folgenden Studien die Ergebnisse an größeren Kollektiven zu bestätigen um einen validen Algorithmus zu etablieren, der die Fragestellung nach Ausbreitungsmuster und eventueller therapeutischer Konsequenzen beantwortet.

### *Zusammenfassung*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass es sich bei dem kolorektalen Karzinom um eine heterogene Gruppe von Tumoren handelt, denen möglicherweise unterschiedliche Karzinogenesewege zugrundeliegen und die sich anhand ihres Ausbreitungsmusters und molekularpathologischer Unterschiede einteilen lassen. So soll ein möglicher Algorithmus entwickelt werden, auf dessen Grundlage man Aussagen über die weitere Ausbreitung treffen kann. Es konnte mit den Tests verdeutlicht werden, dass sich die einzelnen Gruppen untereinander in der Expression der Marker unterscheiden: So war eine *BRAF* Mutation mit vermehrtem Auftreten einer Peritonealkarzinose assoziiert und trat unabhängig von einer *KRAS* Mutation auf. Ein erhöhtes Risiko der Fernmetastasierung bei *KRAS* Mutation konnten wir in dieser Arbeit nicht bestätigen, das könnte aber an der geringen Fallzahl liegen. Zu den sehr heterogenen Aussagen eine *p53* Mutation und deren prognostischen oder prädiktiven Wert, lieferte die vorliegende Arbeit das Ergebnis, dass eine *p53*-Überexpression positiv mit einer Lebermetastasierung korreliert ist, es sind aber noch weitere Studien notwendig um die Mutationsanalyse richtig einzuschätzen. Die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferten die Untersuchungen der Stammzellmarker-Expression: Alle Stammzellmarker zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die höchste Diskriminationsfähigkeit lieferte der zuvor von Neumann et al. entwickelte Algorithmus, der die Stammzellmarker  $\beta$ -Catenin, CD44 und CD133 unter Ausschluss der MMR-Defekt Fälle kombiniert. Neumann et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Erhöhung der Expression dieser Marker mit dem Risiko einer Lebermetastasierung verbunden ist (45). Diese Erkenntnis nutzend wurde der Algorithmus erstmalig auf die seltene Gruppe der Peritonealkarzinosen angewendet (100). So konnte einerseits die Theorie von Neumann et al. bestätigt werden und andererseits gezeigt werden, dass Peritonealkarzinosen entwickelnde Tumore keine oder nur eine sehr geringe Expression von Stammzellmarkern zeigen und ihnen somit vielleicht die Stammzeleigenschaften fehlen, die für die Entwicklung von Fernmetastasen nötig sind. So könnte man die Gruppe der kolorektalen Karzinome die eine Peritonealkarzinose entwickeln eventuell als eigene Subgruppe mit lokal-aggressiven Tumorwachstum klassifizieren (100). Betrachtet man die Ergebnisse

dieser Arbeit gesammelt, konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der kolorektalen Karzinome, die sich durch verschiedene Ausbreitungsmuster unterscheidet, mittels der Expression einzelner Marker und der Analyse verschiedener Genmutationen molekularpathologisch eingeteilt werden kann, was Rückschlüsse auf eventuell unterschiedliche Entstehungsmechanismen zulässt.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. PubMed PMID: 21296855.
2. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Oct 6;96(19):1420-5. PubMed PMID: 15467030.
3. Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland [Internet]. 2007-2008. Available from: [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2012/kid\\_2012\\_c18-21.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/kid_2012_c18-21.pdf?__blob=publicationFile).
4. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer.* 2009 Jul 1;125(1):171-80. PubMed PMID: 19350627.
5. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer.* 2004 Jan 20;108(3):433-42. PubMed PMID: 14648711. Pubmed Central PMCID: 2903217.
6. Riede W, Schäfer. Allgemeine und spezielle Pathologie: Thieme; 2004. 1236 p.
7. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012 Sep;3(3):153-73. PubMed PMID: 22943008. Pubmed Central PMCID: 3418538.
8. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jun;8(6):415-24. PubMed PMID: 18480839.
9. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat.* 1974 Dec;141(4):537-61. PubMed PMID: 4440635.
10. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet.* 2006 May;7(5):349-59. PubMed PMID: 16619050.
11. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32. PubMed PMID: 2841597.
12. de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2011 Feb 15;17(4):647-53. PubMed PMID: 21159886.
13. AJCC. Colon and Rectum Cancer Staging 7th edition. 7 ed.
14. Stanley R, Hamilton LAA. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours  
WHO  
OMS  
International Agency for Research on Cancer (IARC). 2000.
15. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009 Jul;17(1):9-26. PubMed PMID: 19619488. Pubmed Central PMCID: 2861485.

16. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):626-38. PubMed PMID: 16083717.
17. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810. PubMed PMID: 15473860.
18. Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, et al. Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:59-66. PubMed PMID: 19028988.
19. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67. PubMed PMID: 2188735.
20. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):159-70. PubMed PMID: 8861899.
21. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991 Aug 9;66(3):589-600. PubMed PMID: 1651174.
22. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:479-507. PubMed PMID: 21090969.
23. Toribara NW, Sleisenger MH. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1995 Mar 30;332(13):861-7. PubMed PMID: 7870142.
24. Morson B. President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med*. 1974 Jun;67(6 Pt 1):451-7. PubMed PMID: 4853754. Pubmed Central PMCID: 1645739.
25. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2014 Feb;2(1):1-15. PubMed PMID: 24760231. Pubmed Central PMCID: 3920990.
26. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113-30. PubMed PMID: 17204026.
27. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*. 2005 Sep;124(3):380-91. PubMed PMID: 16191506.
28. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jan;27(1):65-81. PubMed PMID: 12502929.
29. Barretton A. Serratierte Läsionen im Kolorektum – ein pathologisches Problem oder ein Problem der Pathologen? *Viszeralmedizin* 2011;27:309–315. 2011.
30. Kirchner T, Reu S. [Development of molecular-pathologic entities of colorectal cancer]. *Pathologe*. 2008 Nov;29 Suppl 2:264-9. PubMed PMID: 18841367. Entwicklung molekularpathologischer Entitäten beim Dickdarmkarzinom.
31. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. PubMed PMID: 11689955.
32. Marotta LL, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. *Current opinion in genetics & development*. 2009 Feb;19(1):44-50. PubMed PMID: 19167210.
33. Boman BM, Wicha MS. Cancer stem cells: a step toward the cure. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2795-9. PubMed PMID: 18539956.

34. Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De Maria R. Colon cancer stem cells. *Journal of molecular medicine*. 2009 Nov;87(11):1097-104. PubMed PMID: 19727638.
35. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10158-63. PubMed PMID: 17548814. Pubmed Central PMCID: 1891215.
36. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*. 1975 May 15;255(5505):197-200. PubMed PMID: 1143315.
37. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7. PubMed PMID: 9212098.
38. Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 27;98(5):2640-5. PubMed PMID: 11226292. Pubmed Central PMCID: 30191.
39. Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulosom R, Jeffery R, Goodlad RA, et al. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer research*. 2003 Jul 1;63(13):3819-25. PubMed PMID: 12839979.
40. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10. PubMed PMID: 17122772.
41. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5. PubMed PMID: 17122771.
42. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*. 1991 Apr 5;65(1):13-24. PubMed PMID: 1707342.
43. Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J, et al. CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 1998 Jun;29(6):627-35. PubMed PMID: 9635685.
44. David Horst SKS, † Sibylle Liebmann, Jens Neumann, Susanne Maatz, Thomas Kirchner, Jung aA. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *Journal of Pathology*. 2009;219:427-34.
45. Neumann J, Horst D, Kriegl L, Maatz S, Engel J, Jung A, et al. A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer. *Histopathology*. 2012 Feb;60(3):416-26. PubMed PMID: 22276605.
46. Lei Du HW, Leya He, et al. CD 44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 2008;14.
47. Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol*. 1997 Apr;50(2):57-71. PubMed PMID: 9231152. Pubmed Central PMCID: 379585.
48. Keleg S, Buchler P, Ludwig R, Buchler MW, Friess H. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2003 Jan 22;2:14. PubMed PMID: 12605717. Pubmed Central PMCID: 149416.
49. Patel LR, Camacho DF, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol*. 2011 Nov;7(11):1285-97. PubMed PMID: 22044203. Pubmed Central PMCID: 3258525.

50. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):274-84. PubMed PMID: 19308067.
51. Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*. 2009 Jan;10(1):72-9. PubMed PMID: 19111247.
52. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006 Aug;12(8):895-904. PubMed PMID: 16892035.
53. Kerscher AG, Chua TC, Gasser M, Maeder U, Kunzmann V, Isbert C, et al. Impact of peritoneal carcinomatosis in the disease history of colorectal cancer management: a longitudinal experience of 2406 patients over two decades. *Br J Cancer*. 2013 Apr 16;108(7):1432-9. PubMed PMID: 23511564. Pubmed Central PMCID: 3629432.
54. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2767-810. PubMed PMID: 24212832. Pubmed Central PMCID: 3757442.
55. Kosmider S, Lipton L. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 28;13(28):3799-805. PubMed PMID: 17657833.
56. S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom [Internet]. 2013. Available from: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/021\\_007OLI\\_S3\\_KRK\\_14062013.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021_007OLI_S3_KRK_14062013.pdf).
57. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Oct;9(10):962-72. PubMed PMID: 18804418.
58. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):489-99. PubMed PMID: 19536109.
59. Fremin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2010;3:8. PubMed PMID: 20149254. Pubmed Central PMCID: 2830959.
60. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*. 1989 Sep 1;49(17):4682-9. PubMed PMID: 2547513.
61. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*. 1998 May 6;90(9):675-84. PubMed PMID: 9586664.
62. Sanford D, Markowitz MD, Ph.D., and Monica M. Bertagnolli, M.D. *Molecular Origins of Cancer*  
*Molecular Basis of Colorectal Cancer*. *N Engl J Med* 2009;361:2449-60. 2009.
63. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):219-29. PubMed PMID: 21125676.
64. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 2009;205(12):858-62. PubMed PMID: 19679400.
65. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer research*. 1990 Dec 1;50(23):7717-22. PubMed PMID: 2253215.

66. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol.* 1995 Apr;13(4):1009-22. PubMed PMID: 7707100.
67. Lamouille S, XJ, Derynck aR. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY.* 2014;15.
68. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):987-91. PubMed PMID: 11956233. Pubmed Central PMCID: 150951.
69. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002 Oct 18;111(2):241-50. PubMed PMID: 12408868.
70. Riccardo Fodde TB. Wnt/b-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology.* 2007;19.
71. Bellacosa LLa. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 30 kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005;24.
72. Zeindl-Eberhart E, Brandl L, Liebmann S, Ormanns S, Scheel SK, Brabletz T, et al. Epithelial-mesenchymal transition induces endoplasmic-reticulum-stress response in human colorectal tumor cells. *PLoS One.* 2014;9(1):e87386. PubMed PMID: 24498091. Pubmed Central PMCID: 3909180.
73. Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, et al. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol.* 2001 Nov;159(5):1613-7. PubMed PMID: 11696421. Pubmed Central PMCID: 1867079.
74. Kirchner T, Brabletz T. Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am J Pathol.* 2000 Oct;157(4):1113-21. PubMed PMID: 11021815. Pubmed Central PMCID: 1850184.
75. Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):307-17. PubMed PMID: 19031475.
76. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):5002-12. PubMed PMID: 9389720.
77. Cho SH, Park YS, Kim HJ, Kim CH, Lim SW, Huh JW, et al. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol.* 2012 Jul;41(1):211-8. PubMed PMID: 22552741.
78. Groger CJ, Grubinger M, Waldhor T, Vierlinger K, Mikulits W. Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression. *PLoS One.* 2012;7(12):e51136. PubMed PMID: 23251436. Pubmed Central PMCID: 3519484.
79. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008 Oct;135(4):1079-99. PubMed PMID: 18773902. Pubmed Central PMCID: 2866182.

80. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol*. 2009 Jul;21(4):369-73. PubMed PMID: 19444104. Pubmed Central PMCID: 3761884.
81. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):988-93. PubMed PMID: 15573120.
82. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, et al. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer research*. 1996 Nov 1;56(21):4836-40. PubMed PMID: 8895729.
83. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):735-40. PubMed PMID: 11257106.
84. Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JW, de Hingh IH. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. *Int J Cancer*. 2011 Jun 1;128(11):2717-25. PubMed PMID: 20715167.
85. Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2012 May;99(5):699-705. PubMed PMID: 22287157.
86. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Apr;39(6):718-27. PubMed PMID: 12651195.
87. Hundt S, Haug U, Brenner H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Oct;16(10):1935-53. PubMed PMID: 17932341.
88. John SK, Robinson SM, Rehman S, Harrison B, Vallance A, French JJ, et al. Prognostic Factors and Survival after Resection of Colorectal Liver Metastasis in the Era of Preoperative Chemotherapy: An 11-Year Single-Centre Study. *Dig Surg*. 2013 Aug 21;30(4-6):293-301. PubMed PMID: 23969407.
89. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012 [Internet]. 2015. Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/).
90. Dr. Peter Kaatsch DCSDK, Kapitel 4), Dr. Stefan Hentschel PDAK, Dr. Sabine Luttmann, Christa Stegmaier , (GEKID K, 1.2, Anhang GEKID), Dr. Sandra Caspritz DJC, Dr. Anke Ernst, Dr. Juliane Folkerts, Dr. Jutta Hansmann, , Dr. Kristine Kranzhöfer DEK-H, Dr. Beatrice Kunz, Dr. Andrea Penzkofer, , Dr. Kornelia Treml DKWKdDK-, et al. Krebs in Deutschland 2009/2010. In: Gesundheit Bf, editor. 2013.
91. Biotage PA, 76 K, Uppsala S-, SWEDEN. PyroMark™Q24 User Manual, 1.02. 2008.
92. GmbH Q, 1 QS, Hilden, Germany. PyroMark Q24 Advanced User Manual. 2013.
93. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer investigation*. 2009 Oct;27(8):844-50. PubMed PMID: 19626493.
94. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih Ie M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol*. 2011 Sep;24(9):1248-53. PubMed PMID: 21552211.

95. Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol.* 1985 Oct;5(10):2851-5. PubMed PMID: 3915536. Pubmed Central PMCID: 367026.
96. Abdelmaksoud-Damak R, Miladi-Abdennadher I, Triki M, Khabir A, Charfi S, Ayadi L, et al. Expression and mutation pattern of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in colorectal cancer patients. *Arch Med Res.* 2015 Jan;46(1):54-62. PubMed PMID: 25660336.
97. Nazemalhosseini Mojarad E, Kashfi SM, Mirtalebi H, Almasi S, Chaleshi V, Kishani Farahani R, et al. Prognostic Significance of Nuclear beta-Catenin Expression in Patients with Colorectal Cancer from Iran. *Iran Red Crescent Med J.* 2015 Jul;17(7):e22324. PubMed PMID: 26421170. Pubmed Central PMCID: 4584109.
98. Yoshida N, Kinugasa T, Ohshima K, Yuge K, Ohchi T, Fujino S, et al. Analysis of Wnt and beta-catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Aug;35(8):4403-10. PubMed PMID: 26168479.
99. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2111-20. PubMed PMID: 18497886. Pubmed Central PMCID: 2391278.
100. Neumann J, Lohrs L, Albertsmeier M, Reu S, Guba M, Werner J, et al. Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer. *Cancer investigation.* 2015 Sep 14;33(8):354-60. PubMed PMID: 26068177.
101. Ichikawa W. Positive relationship between expression of CD44 and hepatic metastases in colorectal cancer. *Pathobiology.* 1994;62(4):172-9. PubMed PMID: 7537507.
102. Visca P, Del Nonno F, Botti C, Marandino F, Sebastiani V, Di Tondo U, et al. Role and prognostic significance of CD44s expression in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002 Sep-Oct;22(5):2671-5. PubMed PMID: 12529980.
103. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract.* 1998;194(10):701-4. PubMed PMID: 9820866.
104. Jung A, Brabletz T, Kirchner T. The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006 (5):109-24. PubMed PMID: 17939298.
105. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6751-60. PubMed PMID: 18980968.
106. Horst D, Kriegl L, Engel J, Jung A, Kirchner T. CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2009 Jul;45(11):2034-40. PubMed PMID: 19403300.
107. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* 2010 Jan;277(2):301-8. PubMed PMID: 19922469.
108. Krasinskas AM. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int.* 2011;2011:932932. PubMed PMID: 21403829. Pubmed Central PMCID: 3042643.
109. Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-

- ras-2 mutation type. *Cancer*. 1993 Jun 15;71(12):3827-38. PubMed PMID: 8508351.
110. Neumann J, Wehweck L, Maatz S, Engel J, Kirchner T, Jung A. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch*. 2013 Oct;463(4):509-23. PubMed PMID: 23934607.
111. Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, Fabas T, Benchimol D, Evrard S, et al. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol*. 2010 May;17(5):1429-34. PubMed PMID: 20049644.
112. Landreau P, Drouillard A, Launoy G, Ortega-Deballon P, Jooste V, Lepage C, et al. Incidence and survival in late liver metastases of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Jan;30(1):82-5. PubMed PMID: 25088563.
113. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003 Apr;24(4):703-10. PubMed PMID: 12727799.
114. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012 Oct 7;18(37):5171-80. PubMed PMID: 23066310. Pubmed Central PMCID: 3468848.
115. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001 Sep 1;85(5):692-6. PubMed PMID: 11531254. Pubmed Central PMCID: 2364126.
116. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel 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 Jan 20;28(3):466-74. PubMed PMID: 20008640.
117. Modest DP, Stintzing S, Laubender RP, Neumann J, Jung A, Giessen C, et al. Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status. *Anticancer Drugs*. 2011 Oct;22(9):913-8. PubMed PMID: 21795973.
118. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):1030-47. PubMed PMID: 20304247.
119. EMA EMA. Erbitux: EPAR- Summary for the public. 2009.
120. Edwards MS, Chadda SD, Zhao Z, Barber BL, Sykes DP. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2012 Feb;14(2):e31-47. PubMed PMID: 21848897. Pubmed Central PMCID: 3562494.
121. Neumann JH, Jung A, Kirchner T. [Molecular pathology of colorectal cancer]. *Pathologe*. 2015 Mar;36(2):137-44. PubMed PMID: 25777075. Molekulare Pathologie des kolorektalen Karzinoms.
122. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatsos G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013;13:49. PubMed PMID: 23374602. Pubmed Central PMCID: 3599697.
123. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS

- randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(10):1466-75. PubMed PMID: 22446022.
124. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2011 Jun;12(6):594-603. PubMed PMID: 21163703.
125. Yang ZY, Wu XY, Huang YF, Di MY, Zheng DY, Chen JZ, et al. Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15;133(8):1914-25. PubMed PMID: 23494461.
126. Clancy C, Burke JP, Kalady MF, Coffey JC. BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013 Dec;15(12):e711-8. PubMed PMID: 24112392.
127. Yokota T. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Feb;12(2):163-71. PubMed PMID: 22043994. Pubmed Central PMCID: 3343383.
128. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 20;23(3):609-18. PubMed PMID: 15659508.
129. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):247-57. PubMed PMID: 12867608. Pubmed Central PMCID: 3584639.
130. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2005 Jan;29(1):96-104. PubMed PMID: 15613860.
131. Stone JG, Robertson D, Houlston RS. Immunohistochemistry for MSH2 and MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2001 Jun;54(6):484-7. PubMed PMID: 11376026. Pubmed Central PMCID: 1731447.
132. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1890-6. PubMed PMID: 19427194.
133. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7518-28. PubMed PMID: 16172461.
134. McGregor MJ, Fadhil W, Wharton R, Yanagisawa Y, Presz M, Pritchard A, et al. Aberrant P53 expression lacks prognostic or predictive significance in colorectal cancer: results from the VICTOR trial. *Anticancer Res*. 2015 Mar;35(3):1641-5. PubMed PMID: 25750322.
135. Calistri D, Rengucci C, Seymour I, Lattuneddu A, Polifemo AM, Monti F, et al. Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. *J Cell Physiol*. 2005 Aug;204(2):484-8. PubMed PMID: 15702478.

136. Liu BW, Liu Y, Liu JR, Feng ZX, Liu T. Prognostic effect of p53 expression in patients with completely resected colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2014 Oct;35(10):9893-6. PubMed PMID: 24993094.
137. Pancione M, Forte N, Campione S, Napolitano A, Parente D, Sabatino L, et al. The high expression of p53 in sporadic colorectal carcinoma is associated with metastasis and decreased survival. *Pathologica.* 2010 Apr;102(2):51-6. PubMed PMID: 23596757.
138. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015 Jan 7;21(1):84-93. PubMed PMID: 25574081. Pubmed Central PMCID: 4284363.
139. Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis. *Cancer Discov.* 2014 Apr;4(4):405-14. PubMed PMID: 24658082. Pubmed Central PMCID: 4063123.
140. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 10;28(20):3219-26. PubMed PMID: 20498393. Pubmed Central PMCID: 2903323.
141. Huang C, Zhang XM, Tavaluc RT, Hart LS, Dicker DT, Wang W, et al. The combination of 5-fluorouracil plus p53 pathway restoration is associated with depletion of p53-deficient or mutant p53-expressing putative colon cancer stem cells. *Cancer Biol Ther.* 2009 Nov;8(22):2186-93. PubMed PMID: 19923910.
142. Subramaniam V, Vincent IR, Gilakjan M, Jothy S. Suppression of human colon cancer tumors in nude mice by siRNA CD44 gene therapy. *Exp Mol Pathol.* 2007 Dec;83(3):332-40. PubMed PMID: 17945212.
143. Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol.* 2013 May 7;19(17):2603-11. PubMed PMID: 23674867. Pubmed Central PMCID: 3645378.
144. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 24;101(34):12682-7. PubMed PMID: 15314234. Pubmed Central PMCID: 515116.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Aa	Arteriae
Abb.	Abbildung
Abd	Aqua Bidest
AJ	Adhaerens Junction
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Adenosin 5´Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert, zweifachdestilliert
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CCD	charge coupled device
CIMP	CpG-Island-Methylation-Phänotyp
CSC	Cancer Stem Cell
dest.	Destilliert
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded tissue
g	Gramm
Grb	Growth factor receptor-binding protein
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
hMLH1	human Mut L homologue 1
hMSH2	human Mut S homologue 2

HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding-Factor
HP	Hyperplastischer Polyp
l	Liter
M	molare Masse, Molmasse
m	Männlich
MCS	Migrating Cancer Stem -(Cell)
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase
MMRD	Mismatch Reparatur Defekt
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatelliten-Stabil
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immundeficiency
Pat.	Patient
PET-CT	Positronenemissionstomographie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPi	Pyrophosphat
rpm	engl., revolutions per minute
s.	Siehe
sog.	sogenannt, sogenannte
Sos	Son of sevenless protein
SSA	sessiles serratiertes Adenom
TA	Transit Amplifying Cell
TCF	T-Cell Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	traditionelles serratiertes Adenom
UICC	Union Internationale contre le Cancer
W	Weiblich
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

## 8.2 Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich bei der Vollendung dieser Arbeit unterstützt haben.

Angefangen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Angele, dem ich diese Arbeit überhaupt verdanke, seinem großen Einsatz und Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank der über alle Maßen netten und kompetenten Einarbeitung und tatkräftigen Unterstützung im Pathologischen Institut der LMU München, dessen Mitarbeiter über alle Ebenen hinweg stets hilfsbereit waren und ohne deren Einsatz ich diese Arbeit nicht hätte bewältigen können.

Ganz besonders hervorheben möchte ich dabei die unschätzbar wertvolle Zusammenarbeit mit meinem Co-Betreuer PD Dr. Dr. Jens Neumann. Ohne dessen unermüdliche Unterstützung und bereitwillige Hilfe bei allen koordinatorischen Schwierigkeiten, technischen und fachlichen Fragen, hätte diese Arbeit nicht gelingen können.

Herr Prof. Dr. Thomas Kirchner danke ich sehr für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Unterstützung dieses Projekts.

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind. Besonders meinem Großvater, der die Entstehung der Arbeit mit größtem Interesse verfolgt und vorangetrieben hat.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihre immerwährende und bedingungslose Unterstützung.

Und Marc, dir gilt mein größter Dank.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Julia Lisa Löhns

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „*Hepatische vs. Peritoneale Metastasierung beim Kolorektalen Karzinom: Identifizierung von Biomarkern im Primärtumor*“ 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, den 04. April 2017