

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

EGFR-Polymorphismen beim kolorektalen Karzinom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Dorothee Maria Gisela Böcker
Hamburg
2013

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Böcker, Dorothee Maria Gisela: **EGFR-Polymorphismen beim kolorektalen Karzinom.**
- 2013. - 82 Blatt. 13 Abb., 10 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat:

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland der zweithäufigste maligne Tumor bei beiden Geschlechtern. Die Rolle von EGFR in seiner Karzinogenese ist in der Vergangenheit gut beschrieben und hat zur Entwicklung von neuen Medikamenten geführt, die spezifisch den EGF-Rezeptor inhibieren.

Vier Polymorphismen, die im Bereich des EGFR-Gens auftreten, wurden Auswirkungen auf die Expression des Genprodukts und damit auf Verlauf und Prognose des kolorektalen Karzinoms zugeschrieben. Dabei handelt es sich um zwei Einzelbasenaustausche im Promotorbereich an den Positionen -216 und -191, einen G/A-Austausch an Position 497 und die Anzahl der CA-Repeats in Intron 1. In der Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen diesen Polymorphismen und EGFR Expression, sichtbar gemacht durch Immunhistochemie, sowie klinisch-pathologischen Daten an 177 Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen keine Assoziation der Promotor-Polymorphismen mit EGFR-Expression oder klinisch-pathologischen Daten. Der Polymorphismus an Stelle 497 hatte einen nicht signifikanten positiven Einfluss auf das Überleben ($p=0,124$), war aber dabei auch mit höherem T, N, M assoziiert. Diese Veränderungen waren bei männlichen Patienten ausgeprägter als bei weiblichen. Die EGFR-Expression blieb von dieser genetischen Variante unberührt. Die CA-Repeats zeigten einen Trend zu niedrigerer EGFR-Expression bei längeren Repeatzahlen, dies bestätigt sich unabhängig von der Art der Gruppierung. Das Überleben war von längeren Repeats positiv beeinflusst, der Zusammenhang aber statistisch nicht signifikant ($p=0,434$).

Studien mit einem umfangreicheren Patientenkollektiv sind vonnöten um die Relevanz der Polymorphismen zu belegen.

Schlüsselwörter:

EGFR, Polymorphismus, kolorektales Karzinom, CA-Repeat, G497A, G-216T, C-191A

Inhaltsverzeichnis

1.Einführung	7
1.1. Kolorektales Karzinom	7
1.1.1. Epidemiologie	7
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren	7
1.1.2.1. Umweltfaktoren	7
1.1.2.2. Sporadische Kolorektale Karzinome.....	7
1.1.2.3. Hereditäre kolorektale Karzinome	8
1.1.2.4. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	9
1.1.3. Genetik und Epigenetik.....	9
1.1.4. Diagnostik, Klinik, Prophylaxe.....	9
1.1.5. Pathohistologische Begutachtung	10
1.1.5.1. Lokalisation	11
1.1.5.2. Makroskopische Pathologie	11
1.1.5.3. Histopathologie.....	11
1.1.5.4. Tumorausdehnung und Staging	12
1.1.6. Therapie	12
1.1.7. Prognose	13
1.2. Epidermal Growth Factor Receptor	13
1.2.1. Signalkaskade	13
1.2.2. Funktion, Physiologie und Pathophysiologie.....	15
1.2.3. Prognostischer Stellenwert beim CRC	16
1.3. EGFR Polymorphismen	16
1.3.1. Polymorphismen im Promotorbereich.....	16
1.3.2. G/A Austausch an Position 497	17
1.3.3. CA-Repeats in Intron 1	17
1.4. Rezeptorspezifische Therapie des Kolonkarzinoms	18
2. Patienten und Methoden	21
2.1. Patienten und Material	21
2.1.1. Untersuchungsmaterial	21
2.1.2. Patientencharakteristika	22
2.1.3. Tumorcharakteristika.....	22
2.1.3.1. Lokalisation	22
2.1.3.2. Tumorklassifikation	22

2.1.3.3. Histologie und Grading.....	22
2.2. Molekulargenetische Analysen	23
2.2.1. DNA Präparation aus Frischgewebe	23
2.2.2. Polymerase Kettenreaktion	24
2.2.3. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP).....	24
2.2.4. Fragmentanalyse.....	25
2.2.5. Auswertung.....	27
2.3. Immunhistologische Analysen	28
2.3.1. Tissue Microarray.....	28
2.3.2. Immunhistochemische Reaktionen	28
2.3.3. Auswertung.....	29
2.4. Statistik	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Patienten	31
3.2. Immunhistochemische Analysen	33
3.2.a. EGFR-Expression	33
3.2.b. Korrelation von EGFR-Expression mit Klinik und Überleben	35
3.3. Molekulargenetische Analyse	37
3.3.1. Polymorphismen im Promotorbereich.....	37
3.3.1.a. Promotorpolymorphismen Häufigkeiten	37
3.3.1.b. Korrelation von Promotorpolymorphismen und EGFR-Expression	38
3.3.1.c. Korrelation von Promotorpolymorphismen und klinisch-pathologischen Daten	39
3.3.2. G/A Austausch an Position 497	42
3.3.2.a. Häufigkeiten	42
3.3.2.b. Korrelation des 497-Polymorphismus und EGFR-Expression.....	42
3.3.2.c. Korrelation des 497-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Daten	42
3.3.3. CA-Repeats in Intron 1	46
3.3.3.a. CA-Repeats Häufigkeiten und Gruppierung	46
3.3.3.b. Korrelation von CA-Repeats und EGFR-Expression	47
3.3.3.c. Korrelation von CA-Repeats und klinisch-pathologischen Daten.....	48
4. Diskussion	53
4.1. Patienten	53
4.2. Immunhistochemie	53

4.3. Genetik	56
4.3.1. Polymorphismen im Promotorbereich.....	57
4.3.2. G/A Austausch an Position 497	59
4.3.3. CA Repeats in Intron 1	60
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Erklärung	78
8. Danksagung	79
9. Curriculum vitae.....	80
10. Anhang	81

Abkürzungsverzeichnis

ACF	Aberrant crypt foci, aberrante Krypten Foci
Bp	Basenpaare
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRC	Kolorektales Karzinom
CU	Colitis ulcerosa
DCC	Deleted in Colorectal Cancer Gen
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dist	distal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis Coli
FOBT	Fecal Occult Blood Test
Ges.	gesamt
IRS	Immunoreaktiver Score
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor vom Typ 2
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region
Lok	Lokalisation
M	Metastasierungsstadium nach TNM-Klassifikation
MAbs	Monoclonal Antibodies, monoklonale Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mges.	Gesamtmetastasierung, d.h. Metastasen zum Diagnosezeitpunkt und Spätmetastasierung
N	Lymphknotenstadium nach TNM-Klassifikation
NSCLC	Non-small-cell-lung-cancer, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OS	Overall survival, Gesamtüberleben
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFS	Progression Free Survival, progressionsfreies Überleben
Prox	proximal
Rez.	Rezidiv
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
Sp1	Specificity Protein 1
T	Tumorstadium nach TNM Klassifikation
Taq	Thermophilus aquaticus
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitoren
TMA	Tissue Microarray
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UICC	Union internacional contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wdh	wiederholen

1.Einführung

1.1. Kolorektales Karzinom

Die Bezeichnung kolorektales Karzinom (CRC) umfasst die bösartigen Epithelneoplasien des Kolons (ICD10 C-18), des rektosigmoidalen Übergangs (ICD 10 C-19) und des Rektums (ICD 10 C-20). Diese Zusammenfassung ist insofern gerechtfertigt, als diese Karzinome morphologisch und pathogenetisch eng verwandt sind.

1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste maligne Erkrankung und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache¹. Dabei hat die Inzidenz in den letzten 30 Jahren um 26% (Frauen) bzw. 34% (Männer) zugenommen². 2012 sollten laut Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten 38.300 Männer und 31.100 Frauen in Deutschland neu erkranken. Obwohl die Mortalität dank besserer Diagnostik und Therapie abgenommen hat, starben 2008 13.726 Männer und 12.936 Frauen an Darmkrebs. Damit ist das kolorektale Karzinom für rund 14,3% (Männer) bzw. 13,5% (Frauen) aller Krebsneuerkrankungen und 11,8% (Männer) 13,0% (Frauen) aller krebsbedingten Todesfälle in Deutschland verantwortlich¹.

Global gesehen ist die Inzidenz in den Industrienationen wesentlich höher als in den sogenannten Entwicklungsländern³.

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

1.1.2.1. Umweltfaktoren

Exogene Risikofaktoren für die Erkrankung an einem CRC sind ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung, Rauchen, Übergewicht und regelmäßiger Alkoholkonsum. Protektiv wirken dagegen regelmäßige körperliche Aktivität und eine Ernährungsweise, die reich an Ballaststoffen, Gemüse, Obst, Folsäure⁴, und Kalzium ist^{1,5}. Die Bedeutung der Lebensstil-Komponente wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass Migranten das Risiko ihres neuen Lebensplatzes annehmen⁶.

1.1.2.2. Sporadische Kolorektale Karzinome

Das kolorektale Karzinom entwickelt sich in über 90% der Fälle in aus einem Adenom. Dieser Zusammenhang wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet⁷. Als früheste

morphologisch fassbare Vorstufe gelten die aberranten Crypt Foci (ACF). Sie zeigen bereits Tumor-assoziierte Genexpressionsalterationen. Am Anfang führt eine somatische Mutation in einer Drüsenzelle der kolorektalen Schleimhaut zu einer den Bedarf übersteigenden Proliferation. Zu den frühesten genetischen Veränderungen gehören Mutationen im APC-Gen⁸. Die Folge ist eine zunächst gutartige Gewebezunahme. Makroskopisch sichtbare Polypen mit zellulären Atypien bezeichnet man als Adenome. Es gibt einerseits klassische Adenome und andererseits serratierte Läsionen, die hyperplastische Polypen, sessile serratierte Adenome, gemischte Polypen und traditionelle serratierte Adenome umfassen. Bei den klassischen Adenomen unterscheidet man drei histologische Wachstumstypen: tubuläre Adenome sind mit 60-65% die häufigste Form, gefolgt von tubulovillösen mit 20-26%, 5-11% villösen Adenomen. Sie sind fakultative Präkanzerosen. Im Verlauf ihrer neoplastischen Transformation kommt es zur Kumulation genetischer Veränderungen. Wichtige Mutationen betreffen dabei z.B. das TP-53-Gen, KRAS, DCC aber auch das EGFR-Gen⁹. Die Adenome schreiten von low grade zur high grade intraepithelialen Neoplasie (ehemals Dysplasie) fort, bis durch das unkontrollierte Wachstum die Basalmembran durchbrochen wird und die Läsion damit die Prämisse eines Karzinoms erfüllt. Die Entartungstendenz ist abhängig von Größe, Grad der Dysplasie und Typ des Adenoms, wobei villöse Adenome die höchste Entartungstendenz haben.

Die Familienanamnese spielt beim sporadischen kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle: Ein Verwandter ersten Grades eines sporadischen CRC-Patienten hat ein zwei- bis dreifach höheres Risiko, selbst einen malignen Darmtumor zu entwickeln. Trat der Tumor bei dem Verwandten vor dem 50. Lebensjahr auf, erhöht das Risiko noch zusätzlich. Grundsätzlich sollte bei den betroffenen Angehörigen rechtzeitig, das heißt 10 Jahre bevor sie das Erkrankungsalter des Indexpatienten erreichen, eine komplette Koloskopie durchgeführt werden⁵.

1.1.2.3. Hereditäre kolorektale Karzinome

Verhältnismäßig wenige Fälle (weniger als 5%⁵) sind auf Erbkrankheiten, wie z.B. das hereditäre kolorektale Karzinom (HNPCC, Hereditary Non-Polyposis colorectal cancer), die Familiäre Adenomatosis Polyposis Coli (FAP) oder das Peutz-Jeghers-Syndrom zurückzuführen.

Das HNPCC-Syndrom beruht auf einem Keimbahndefekt der DNA-Mismatch-Repair-Gene, z.B. MSH2, MLH1, MSH6 und PMS2. 1-5% der CRCs entstehen auf dem Boden eines HNPCC.

Etwa 1% der CRCs treten im Rahmen einer Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli auf. Die FAP entsteht aufgrund einer Keimbahnmutation in dem Tumorsuppressorgen APC.

Hamartöse Polyposis Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die Juvenile Polyposis Coli und das Cowden-Syndrom sind mit einer Inzidenz von ca. 1: 100 000 sehr selten. Ihr Anteil an allen CRCs beträgt weniger als ein Promille.

1.1.2.4. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Menschen, die an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden, erkranken ebenfalls häufiger am CRC. Dieser Risikozuwachs ist insbesondere für die Colitis ulcerosa belegt und erhöht sich mit Erkrankungsdauer und –ausdehnung. Man geht bei einer Pankolitis ulcerosa von einem kumulativen Karzinomrisiko von 2% nach 10 Jahren aus^{5,10}.

1.1.3. Genetik und Epigenetik

Es gibt genetisch gesehen zwei große Entitäten beim CRC:

Eine Variante ist der in der Adenom-Karzinom-Sequenz beschriebene⁷ und mit 85% weitaus häufigere Weg. Mutationen von APC, KRAS, DCC und TP53 führen zur sogenannten **chromosomalen Instabilität**. Es entstehen chromosomale Aberrationen, wie z.B. allelische Verluste, Amplifikationen, Dislokationen, Translokationen, Deletionen, Insertationen und Aneuploidie.

15% der Tumoren beruhen auf einem anderen genetischen Mechanismus. Durch Funktionsverluste des DNA-mismatch-repair-Systems kommt es zu Längenpolymorphismen v.a. im Bereich der hochrepetitiven Mikrosatelliten-DNA. Man bezeichnet dies als **Mikrosatelliteninstabilität** oder high frequency microsatellite instability (MSI-H, MIN)⁹. Sie kann epigenetisch, z.B. bei Expressionsverlust durch Promotorhypermethylierung oder genetisch bedingt sein, wie es z.B. bei der HNPCC der Fall ist.

1.1.4. Diagnostik, Klinik, Prophylaxe

Zur **Prophylaxe** ist vor allem eine Vermeidung der o.g. Risikofaktoren sinnvoll. Eine ausgewogene, ballaststoffreiche und fleischarme Ernährungsweise und körperliche Aktivität stehen im Mittelpunkt.

In Deutschland existiert ein **Screening**-Programm. Es besteht bei beiden Geschlechtern ab dem 50. Lebensjahr aus einem Schnelltest auf okkultes Blut im Stuhl (Fecal Occult Blood Test, FOBT) und digital rektaler Untersuchung. Ab dem 55. Lebensjahr ist zusätzlich eine

Koloskopie möglich. Sie ist der Goldstandard in der CRC-Diagnostik und hat die höchste Sensitivität und Spezifität. Außerdem hat sie den Vorteil, dass entdeckte Adenome sofort therapiert werden können. Sämtliche entfernte Polypen müssen histologisch aufgearbeitet werden. Werden Adenome gefunden, ist eine endoskopische Nachsorge nach drei bzw. fünf Jahren, je nach Größe und Histologie der Adenome, indiziert. Bei unauffälligem Befund sollte die Koloskopie alle zehn Jahre wiederholt werden. Wird eine Koloskopie abgelehnt, kann alternativ eine Sigmoidoskopie durchgeführt werden, die jedoch weniger sensitiv ist. Lehnt der Patient alle endoskopischen Screeningmaßnahmen ab, kann alle zwei Jahre ein FOBT durchgeführt werden¹. Bei den o.g. monogenen Syndromen und bei Colitis ulcerosa gelten gesonderte Screeningempfehlungen⁵.

Zur **Diagnostik** sollte bei suspekten Befunden eine komplette Koloskopie mit Biopsien erfolgen. Zusätzlich kann die Chromoendoskopie hilfreich sein, um flache Läsionen besser zu beurteilen, z.B. bei HNPCC und CED. Ist die Koloskopie beispielsweise aufgrund von Stenosen nicht durchführbar, sollte eine CT oder MR-Kolonographie erfolgen. Die Röntgendoppelkontrastuntersuchung ist den anderen Methoden unterlegen und heute obsolet⁵.

Die **Klinik** des kolorektalen Karzinoms ist anfangs subtil. Es macht typischerweise erst bei relativ fortgeschrittener Erkrankung auf sich aufmerksam. Frühsymptome können Hämatochezie und veränderte Stuhlgewohnheiten sein. Verdächtig sind sowohl ungewohnte Diarrhoe als auch eine neu aufgetretene Obstipation, auch im Wechsel. Eine Eisenmangelanämie weist auf länger dauernde okkulte Blutungen hin. Spät treten Gewichtsverlust und Darmverschlüsse aufgrund von durch Tumormasse verlegtem Darmlumen auf. Selten kann es bei einem Durchbruch des Tumors durch die Serosa zu einer sterkoralen Peritonitis kommen.

Das CRC metastasiert lymphogen in die perikolischen und perirektalen Lymphknoten und hämatogen nach dem Pfortadertyp, d.h. zunächst in die Leber und später die Lunge.

1.1.5. Pathohistologische Begutachtung

In der postoperativen pathologischen Untersuchung wird der Tumor makroskopisch und histologisch beurteilt. Es werden Ausdehnung und Wandinfiltration (T), Anzahl und Befall der entnommenen Lymphknoten (N), histologischer Differenzierungsgrad (Grading), Abstand von Resektionsrändern und R-Klassifikation angegeben.

1.1.5.1. Lokalisation

Kolorektale Karzinome sind bösartige Neubildungen der Schleimhaut in Kolon und Rektum.

Kolonkarzinome werden eingeteilt in proximale und distale Karzinome, bezogen auf ihre Lage zur Flexura lienalis. 30% der Tumoren finden sich oral der Flexura lienalis, 70% aboral¹¹.

Als Rektumkarzinom definiert sind maligne Tumoren, die mit dem starren Rektoskop gemessen 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt sind. Die UICC untergliedert weiter in Rektumkarzinome des oberen Rektumdrittels (12-16 cm), des mittleren Rektumdrittels (6-12 cm) und des unteren Rektumdrittels (<6 cm von der Anokutanlinie). Diese Unterteilung hat Implikationen für Therapie und Prognose.

1.1.5.2. Makroskopische Pathologie

Es müssen Tumorgöße, Tumorlokalisierung und makroskopische Infiltrationstiefe, sowie der Abstand zum Resektionsrand angegeben werden. Auch die mitentfernten Anhangsgewebe werden beurteilt.

Makroskopisch unterscheidet man polypoides oder exophytisches, ulzerierendes oder endophytisches und diffus-infiltrierendes Wachstum. Oft treten Mischformen auf.

Kolorektale Karzinome wachsen zirkumferentiell entlang der Lymphgefäße und metastasieren auch lymphogen. Die regionären Lymphknoten finden sich entlang der Gefäßversorgung bis zu 10 cm entfernt.

1.1.5.3. Histopathologie

Histologisch handelt es sich in den allermeisten Fällen (85%) um Adenokarzinome. Als muzinöse Karzinome werden solche bezeichnet, bei denen mehr als 50% der Schnittfläche aus extrazellulärem Schleim bestehen. Bei Siegelringzellkarzinomen besteht mehr als 50% der Schnittfläche aus Zellen mit intrazellulärem Schleim. Seltener findet man adenosquamöse, kleinzellige, medulläre, anaplastische und Plattenepithel-Karzinome.

Man unterteilt nach Ausmaß der Drüsenbildung in hoch differenzierte, mäßig differenzierte, niedrig differenzierte und undifferenzierte Karzinome (Grading G1 bis G4).

Die R-Kategorie gibt die Vollständigkeit der Resektion an. R0 bedeutet mikroskopisch im Gesunden entfernt, R1 entspricht mikroskopisch Tumorbefall der Resektatränder, R2

impliziert eine bereits makroskopisch erkennbare Unvollständigkeit der Exzision wie beispielsweise beim Vorhandensein von Fernmetastasen.

1.1.5.4. Tumorausdehnung und Staging

Zum präoperativen Staging beim CRC gehören obligat: DRU, komplette Koloskopie mit Biopsien, Abdomensonographie, Röntgenuntersuchung des Thorax in 2 Ebenen und Bestimmung des Tumormarkers CEA. Zusätzlich können eine Spiral-CT oder MRT des Abdomens oder eine Spiral-CT des Thorax sinnvoll sein⁵.

Beim Rektumkarzinom kommen zu den o.g. obligaten Staging-Bestandteilen eine starre Rektoskopie und eine Endosonographie hinzu. Im Einzelfall können eine Becken-CT oder MRT, eine Sphinktermanometrie eine Zystoskopie oder eine gynäkologische Untersuchung zusätzliche Informationen bringen⁵.

Die TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung erfolgt nach UICC. Aktuell ist bereits die TNM Klassifikation von 2010 im klinischen Einsatz¹². Zum Zeitpunkt der Datenerhebung galt aber noch die Klassifikation von 2002¹³. Alle Stadienangaben des untersuchten Kollektivs sind nach TNM von 2002 klassifiziert. Die detaillierte UICC Stadieneinteilung findet sich im Anhang.

1.1.6. Therapie

Der einzige kurative Therapieansatz besteht im Anstreben einer R0-Resektion. Nur bei T1 Tumoren mit low risk Situation (G1 oder G2, keine Lymphgefäßinvasion) ist eine endoskopische Therapie ausreichend. Ab T1 high risk (G3 oder G4 und/oder Lymphgefäßeinbrüche) wird eine radikale chirurgische Behandlung notwendig. Dabei muss das betroffene Darmsegment inklusive der versorgenden Gefäße, der Lymphabflussgebiete und des großen Netzes im Tumorbereich reseziert werden. Am Tumorrand ist grundsätzlich ein Sicherheitsabstand von 2 cm ausreichend, entlang der Lymphgefäßstationen empfiehlt sich ein Abstand von 10 cm vom Tumorrand aus⁵. Die UICC und andere Expertengruppen fordern die Entfernung von mindestens 12 Lymphknoten für die korrekte Determinierung der N-Kategorie⁵. Je mehr Lymphknoten entfernt werden, desto länger überleben die Betroffenen¹⁴⁻¹⁶. Bei wandüberschreitendem Wachstum wird eine En-bloc Resektion aller adhärennten Nachbarorgane empfohlen. Schnellschnitte von Adhärenzen sind zu vermeiden, da das Risiko der Tumoraussaat zu groß ist. Diese wiederum verkürzt das Überleben signifikant¹⁷. Beim Rektumkarzinom ist die partielle oder totale Entfernung des Mesorektums indiziert. Auch hier gilt der Grundsatz, adhärennte Organe en bloc zu resezieren.

Bei Stadium pT1-Tumoren, die im Gesunden entfernt wurden, besteht lediglich Nachsorgebedarf. Eine adjuvante Chemotherapie ist nicht sinnvoll. Ab Stadium II ist sie vorzugsweise in kontrollierten Studien möglich, ihr Nutzen ist aber nicht eindeutig bewiesen¹⁸. Im Stadium III wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen, soweit keine Kontraindikationen vorliegen. Eine signifikante Prognoseverbesserung ist in dieser Konstellation eindeutig erwiesen¹⁹. Effektive Protokolle beinhalten v.a. Oxaliplatin und 5-Fluorouracil (5-FU)²⁰. Bei Vorliegen von systemischen Metastasen (Stadium IV) lassen sich keine allgemeingültigen Empfehlungen abgeben. Bei Möglichkeit einer R0 Resektion der Metastasen sollte diese versucht werden⁵. Chemotherapieprotokolle, die in Frage kommen, beinhalten z.B. 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan,²¹ Capecitabin, Bevacizumab und Cetuximab²².

Beim Rektumkarzinom kommt ab Stadium T1 mit high risk-Charakteristiken (G3 oder 4 oder Lymphgefäßinvasion) auch Strahlentherapie zum Einsatz. In Stadium II und III sind neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie immer indiziert⁵.

1.1.7. Prognose

Die Prognose des CRC hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Trotz steigender Inzidenz ist die Mortalität abnehmend. Das relative 5-Jahres-Überleben beträgt in Deutschland für Männer 63%, für Frauen 62%. In Finnland und den USA liegt es bei 60-63%, bzw. 65%^{1,23}. Die Prognose ist in Einzelfall abhängig von Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Grading¹⁹, sowie dem Resektionsgrad.

1.2. Epidermal Growth Factor Receptor

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) oder ErbB1 ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Familie ErbB. Sein Gen ist 110kb lang und besteht aus 26 Exons²⁴. Die Kristallstruktur wurde 2002 entschlüsselt^{25,26}. Andere Mitglieder der Familie sind das ErbB2-Produkt HER2/neu, ErbB3 und ErbB4. Sie alle gehören strukturell der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen an. Diese sind durch ihren dreiteiligen Aufbau charakterisiert: Der extrazelluläre Anteil beinhaltet die Ligandenbindungsstelle. Ein lipophiler Anteil durchspannt die Plasmamembran. Der intrazelluläre Part enthält die Tyrosinkinasedomäne und gewährleistet die Weiterleitung des Signals durch Interaktion mit second messenger Proteinen.

1.2.1. Signalkaskade

Namensgebender Ligand des EGFR ist der Epidermal Growth Factor, ein Polypeptid von 6kDa bzw. 53 Aminosäuren. Aber auch andere Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF α ,

Amphiregulin und Neuregulin²⁷ können den Rezeptor aktivieren. Sie alle haben die EGF-like-Domain gemeinsam, die aus drei intramolekularen Schleifen mit Disulfidbrücken besteht²⁸. Dockt ein Ligand an die extrazelluläre Bindungsstelle an, resultiert eine Konformationsänderung des Rezeptors und die Tyrosinkinase wird freigelegt. Der Rezeptor dimerisiert zu einem Homodimer mit einem zweiten aktivierten EGFR oder auch zu einem Heterodimer mit einem anderen Mitglied der ErbB-Familie. Die Interaktion kommt durch Beta-Haarnadel-Arme zustande, die aus den Konformations-veränderten Molekülen protrudieren^{25,26}. Dies erhöht die Aktivität der intramolekularen Tyrosinkinase und die beiden Partner phosphorylieren sich gegenseitig^{29,30}. An die so aktivierten Phosphotyrosin-Stellen können sich abhängig von Ligand und Dimerisationspartner verschiedene Adapterproteine mit ihren SH2-Stellen anlagern³¹⁻³³.

Der bevorzugte Heterodimerisationspartner ist ErbB2 alias Her2/neu^{32,34,35}. Das liegt daran, dass er bereits in einer Konformation vorliegt, die die Dimerisierung erleichtert^{36,37}. ErbB-2 bindet selbst keinen Liganden^{34,38}, verstärkt aber im Heterodimer die Wirkung der andere Rezeptoren durch verschiedene Mechanismen und potenziert so das Signal^{35,38}.

Die wichtigsten Signalwege sind Ras-MAPK, PI3K-PKB/Akt und PLC-PKC³⁹⁻⁴⁴. Sie sind in Abbildung 1 dargestellt.

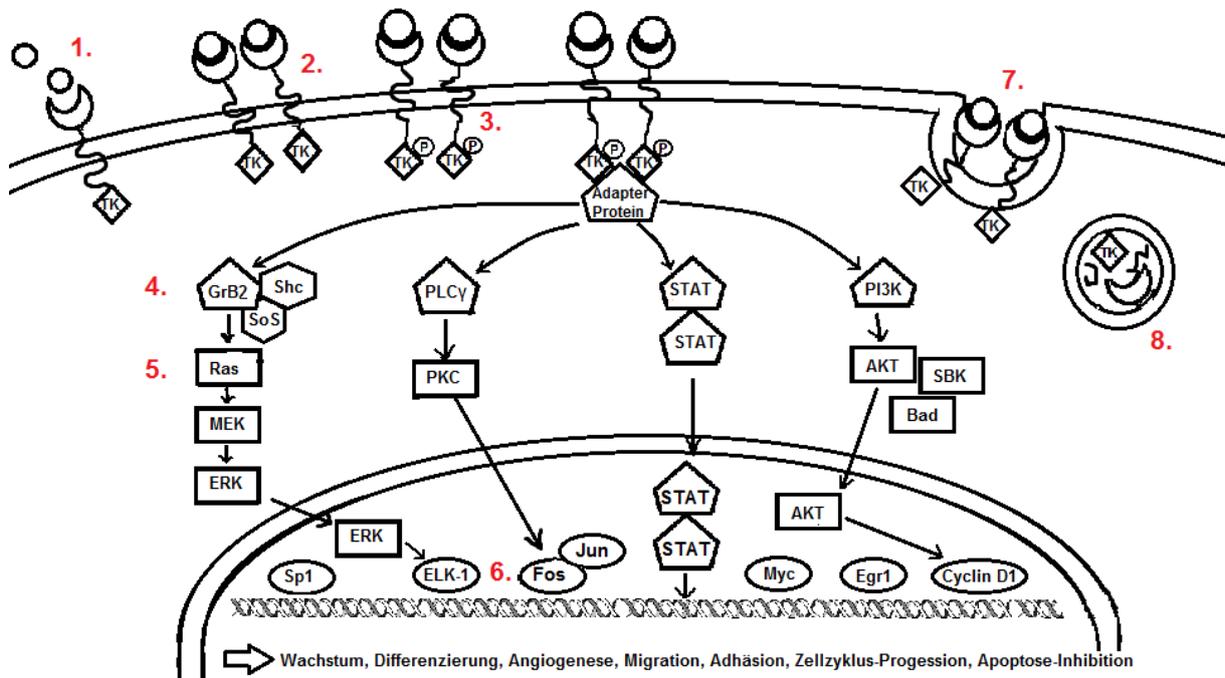


Abbildung 1 - EGFR Signaltransduktion, modifiziert nach^{39,40,45} - 1. Ligandenbindung, 2. Dimerisierung, 3. Autophosphorylierung, 4. Anlagerung von Adapterproteinen, 5. Signalkaskade, 6. Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, 7. Rezeptorendozytose, 8. Lysosomaler Abbau.

Am Ende der Kaskaden stehen vor allem Eingriffe in die Transkription im Zellkern. Über die Aktivierung von entsprechenden Transkriptionsfaktoren wird die Zelle zu Wachstum und Teilung angeregt. Die Pfade führen zu einem Fortschreiten im Zellzyklus und damit ultimativ zu Zellüberleben und Vermehrung^{39,40}.

Die physiologische Beendigung des Signals wird durch Rezeptorendozytose erreicht⁴⁶. Was in der Zelle mit dem endozytierten Rezeptor passiert, ist abhängig vom Rezeptortyp⁴⁷, dem Dimerisationspartner und auch vom Liganden. EGF-bindendes EGFR wird primär ubiquitiniert und dann im Lysosom degradiert^{48,49}. Andere ErbBs werden recycelt^{34,50}. Aber auch EGFR kann durch den Einfluss anderer Liganden, wie z.B. TGF-Alpha und NDF, dem lysosomalen Abbau entgehen⁵⁰. Auch ErbB2-EGFR Heterodimere werden recycelt, kehren so an die Zelloberfläche zurück und stehen wieder zur Aktivierung zur Verfügung^{47,51}. Heterodimerisierung ermöglicht so ein stärkeres Signal als Homodimere⁵¹.

1.2.2. Funktion, Physiologie und Pathophysiologie

Physiologisch spielt EGFR eine wichtige Rolle für **Wachstum und Entwicklung** und ermöglichen das Überleben von Zellen^{52,53}. EGFR-Knock-out Mäuse sterben perinatal ab⁵⁴. Sie zeigen gestörte Epithelialisierung verschiedener Organe, z.B. der Haut, der Lungen und des Gastrointestinaltraktes⁵⁵ und entwickeln postnatal eine progressive Neurodegeneration⁵⁶. Es kann gefolgert werden, dass EGFR eine zentrale Rolle für die Entwicklung von Epithelien sowie für das Überleben von Neuronen spielt. Beim Erwachsenen wird der ErbB1 oder EGFR z.B. in der Epidermis exprimiert⁵⁷ und regt diese und andere Epithelien zum Wachstum an.

Wird diese physiologische Wirkung übermäßig aktiviert, resultiert eine überschießende Proliferation, die zu **maligner Entartung** führen kann. EGFR ist bei vielen Karzinomen dysreguliert und trägt durch pathologische Aktivität zur Karzinogenese bei^{39,40}. EGFR-Genamplifikation spielt eine Rolle bei verschiedenen Hirntumoren (Oligodendrogliom⁵⁸, Glioblastom⁵⁹, kindlichen Gliome⁶⁰). EGFR-Überexpression wurde z.B. beim Plattenzellkarzinom in der Kopf-Hals-Region (HNSCC)^{61,62}, beim Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC)⁶³, primären aber nicht sekundären Glioblastomen^{64,65}, Mamma-Karzinom⁶⁶, Cervix-Karzinom⁶⁷⁻⁶⁹, Blasenkarzinom⁷⁰⁻⁷², Wilmstumor⁷³ und Osteosarkom⁷⁴ beschrieben und ist in der Regel mit schlechterer Prognose assoziiert^{72,75-81}. Auch beim Adenokarzinom des Magens ist eine Überexpression häufig und mit fortgeschrittenem Stadium und kürzerem Überleben assoziiert⁸².

1.2.3. Prognostischer Stellenwert beim CRC

Beim kolorektalen Karzinom kommt eine Überexpression von EGFR in 50-80% der Fälle vor und ist damit häufig⁸³⁻⁸⁶. Sie ist unabhängig von morphologischen Faktoren, Alter und Geschlecht⁸⁷. Interessanterweise zeigen bereits hyperproliferative aberrante Crypt Foci, die als die frühesten Stufen der Adenom-Karzinom-Sequenz gelten, eine erhöhte mRNA von EGFR und den Signalkomponenten⁸⁸.

Die Überlebenszeit bei EGFR-Überexpression ist verkürzt⁸⁹⁻⁹². EGFR Level sind mit höherem UICC-Stadium⁹³⁻⁹⁵ assoziiert, und EGFR-positive Tumoren zeigen ein aggressiveres Invasionsverhalten und metastasieren früher^{94,96}.

Überexpression ist in einigen Studien außerdem mit schlechtem Ansprechen auf Radiotherapie assoziiert^{84,89}.

Was die Übereinstimmung in Bezug auf EGFR-Expression von Tumor und Fernmetastasen angeht, so kommen die Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während in einigen Studien die EGFR-Aktivitäten von Primär- und Sekundärtumor ähnlich ausfallen, kommen bei anderen größere Diskrepanzen zum Vorschein. Die beschriebenen Übereinstimmungsraten liegen zwischen 40 und 93,7%^{83,85,97}.

1.3. EGFR Polymorphismen

Ein Polymorphismus ist eine genetische Variation. In Abgrenzung zu einer Mutation tritt ein Polymorphismus in einer Bevölkerung mit einer Häufigkeit >1% auf. Definitionsgemäß hat er keinen Einfluss auf die Funktion des Genprodukts.

Im EGFR-Gen waren zu Beginn unserer Untersuchungen vier Polymorphismen wegen potentieller Auswirkungen auf Funktion und Prognose von Interesse. Sie werden unabhängig voneinander vererbt^{98,99}.

1.3.1. Polymorphismen im Promotorbereich

Im Promotorbereich finden sich an den Stellen -216 und -191 jeweils Einzelbasenaustausche.

An der Position -216 befindet sich eine Erkennungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1, der besonders für Epithelzellen wichtig ist¹⁰⁰. Das Wildtyp-Allel an **-216**, Guanin, ist beim -216-Polymorphismus gegen Thymin ausgetauscht. Die Häufigkeiten werden wie folgt beschrieben: 46%GG 46%GT 9%TT⁸³ bzw. GG 32% GT 45% TT 23%¹⁰¹ bzw. 41% GG, 54%

GT, 6% TT¹⁰². Es gibt möglicherweise interethnische Unterschiede: Der GT Austausch wurde bei Afroamerikanern mit einer Häufigkeit von 29,2%, bei Europäern in 41,8% der Fälle und nur bei 7,1% der Asiaten gefunden⁹⁹.

An -191 befindet sich statt dem häufigeren Cytosin im Falle eines Polymorphismus Adenin. C-191A tritt in der weißen Bevölkerung mit einer Frequenz von 13,6% auf⁹⁹. Der Polymorphismus an -191 liegt nur 4bp upstream von einer Initiationsstelle der Transkription¹⁰³.

Es wurde beschrieben, dass die Polymorphismen im Promotorbereich eine höhere Expression des EGFR zu Folge haben. Im Transient Transfection Assay erhöhte der 191C-216T Haplotyp die Aktivität des Promotors um 30%, wobei der Effekt von -216 größer war⁹⁹. Das konnte auch in vivo gezeigt werden: In Fibroblastenkulturen war die Menge an EGFR mRNA beim T-C Haplotyp 40% höher als bei GC⁹⁹.

1.3.2. G/A Austausch an Position 497

Der in der Sequenz letzte untersuchte Polymorphismus befindet sich an Position 497 bzw. 521 (andere Nomenklatur)^{104,105}. Dort ist im Wildtyp die Base Guanin zu finden. Bei einem Teil der Bevölkerung findet sich als Variante dagegen Adenin. Im Protein resultiert daraus ein Aminosäure-Austausch von Arginin zu Lysin. Er kommt mit einer 17% homozygot AA und 39% heterozygot GA vor, 43% der Patienten zeigen den Wildtyp GG^{98,106}. In einer anderen Studie war die Verteilung etwas anders: 56% GG, 39% GA 4% AA¹⁰². Der Polymorphismus R497K ist bei Krebspatienten ähnlich verteilt wie bei Gesunden¹⁰⁷.

Er hat keinen Einfluss auf die Genexpression von EGFR^{108,109}. Moriai et al. fanden im Falle des Polymorphismus eine Funktionsminderung in Bezug auf Ligandenbindung, Wachstumsstimulation, Tyrosinkinaseaktivität und Aktivierung von Protoonkogenen wie Myc, Fos und jun^{107,110}.

1.3.3. CA-Repeats in Intron 1

In Intron 1 des EGFR-Gens findet sich eine Sequenz aus CA-Repeats von unterschiedlicher Länge. Allele mit 8 bis 24 Repeats sind beschrieben^{85,106,111}. In europäischen Kollektiven besteht das häufigste Allel aus 16 CA-Repeats, gefolgt von 18 und 20 Repeats¹¹¹. Es wurde kein Unterschied zwischen Brustkrebspatienten und Kontrollen festgestellt. Dieselben Häufigkeiten wurden auch in gesunden polnischen Frauen bestätigt¹¹². In anderen ethnischen Gruppen bilden sich andere Trends ab. So sind z.B. in der asiatischen

Bevölkerung Allele mit 20 Repeats häufiger^{98,113,114}. In tunesischen bzw. kuwaitischen Personen dominiert dagegen das Allel mit der Länge 17¹¹⁵.

Die Länge der CA-Repeats hat Auswirkungen auf die Expression des EGFR. Je kürzer das Allel desto höher ist die EGFR Expression. Das wurde sowohl beim Kolonkarzinom¹¹⁶, Mamma-Karzinom¹¹⁷ als auch bei HNSCC-Zelllinien¹¹⁸ beschrieben. Das Allel der Länge 21 zeigte bei Gebhardt et al. lediglich 20% der Transkription des 16-Repeat-Allels¹¹⁹. Bei Baranovskaya et al. ist die Expression bei Allellänge 18 dreimal so hoch wie bei einem 24-Repeat-Allel¹¹⁶. Als Ursache wurde eine veränderte Biegsamkeit des DNA Strangs bei erhöhter Anzahl von CA-Repeats postuliert. Die Stelle könnte als Gelenk wirken und über die alternierte Tertiärstruktur die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und so die Expression von EGFR verändern¹¹⁹. In Bezug auf CA-Repeat-Anzahl stimmen Primärtumor und Metastase häufig überein⁸⁶.

1.4. Rezeptorspezifische Therapie des Kolonkarzinoms

Ein neuerer Therapieansatz ist die rezeptorspezifische Therapie. Es existieren im Moment zwei unterschiedliche Ansätze: Die Therapie mit spezifischen Antikörpern und die mit small molecule inhibitors. Beide wurden zunächst für die Behandlung beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zugelassen und sind für diese Indikation am besten untersucht.

Die therapeutisch verwendeten **Antikörper** sind so konstruiert, dass sie spezifisch das Signal des EGFR blockieren. Sie binden an die extrazelluläre Domäne und hemmen kompetitiv die Bindung der natürlichen Liganden und eine Rezeptoraktivierung. Sie verursachen die Internalisierung und Downregulation des EGFR¹²⁰. Möglicherweise spielt auch die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität eine Rolle^{121,122}. Cetuximab ist in Deutschland seit Juni 2004 zur Behandlung des metastasierten CRC im Rahmen einer Kombinationschemotherapie zugelassen. Nach Versagen einer Oxaliplatin/Irinotecan-haltigen Chemotherapie kann es auch als Monotherapie in Second-Line Therapie angewandt werden¹²³. Wie auch die FDA-Zulassung in den USA im Februar 2004 ist die Anwendung an einen EGFR-Nachweis gebunden¹²⁴. Panitumumab ist ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper und wurde im Dezember 2007 zugelassen. Er findet Anwendung als Monotherapie zur Behandlung von metastasierten CRC, die nicht auf 5-Fluorouracil, Oxaliplatin oder Irinotecan ansprechen¹²⁵. Voraussetzung für die Anwendung dieser Antikörper sind positive EGFR-Expression und Vorliegen des KRAS-Wildtyps. Als Nebenwirkung treten u.a. akneiforme Hautausschläge auf¹²⁶, die mit einem besseren Therapieansprechen^{127,128} bzw. mit längerer Überlebenszeit (PFS und OS) assoziiert sind

^{22,86,102,129-131}. Von der Cetuximab-Therapie profitieren circa 12 % Prozent der Patienten²². Bei Panitumumab sind es 9%¹³². Da die Antikörper teuer sind und ihr Einsatz aufwändig ist, wird nach einem Weg gesucht, ihre Wirksamkeit vorherzusagen. Die Aussagekraft der EGFR-Expression gemessen per Immunhistochemie hat sich dafür entgegen der Erwartungen nicht bestätigt^{22,127,133}, wobei z.B. die BOND2-Studie dem widerspricht¹³⁴.

Auch die Polymorphismen im EGFR-Gen wurden hierzu untersucht. Bei fortgeschrittenem Magenkarzinom führt der kürzere CA-Genotyp zwar sowohl zu längerem PFS als auch OS unter Cetuximab-Therapie¹³⁵. Bei CRC-Patienten, die mit Cetuximab behandelt werden ist der CA-Repeat allerdings nicht mit Überleben assoziiert^{129,131}, dasselbe gilt beim HNSCC¹³⁶. Es gibt Studien, nach denen R497K das Ansprechen auf Cetuximab vorhersagt^{104,134,137}. Dies ist jedoch nicht immer nachweisbar¹⁰². Einzelne Autoren verbanden den -191 Polymorphismus mit verstärktem Ausschlag. Der dadurch theoretisch zu erwartende Überlebensvorteil ließ sich jedoch nicht nachweisen¹³⁸. Die Vorhersagekraft der KRAS-Mutationen gilt trotz einzelner Gegenstimmen¹³¹ als erwiesen. Wildtyp-KRAS-Patienten sprechen sehr viel besser an als Patienten mit einem mutierten KRAS^{102,104,137,139-141}. Das gilt auch für Panitumumab¹⁴².

Zum Zweiten gibt es die **Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI)**, wie z.B. Erlotinib oder Gefitinib. Sie inhibieren spezifisch und reversibel die intrazelluläre Tyrosinkinase. Bei Studien mit NSCLC Patienten konnten Ansprechraten von 30-40% erreicht werden^{143,144}. Erlotinib wurde in den USA im November 2004 und in Deutschland im September 2005 zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten NSCLC zugelassen. 2007 wurde die Indikation auf Pankreaskarzinome erweitert¹⁴⁵. Gefitinib ist seit Juni 2009 für die Behandlung des NSCLC zugelassen¹⁴⁶. Als Nebenwirkungen treten auch hier akneiforme Ausschläge auf, die mit besserem Ansprechen auf die Anti-EGFR-Therapie assoziiert^{105,144}.

Auch was die TKIs angeht wurde nach Wegen gesucht, das Ansprechen vorherzusagen. EGFR-Kopien-Anzahl¹⁴⁷ und EGFR-Immunhistochemie^{143,144} haben sich nicht bewährt. Dagegen sind die TKIs besonders effektiv bei Zellen, die einen mutierten EGFR exprimieren¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Diese Mutationen kommen häufiger bei Nichtrauchern vor¹⁵¹ und sind mittlerweile Voraussetzung für die Anwendung von Gefitinib¹⁴⁶. Auch hier wirken sich KRAS Mutationen negativ auf das Ansprechen aus¹⁵².

Der Effekt der bekannten EGFR Polymorphismen ist nicht vollständig geklärt. Viele Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen weniger CA-Repeats in Intron 1 und Ansprechen auf

EGFR-Inhibitoren^{109,153,154} bzw. Überleben unter Gefitinib Behandlung^{155,156}. Eine bessere Ansprechrate durch den -216 T Polymorphismus wurde ebenfalls beschrieben^{154,157}.

Beim kolorektalen Karzinom dagegen haben sich die small molecule inhibitors bisher nicht bewährt^{158,159}. Das könnte auch mit daran liegen, dass die o.g. EGFR Mutationen beim CRC keine Rolle spielen^{22,160-162}. Weder Erlotinib noch Gefitinib sind zurzeit zur Therapie des CRC zugelassen.

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten und Material

2.1.1. Untersuchungsmaterial

Das Kollektiv umfasst 171 Patienten, bei denen ein primäres kolorektales Karzinom diagnostiziert wurde. Sie wurden zwischen August 1995 und August 2006 in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Magdeburg operiert. Die Therapie erfolgte entsprechend der Leitlinien mit kurativer Resektion und stadiendadaptiert mit konventioneller Chemotherapie. Rektumkarzinome wurden mit Radiotherapie behandelt. Insbesondere kamen keine anti- EGFR Therapeutika zum Einsatz.

Die Resektionspräparate wurden unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff auf Crash-Eis an das Institut für Pathologie übersandt. Ein Pathologe des Instituts entnahm innerhalb von 20 Minuten repräsentative Gewebeproben aus dem Tumor und makroskopisch unauffälligem Gewebe (Nicht-Tumor), wobei sich die Nicht-Tumor Proben mindestens 10 cm entfernt des Karzinoms befanden. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur DNA-Präparation bei -80°C aufbewahrt.

Das Tumorpräparat wurden aufgearbeitet und weitere Proben für die Immunhistochemie wiederum aus Tumor und Nichttumorgewebe entnommen. Sie wurden in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die Proben wurden im DNA-Labor und Labor für Immunhistochemie des Institutes für Pathologie der Universität Magdeburg analysiert. Die PCR und Restriktionsfragmentlängenanalysen wurden im Onkologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der Technischen Universität Dresden unter Aufsicht von PD Dr. med. habil. Jan Stöhlmacher durchgeführt.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten, die an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, hereditären Syndromen mit erhöhtem Risiko von kolorektalen Karzinomen oder malignen Zweiterkrankungen litten.

Der Ausschluss einer Mikrosatelliteninstabilität für die Karzinome dieses Kollektivs erfolgte im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes im DNA-Labor des Institutes für Pathologie, Magdeburg.

2.1.2. Patientencharakteristika

Es wurden patientenbezogene Daten aus Krankenakten, Arztbriefen und histopathologischen Befunden aus den Kliniken für Viszeralchirurgie und Gastroenterologie sowie dem Institut für Pathologie benutzt, um Geburtsdatum, Geschlecht, klinische Diagnose und operatives Vorgehen (partielle/vollständige Kolektomie) zu ermitteln. Das Auftreten eines Tumorrezidives, einer Spätmetastasierung und das Datum des letzten Arztbesuches oder des Todes der Patienten wurde ab Februar 2004 halbjährlich durch Übersendung eines Fragebogens an die niedergelassenen Ärzte, die mit der Nachsorge des Patienten betraut waren, ermittelt und in der Datenbank aktualisiert.

2.1.3. Tumorcharakteristika

2.1.3.1. Lokalisation

Die Tumoren wurden eingeteilt in proximale und distale Karzinome, bezogen auf ihre Lokalisation in Bezug auf die linke Kolonflexur oder Flexura lienalis.

2.1.3.2. Tumorklassifikation

Die Stadieneinteilung der Tumore erfolgte entsprechend der sechsten Auflage der UICC TNM Klassifikation für kolorektale Karzinome¹³ (im Anhang). Die mittlerweile erschienene 7. Auflage der TNM Klassifikation fand in unserem Kollektiv noch keine Anwendung¹².

Ein erfahrener Pathologe des Instituts (Frau PD Dr. med. D. Jechorek) beurteilte lokale Infiltrationstiefe (T-Kategorie), Lymphknotenbeteiligung (N-Kategorie), und Fernmetastasen (M-Kategorie) unter Zuhilfenahme der mit Hämatoxylin-Eosin- gefärbten Paraffinschnitte sowie aller zur Verfügung stehenden klinikopathologischen Informationen. Aufgrund unvollständiger oder unkorrekter Angaben erfolgte für 14 Karzinome (12%) eine Ergänzung oder Korrektur der im ursprünglichen Befund gestellten pathohistologischen TNM-Klassifikation. Zusätzlich wurde für alle Karzinome die Lymph- und Haemangiosis carcinomatosa (L- und V-Klassifikation) sowie die perineurale Karzinose (Pn-Klassifikation) nachbeurteilt.

2.1.3.3. Histologie und Grading

Ein routinierter Pathologe des Instituts (Frau PD Dr. med. D. Jechorek) unterteilte die Karzinome ihrem Malignitätsgrad nach entsprechend dem gültigen WHO-Schema^{163,164} in

gut, mäßig, oder schlechtdifferenziert bzw. Grade 1, 2 oder 3. G4-Karzinome wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Alle untersuchten Proben gehörten dem häufigsten histologischen Typ, dem Adenokarzinom, an. Varianten des Siegelringzell- oder muzinösen Typs bzw. mit partieller neuroendokriner Differenzierung wurden ausgeschlossen.

2.2. Molekulargenetische Analysen

2.2.1. DNA Präparation aus Frischgewebe

Dem auf -80°C gekühlten Frischgewebe wurde eine stecknadelkopfgroße Menge entnommen. Diese wurde mit einer kleinen Schere zerkleinert. Das Gewebe wurde in eine Lösung aus 450 μl OLD-T Puffer (40 mM Trisbase, 150 mM NaCl, 25 mM EDTA, 150 μl Aqua dest, pH 7,5), 50 μl Sodium Dodecyl Sulfat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 5 μl Proteinase K (Roche) eingelegt, geschüttelt und zwei Stunden bei 55°C inkubiert. Dann wurden noch 5 μl Proteinase K zugegeben und die Suspension über Nacht bei 50°C ins Wasserbad gestellt. Sollte am nächsten Tag der Verdau nicht abgeschlossen sein, d.h. die Lösung nicht homogen sein, so wurde nach Zugabe von 5 μl Proteinase K mindestens 2h bei 50°C nachverdaut.

Dem fertig verdauten Gemisch wurden 550 μl Phenol zugefügt und es wurde von Hand geschüttelt. In Phenol werden Proteine ausgefällt, die DNA bleibt im Überstand gelöst. Nach Zentrifugation bei 7500 U/min für 10 min wurde diese obere Phase abpipettiert und in ein neues Gefäß gegeben. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Dem Extrakt wurden 550 μl Chloroform/Isoamylalkohollösung im Verhältnis 24:1 beigemischt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals entnommen.

Nun gab man 550 μl eines Gemisches aus absolutem Alkohol und Na-Acetat (25 μl 3M Na-Acetat) zu. Die DNA wurde dadurch gefällt, und es erschien eine DNA-Flocke. Ein Glasstab wurde in die Lösung bis zu der Flocke getunkt und die DNA durch vorsichtiges Ziehen und Drehen des Stabes auf demselben aufgewickelt. Nun spülte man die extrahierte DNA mit 70% Ethanol ab und löste sie dann in 50 bis 100 μl DEPC-Wasser, einem Gemisch aus Aqua dest. und der RNase und DNase freien Lösung DiEthylPyroCarbonat.

Die DNA-Konzentration wurde spektrometrisch bei einer Absorption bei 260nm (Bio-Photometer, Eppendorf) bestimmt und mit den Formeln $1 A_{260} = 50\mu\text{g/ml}$ ds DNA bzw. $1 A_{260} = 33\mu\text{g/ml}$ ss DNA berechnet.

2.2.2. Polymerase Kettenreaktion

Für die PCR wurde eine 50ng/µl Verdünnung der DNA hergestellt. Es wurden von jeder Probe jeweils 3 separate Ansätze für die jeweiligen Polymorphismen angesetzt. Alle Primer stammen von der Firma MWG, alle Pipetten und abgeschlossenen Pipettenspitzen von Eppendorf, Reaktionsgefäße 0,2ml 8er PCR-Gefäße von Life Science Products von Brand.

Für die PCR zum Nachweise des Arginin-Lysin Austausches an Position 497 wurde auf Eis ein Mastermix pipettiert. Er bestand aus folgenden Bestandteilen pro Probe: 0,5µl Magnesiumchlorid (50mM, Invitrogen/Life Technologies), 2µl dNTP-Lösung (10mM, Invitrogen/Life Technologies), 2,5µl 10xPuffer (10x PCR Rxnbuffer von Invitrogen/Life Technologies), je 1µl des F- und des R-Primers (Sequenz siehe Anhang 3). Als letztes wurden 0,3µl der Taq-Polymerase (5 U/µl, Invitrogen/Life Technologies) zugefügt. Nun wurde je 1µl der auf 50ng/µl verdünnten DNA Probe und 24µl des Mastermixes in ein kleines verschließbares Reaktionsgefäß gefüllt und gevortext (MeidolphReax Top). Die Gefäße wurden in den Thermocycler (Mastercycler – egradient von Eppendorf) gestellt und das Programm gestartet (siehe Anhang 3). Es entstanden Fragmente von 155 Bp Länge.

Die Polymorphismen im Promotorbereich wurden in einem gemeinsamen Ansatz ⁹⁹ amplifiziert. Dazu wurde das Qiagen multiplex Kit (Qiagen, Hilden Germany) verwendet. In jedes PCR-Gefäß wurden 20µl des mitgelieferten Mastermix (MM), 8µl der Q-Solution und je 4µl des F- und R-Primer vorgelegt. Dazu wurden je 50ng DNA pipettiert. Mit Wasser aus dem Kit wurde auf 40µl aufgefüllt. Im Thermocycler wurde dann die PCR nach dem entsprechenden Protokoll (siehe Anhang 3) durchgeführt.

2.2.3. Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Die amplifizierten DNA-Proben werden mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsendonucleasen an definierten Stellen geschnitten. Im Falle eines lokalen Polymorphismus gehen solche Schnittstellen verloren oder entstehen neu. Dadurch bleiben nach dem Verdau Fragmente anderer Länge zurück als beim Verdau der Wildtyp-DNA. Nach der anschließenden Elektrophorese können daher Wildtyp und Mutation durch ein definiertes Wanderungsmuster unterschieden werden.

Zum Nachweis des R497K-Austausches wurde ein eigener Ansatz hergestellt. Er enthielt jeweils 15µl PCR- Produkt, 2,5µl 10xPCR Rxn Buffer (Invitrogen/Life Technologies), 2,5µl purified Bovine Serume Albumine (10ng/l, New England Biolabs Inc.), 4,7µl Aqua dest und

0,3µl des Restriktions-Enzyms BstN I (New England Biolabs Inc.). Die Proben wurden für drei Stunden bei 60°C im Thermocycler inkubiert.

Das PCR Produkt der Promotorsequenz wurde auf zwei Ansätze aufgeteilt:

Im ersten Ansatz sollte der -216 Polymorphismus untersucht werden. 15µl des PCR Produkts wurden in ein neues Gefäß überführt. In diesem befanden sich bereits 2,5µl 10xPuffer, 7,2µl H₂O und 0,4µl des Restriktionsenzym BseRI (New England Biolabs). Die Gefäße wurden zwei Stunden im Brutschrank (Heraeuskelvitron, Kendro Laboratory products, Hanau, Germany) bei 37°C inkubiert und anschließend sofort 20 Minuten bei 60°C inaktiviert. Dann wurden sie auf Eis gestellt.

Im zweiten Ansatz zur Detektion des -191 Polymorphismus wurden je 8µl PCR Produkt, 2,5µl Puffer, 9µl H₂O und 0,5µl Restriktionsenzym SacII in ein Gefäß gefüllt. Das Gemisch wurde drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Ein 3% Agarosegel wurde vorbereitet. Dazu wurde ein Erlenmeyerkolben mit 3g Agarose electrophoresis grade (Invitrogen/Life Technologies) und 100ml 1x TBE-Puffer (Invitrogen/Life Technologies) in einer handelsüblichen Mikrowelle 3 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen wurde 5µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in die entsprechende Form gegossen. Nach 20 Minuten konnte es beladen werden. Das Gel wurde aus der Form entnommen und wurde in die Elektrophoresekammer (Horizon 11.14 von Whatman Inc.) eingespannt. Man befüllte diese mit 1x TBE Buffer (Invitrogen/Life Technologies) und 20µl Ethidiumbromid. Die Taschen wurden mit jeweils 18µl Probe beladen. In den ersten und letzten Hohlraum wurden 5µl einer DNA-Leiter (50 bp DNA Ladder, Invitrogen/Life Technologies) gegeben, um später die Länge der gewanderten Fragmente abschätzen zu können. Bei einer Spannung von 120V und 0,67mA Stromfluss betrug die Elektrophoresezeit 1,5 Stunden.

Für den Nachweis des (CA)_n Repeats war kein Restriktionsverdau notwendig.

2.2.4. Fragmentanalyse

Für die Analyse der (CA)_n-Repeats wurde ebenfalls ein 25µl Ansatz hergestellt. In ein Gefäß gab man 1µl Magnesiumchlorid (Invitrogen/Life Technologies), 2µl dNTP-Lösung (Invitrogen/Life Technologies), je einen Teil Forward und Reverse Primer (FAM-markierter Forward-Primer, Reverse Primer von MWG, Sequenz siehe Tabelle 1, Kapitel 2.2.2.), 2,5µl 10xPuffer, 16,3µl Wasser und zuletzt 0,2µl TaqPolymerase (Invitrogen/Life Technologies). Der Forward-Primer war FAM-markiert, um die Fragmente später im Sequencer detektieren

zu können. Die DNA wurde so verdünnt, dass sie eine Konzentration von 10ng/µl hatte. Von dieser Lösung wurde 1µl in jedes Reaktionsgefäß zugefügt. Die PCR wurde dann im Thermocycler entsprechend dem Protokoll (siehe Tabelle 1, Kapitel 2.2.2.) durchgeführt.

Die (CA)_n Repeats wurden auf dem ABI Prism 377 XL Sequencer (Applied Biosystem) mit GeneScan® 2.0.2. Software Programm und Genotyper Software analysiert. Dazu wurde zunächst ein Acrylamidgel gegossen. Ein Mix aus 18g Urea, 26,5g Aqua, 5ml 10xTBE (Invitrogen/Life Technologies) und 5ml Long Ranger (Biorad) wurde hergestellt. Mittels Magnetrührer wurde das Gemisch bei 50°C 15-20 Minuten gerührt bis der Harnstoff vollständig aufgelöst war. Die Flüssigkeit wurde in einer 50ml Spritze aufgezogen und mit Hilfe eines Sterilfilters, der auf die Spritze aufgesteckt wurde, filtriert. In der Vakuumzentrifuge (Eppendorf) wurde das Material entgast, um Luftblasen beim Gießen zu vermeiden. 250µl Ammoniumpersulfat und 35µl TEMED wurden zugesetzt und kurz umgerührt, um die Polymerisation zu starten. Dann goss man das Gel schnell und luftblasenfrei auf die vorbereiteten Glasplatten. Anschließend wurde der Kamm eingelegt und vorsichtig mit drei Klammern fixiert. Die Glasplatten wurden luftdicht mit Parafilm verschlossen und die Auspolymerisation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

Am folgenden Tag wurde der Sequencer vorbereitet. Der Kamm wurde zunächst aus dem Gel entfernt. Das Gel mit den Glasplatten wurde in den Rahmen des Sequencers eingespannt. Die Glasplatten mussten auf den Außenseiten mit Aqua dest. gründlich gereinigt werden, um Störungen des Lasers zu vermeiden. Dann wurde der Kamm wieder eingesetzt. Der Rahmen wurde im Sequencer befestigt. Dann wurde die obere Pufferkammer angebracht und obere und untere Kammern mit ausreichend 1xTBE Puffer (Invitrogen/Life Technologies) gefüllt. Die Heizplatte wurde angeschlossen und das Gel auf 51°C temperiert. Die Taschen wurden kurz mit TBE-Puffer gespült. Das GeneScan Programm wurde gestartet und die entsprechenden Module ausgewählt. Proben ID und zu detektierende Farbe (ROX) wurden in das entsprechende Programm eingegeben. Die Proben wurden vorbereitet. Dazu wurde ein FLS Standard hergestellt aus 400µl Formamid und 100µl loading buffer (Gene Scan Rox 500). Von dieser Lösung wurden wiederum 5µl mit 0,55µl Rox 500 Längenstandard (Applied Biosystems) zu einem Mastermix vereint. 5µl dieses Mastermixes wurden nun mit 2µl PCR-Produkt in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und zwei Minuten bei 95°C im Thermocycler (PT 200 thermal cycler, MJ Research, Ramsey, USA) denaturiert. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt.

Kurz vor Ende des Preruns wurde das Programm pausiert und das Gel beladen. Dazu überführte man 1,5µl Probe in jede zweite Tasche. Danach wurden am Computer Matrix file und Rox Standard entsprechend ausgewählt und der GeneScan-Lauf gestartet.

Die FAM-markierten DNA-Stücke wanderten und teilten sich im Gel entsprechend ihrer Länge auf: Die längsten Fragmente wanderten am langsamsten, und die kürzesten am schnellsten. Ein Laser maß anhand der Absorption die Lokalisation der Fragmente aus. Anhand des andersfarbig markierten Rox 500 Längenstandards, der jeder Probe zugeführt worden war, ließ sich anhand der relativen Wanderungstrecke die Größe abschätzen. Der Computer wertete die Daten des Lasers entsprechend aus.

2.2.5. Auswertung

Die Produkte des Restriktionosendonuclease-Verdau wurden alle in gleicher Art und Weise ausgewertet. Ein UV Gerät (UV Bank Transluminator von Biotec-Fischer) machte die Banden sichtbar. Sie konnten fotografiert und vermessen werden. Die ursprünglichen Fragmente aus der PCR wurden durch die Restriktionosendonucleasen in Abhängigkeit des Genotyps an charakteristischer Stelle gespalten. Die Länge der Fragmente unterschied sich je nach Vorliegen eines Polymorphismus, entsprechend auch die Wanderungstrecke. Mit Hilfe eines in der äußersten Tasche mitlaufenden Längenstandards konnten die Wanderungstrecken Fragmentlängen zugeordnet werden (siehe Tabelle 1)

Polymorphismus (Ursprungsfragmentlänge)	Genotyp	Fragmentlänge
-216 (224 bp)	GG (Wildtyp) GT TT	224 bp 224bp /132bp /92 bp 132 bp/92bp
-191 (224 bp)	CC (Wildtyp) CA AA	149 bp/ 75 bp 224 bp/149 bp/ 75 bp 224 bp
R497K (155 bp)	GG (Wildtyp) GA AA	67bp/ 50bp/ 38bp 117bp/ 67bp/ 50bp/ 38bp 117bp/ 38bp

Tabelle 1 - EGFR-Polymorphismen Fragmentlängen

Der Sequencer gibt als Ergebnis ein Diagramm der Absorptionen aus. An den Stellen, wo am Ende des Laufs Fragmente zu liegen kamen, ergab ihre FAM-Markierung einen Peak in der Absorptionskurve. So konnte man anhand der Wanderungstrecke relativ zum Rox 500 Längenstandard erkennen, wie lang die Fragmente waren und so auf die Nummer der CA-Repeats rückschließen.

2.3. Immunhistologische Analysen

2.3.1. Tissue Microarray

Tissue Microarrays ermöglichen es, Gewebeproben verschiedener Patienten bzw. verschiedene Gewebeproben eines Patienten hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Proteinexpression simultan und unter gleichen methodischen Bedingungen standardisiert zu untersuchen.

Für alle Karzinome des Kollektives wurden repräsentative Tumorregionen auf H&E-gefärbten Schnittpräparaten orientierend markiert. Mit Hilfe eines Manual-Tissue-Arrayers (MTA Booster, Version 1,01, Firma Alphelys, Plaisir, Frankreich) wurden Gewebszylinder mit einem Durchmesser von 0,6mm im Quadruplikat aus der entsprechend markierten Regionen (Donor-Blöcke) gestanzt und in vorbereitete Akzeptor-Blöcke eingesetzt (Empfängerblock: 25mm x 17mm, 0,1mm Abstand, max. 15 x 10 Stanzen). Durch Erhitzen (10min, 60°C) des entstandenen TMA-Blockes wurden die Stanzzylinder in das Paraffin des Akzeptorblockes eingebunden. Die Überprüfung von Gewebequalität und Vollständigkeit der gestanzten Quadruplikate erfolgte anhand eines H&E-gefärbten Schnittpräparates der TMA.

2.3.2. Immunhistochemische Reaktionen

Die Färbungen wurden an 2-3µm dicken Paraffinschnitten der Tissue Microarrays nach Entparaffinierung in dreimaligem Xylol-Bad und Rehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Die Zwischenlagerung der Objektträger erfolgte im Puffer APK Wash Solution (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA).

Die immunhistologische Färbereaktion wurde nach der indirekten Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode durchgeführt. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnittpräparate im jeweiligen Puffer im Pascal-Dampfdruckkochtopf (DakoCytomation, Hamburg) für 30sec bei 120°C erhitzt und mit der Protease 1 (7602018, Ventana Medical Systems) vorbehandelt (20min). Die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper erfolgte automatisiert im NexES® Immunostainer (Ventana, Tucson, USA). Als Primärantikörper wurde der monoklonale IgG1-Maus-EGFR-Antikörper (Clone E30, M7239, DakoCytomation) in der Verdünnung 1:25 und mit einer Inkubationszeit von 32min bei 37°C eingesetzt. Als Chromogen wurde das iVIEW™ DAB Detection Kit (760091, Ventana Medical Systems) genutzt (Inkubationszeit: 8min). Es folgte die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer, die Entwässerung in einer absteigenden Alkoholreihe und das Eindecken in Kanadabalsam.

Die Positivkontrolle der Antikörper erfolgte am Synzytiotrophoblast humanen Plazentagewebes. Für die Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch Maus-IgG-Antikörper ersetzt (ab27479, Abcam, Cambridge, UK)

2.3.3. Auswertung

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbereaktion wurde lichtmikroskopisch bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung am Axioskop 50 (Zeiss, Germany) durchgeführt.

Jede Gewebestanze wurde zunächst separat bewertet. Als nicht auswertbar galten neben nicht vorhandenen Stenzen solche, die nicht oder nur zu einem kleinen Teil (<10%) aus Tumorgewebe bestanden, außerdem jene, welche sich extrem inhomogen anfärbten.

Die Bewertung der immunhistochemischen Reaktion erfolgte unter Berücksichtigung der Anfärbbarkeit der Zellmembran anhand der von der Firma Dako vorgeschlagenen Kriterien. Eine rein zytoplasmatische Färbung wurde als nicht gefärbt gewertet, da der EGF-Rezeptor nur an der Zelloberfläche seiner Funktion nachgehen kann.

Bewertet wurde einerseits die Intensität der Färbung (I) unter Berücksichtigung der intrazellulären Verteilung in vier Abstufungen: keinerlei Braunfärbung (I=0), leichte Braunfärbung (I=1), moderate Färbung besonders der Plasmamembran (I=2) und starke Färbung mit besonderer Hervorhebung der Plasmamembran (I=3). Andererseits wurde der prozentuale Anteil gefärbter Zellen (P) in Zehnerschritten angegeben, d.h. 0% gefärbte Zellen (=0), 0,5% bis 10% gefärbte Zellen (=1), 11% bis 20% gefärbte Zellen (=2), 21% bis 30% gefärbte Zellen (=3) ... >90% (=10).

Als nächstes wurden die jeweils vier Stenzen eines Tumors gemeinsam betrachtet. Aus den Intensitäten bzw. prozentualen Anteilen gefärbter Zellen P der zu einem Tumor gehörenden Stenzen wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde der immunreaktive Score (IRS=P x I) pro Tumor errechnet (mögliche IRS-Werte: 0 bis 30), der die Grundlage für die weitere statistische Datenverarbeitung bildete.

Ein Tumor galt insgesamt als nicht bewertbar, wenn weniger als zwei auswertbare Stenzen vorhanden waren. Nicht bewertbare Tumoren gingen nicht in die Statistik mit ein.

2.4. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde mit Frau Dipl. Ök. Brigitte Peters, Biomathematikerin am Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg zusammengearbeitet.

Zur Untersuchung von Häufigkeitsverteilungen wurden der Chi-Quadrat-Test nach Pearson und der Exakte Test nach Fischer verwendet. Mithilfe des zweiseitigen t-Tests bzw. bei mehr als zwei Gruppen mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way-ANovA) wurden Mittelwertsunterschiede unabhängiger Stichproben geprüft.

Zur Definition eines optimalen Cut-off Wertes/Schwellenwertes der EGFR-Expression, der zwischen einer low risk und einer high risk Gruppe im postoperativen Verlauf diskriminieren konnte, wurden Analysen auf der Grundlage von Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurven durchgeführt.

Die Nachbeobachtungszeit wurde vom Zeitpunkt der primären Tumorresektion berechnet. Überlebenswahrscheinlichkeiten für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben wurden nach der Kaplan-Meier-Methode ermittelt, wobei die Kaplan-Meier-Kurven die statistische Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit des jeweiligen Kollektives graphisch darstellen, und das Überleben verschiedener Teilkollektive mit Hilfe des Log-Rank-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft wurden. Berechnungsziele waren die Gesamtüberlebensrate.

Ab einer Signifikanz von $p < 0,05$ wurde ein Zusammenhang als bedeutend eingestuft.

Die verwendete Software war SPSS der Firma IBM in der Version von 2010 (PASW Statistics 18.0.2).

3. Ergebnisse

3.1. Patienten

Es wurden 177 Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. 102 Patienten (57,6%) waren männlich, 75 Patienten (42,3%) waren weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 67,38 Jahre mit einer Range von 40 bis 91 Jahren.

Die übrigen klinisch-pathologischen Daten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

	n (%)
	177 (100%)
Alter	
30-40	1 (0,6%)
41-50	8 (4,5%)
51-60	42 (23,7%)
61-70	54 (30,5%)
71-80	50 (28,2%)
81-90	21 (11,9%)
>90	1 (0,6%)
Geschlecht	
Männlich	102 (57,6%)
Weiblich	75 (42,3%)
pT	
1	8 (4,5%)
2	34 (19,2%)
3	95 (53,7%)
4	40 (22,6%)
pN	
0	92 (52,0%)
1	41 (23,2%)
2	44 (24,8%)
M	
0	124 (70%)
1	53 (30%)
Grading	
1	12 (6,8%)
2	128 (72,3%)
3	37 (20,9%)
Stage (UICC)	
I	34 (19,2%)
II	49 (27,7%)
III	43 (24,3%)
IV	51 (28,8%)
Veneninvasion	
Gesamt	172
Nicht vorhanden	98 (57%)
vorhanden	74 (43%)
Lymphbahninvasion	
Gesamt	171
Nicht vorhanden	82 (48,0%)
vorhanden	89 (52,0%)
Nerveninvasion	
Gesamt	166
Nicht vorhanden	134 (80,7%)

Vorhanden	32 (19,3%)
Tod	
Verstorben	107 (60,5%)
Nicht verstorben	70 (39,5%)
Lokalisation	
Proximal der linken Kolon-Flexur	72 (40,7%)
Distal der linken Kolon-Flexur	105 (59,3%)
Rezidiv	
Nicht vorhanden	152 (85,9%)
Vorhanden	25 (14,1%)
Metastasierung gesamt (Initial+Spät)	
Nicht vorhanden	140 (79,1%)
Vorhanden	37 (20,9%)

Tabelle 2 - Klinisch-pathologische Daten des Kollektivs

Im Untersuchungszeitraum verstarben 107 (60,5%) von 177 Patienten. Somit war für 70 (39,5%) Patienten das Follow-up zum Zeitpunkt der letzten Datenerfassung der vorliegenden Arbeit noch nicht abgeschlossen. Die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit betrug 42,4 (0-133) Monate. Für das Gesamtkollektiv ergab sich im bisher zur Verfügung stehenden Untersuchungszeitraum eine mittlere Gesamt-Überlebenszeit von 48 Monaten sowie eine 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 58,9%, 43,1% und 23,1%. Das Überleben war abhängig vom UICC-Stadium und den jeweiligen T, N, M Kategorien, unterschied sich aber nicht, wenn das Kollektiv nach Geschlecht oder Lokalisation aufgeteilt wurde. Die untersuchte Gruppe zeigt damit im Vergleich zur internationalen Literatur repräsentative Häufigkeitsverteilungen der klinisch-pathologischen Parameter. Zur Illustration ist hier beispielhaft das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium dargestellt (Abbildung 2).

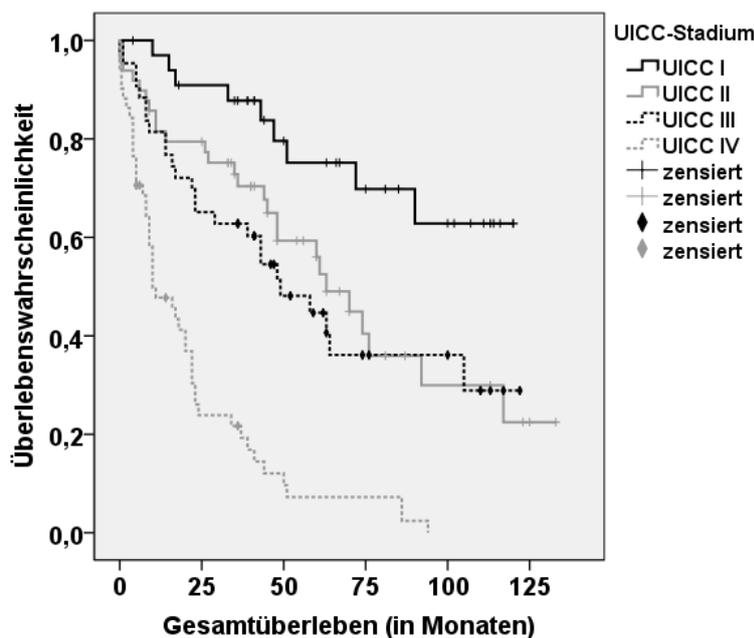


Abbildung 2 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom UICC Stadium

3.2. Immunhistochemische Analysen

3.2.a. EGFR-Expression

Es standen Tissue Microarrays von 177 Tumoren zur Verfügung. Davon waren 170 auswertbar. Nicht auswertbar waren Proben, bei denen weniger als zwei Stenzen auf dem fertigen Schnitt anzutreffen waren, kein oder auf weniger als 10% der Schnittfläche Tumorgewebe enthalten war oder die Farbe nur am Rand aufgenommen wurde.

Die Nichttumorpräparate wurden nicht untersucht. Als Positivkontrolle wurde in jedem Mikroarray-Block je eine Stanze humaner Plazenta mitgeführt. Hier färbte sich der Synzyotrophoblast stark positiv an.

Die immunhistochemische Reaktion bzw. die EGFR-Expression innerhalb der Tumorzellen der Stenzen war überwiegend homogen.

61 Tumoren zeigten keine EGFR-Expression (Immunreaktiver Score = 0). 87 Tumoren zeigten eine schwach positive und 22 eine mäßig positive Reaktion. Bei keinem Tumor fiel die immunhistochemische Reaktion stark positiv aus.

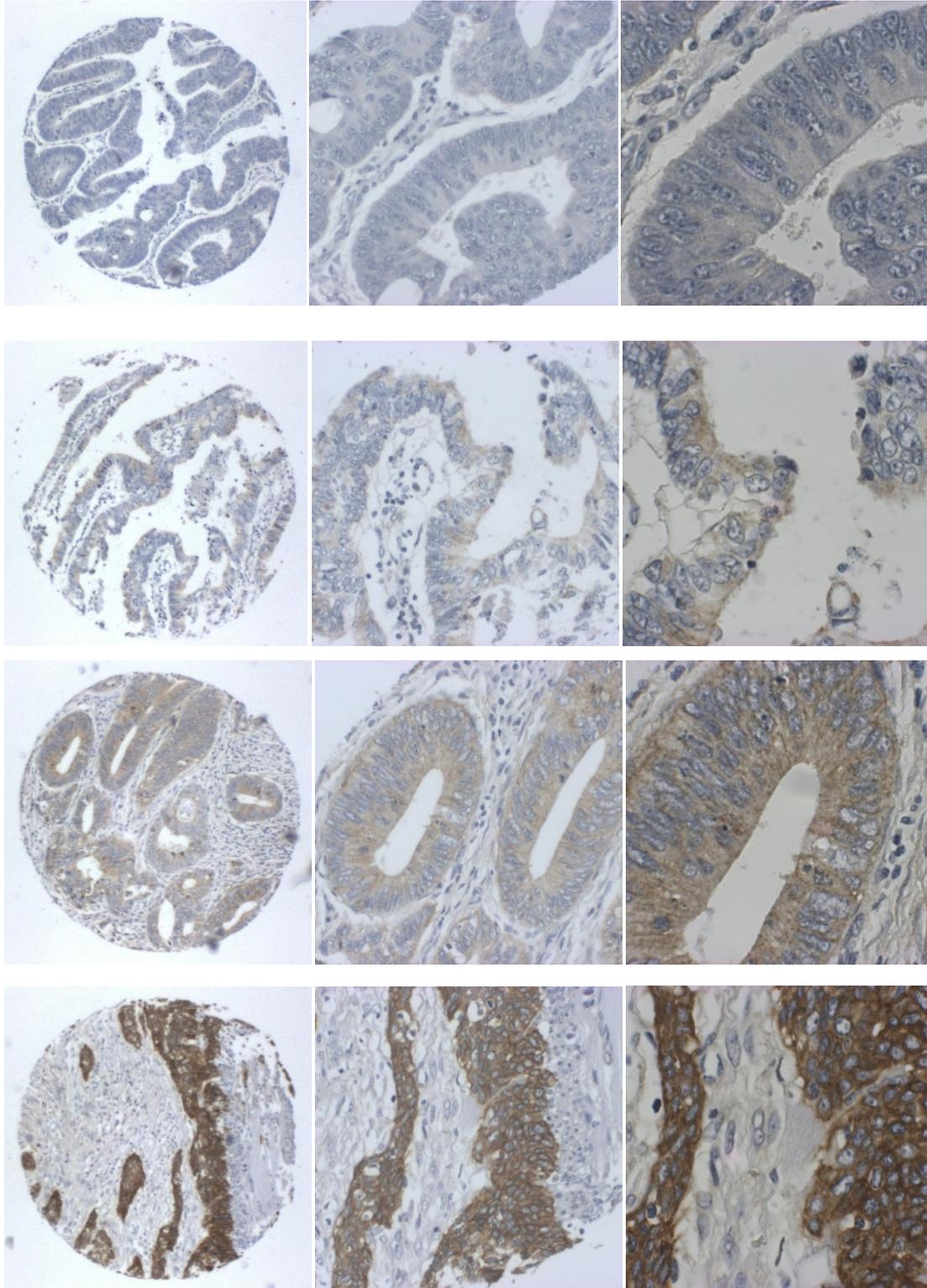


Abbildung 3 - Immunhistochemische EGFR-Expression: Zeile 1 I=0, Zeile 2 I=1, Zeile 3 I=2, Zeile 4 I=3

Die durchschnittliche Färbeintensität betrug 1 entsprechend schwacher Anfärbbarkeit. Der durchschnittliche Anteil positiv exprimierender Tumorzellen war 28,7%. Der mittlere immunreaktive Score betrug 3,63 ($\pm 0,36$).

3.2.b. Korrelation von EGFR-Expression mit Klinik und Überleben

Es wurde der Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Faktoren untersucht.

Mit Hilfe der ROC-Analyse („Receiver Operating Characteristics“) wurde ein geeigneter cut-off Wert für die immunhistochemische Expression von EGFR definiert, der bei bestmöglicher Kombination von Sensitivität und Spezifität zwischen einer low risk und high risk Gruppe bezüglich des Gesamtüberlebens diskriminieren konnte. Als Schwellenwert ließ sich ein Immunreaktiver Score von 4,0 identifizieren, so dass Fälle mit einem IRS <4 der gering-exprimierenden und Fälle mit einem IRS \geq 4 der hoch-exprimierenden Gruppe zugeordnet wurden.

Die vollständigen Expressionsdaten bezogen auf die einzelnen klinisch-pathologischen Faktoren bzw. Kategorien sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

	Häufigkeit (relative H.)	IRS<4,0	IRS>4,0	p-Wert
Gesamt	170(100%)	115 (67,6%)	55 (32,4%)	
Alter	170 (100%)	66,75 Jahre	69,51 Jahre	0,113
Geschlecht				0,486
Weiblich	73	50 (68,5%)	23 (31,5%)	
Männlich	97	65 (67%)	32 (33%)	
Tumor				0,738
T1	8	4 (50%)	4 (50%)	
T2	33	22 (66,7%)	11 (33,3%)	
T3	90	62 (68,9%)	28 (31,1%)	
T4	39	27 (69,2%)	12 (30,8%)	
Lymphknotenstatus				0,919
N0	89	61 (68,5%)	28 (31,5%)	
N1	38	26 (68,4%)	12 (31,6%)	
N2	43	28 (65,1%)	15 (34,9%)	
Metastasen				0,678
M0	121	83 (68,6%)	38 (31,4%)	
M1	49	32 (65,3%)	17 (34,7%)	
Grading				0,503
G0	1	0	1 (100%)	
G1	12	8 (66,7%)	4 (33,3%)	
G2	123	85 (69,1%)	38 (30,9%)	
G3	34	22 (64,7%)	12 (35,3%)	
UICC-Stage				0,940
1	33	22 (66,7%)	11 (33,3%)	
2	47	33 (70,2%)	14 (29,8%)	
3	42	29 (69,0%)	13 (31,0%)	
4	48	31 (64,6%)	17 (35,4%)	
Tumorlokalisation				0,171
1 proximal	70	44 (62,9%)	26 (37,1%)	
2 distal	100	71 (71%)	29 (29%)	
Rezidiv				0,541

Nicht vorhanden	146	99 (67,8%)	47 (32,2%)	
Vorhanden	24	16 (66,7%)	8 (33,3%)	
Metastase gesamt				0,804
Nicht vorhanden	99	67 (67,7%)	32 (32,3%)	
Vorhanden	69	46 (66,7%)	23 (33,3%)	

Tabelle 3 - Korrelation der immunohistochemischen EGFR-Expression mit klinisch-pathologischen Daten

Die Abhängigkeit des Gesamt- und 3-, 5- und 10-Jahresüberleben vom Expressionslevel des EGF-Rezeptors wurde mittels der Kaplan-Meier-Methode untersucht. Gruppe mit niedrigerem IRS (<4,0) zeigte ein mittleres Überleben von 64,6 Monaten während der Anteil mit höherem IRS ($\geq 4,0$) eine deutlich geringere Überlebenszeit von im Mittel 46,1 Monaten aufwies. Dies war statistisch signifikant ($p=0,023$) (siehe Abbildung 4). Patienten mit dem niedrigeren IRS hatten eine 3, 5 und 10 Jahres-Überlebensrate von 62%, 48% und 31,6% während Patienten mit höheren IRS nur zu 52,3%, 32,1% und 11,7% an den genannten Zeitpunkten noch am Leben waren. Alle anderen klinisch-pathologischen Daten wie Grading oder TNM-Stadium, zeigten keine statistisch signifikante Abhängigkeit. Die Gruppe mit einem IRS von <4,0 war etwas jünger, dies war aber nur ein Trend.

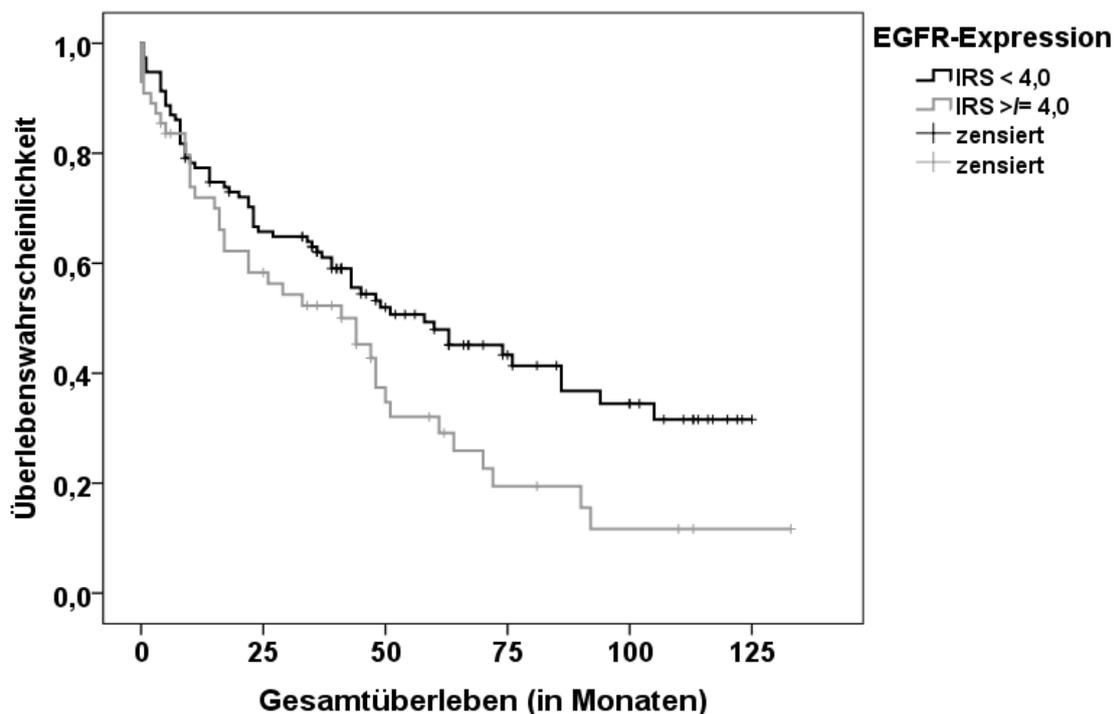


Abbildung 4 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der EGFR Expression

Bei -191 bestand der Polymorphismus AA bei 3 oder 3,2% der Fälle, 21 oder 22,3% waren heterozygot und bei 70 oder 74,5% war der Wildtyp CC erhalten.

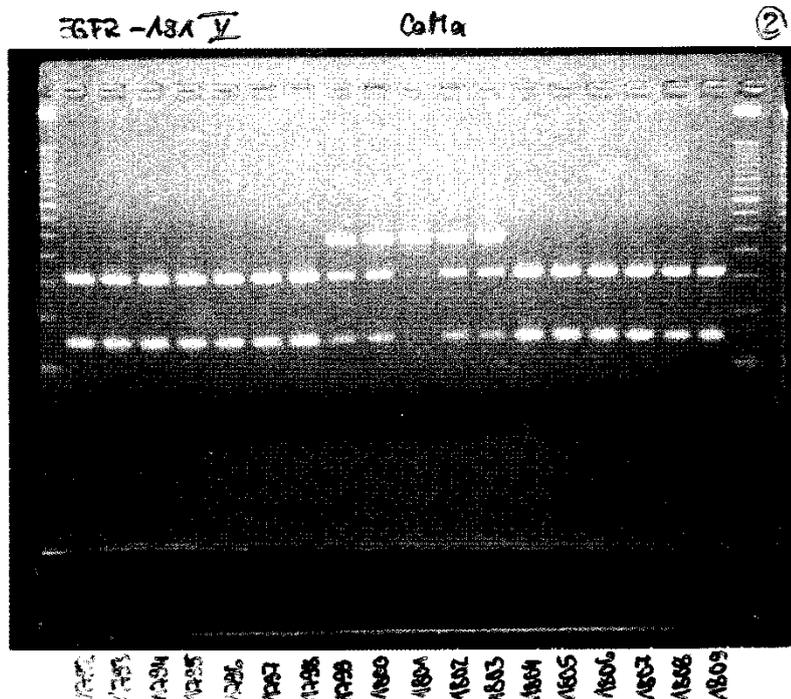


Abbildung 6 - Gelelektrophorese des Polymorphismus -191

3.3.1.b. Korrelation von Promotorpolymorphismen und EGFR-Expression

Für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen EGFR Polymorphismen und immunhistochemischer EGFR-Proteinexpression standen 88 Fälle zur Verfügung, bei denen jeweils beide Analysen vorhanden und auswertbar waren. Für keinen der Polymorphismen ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen den Genotypen und der Höhe der EGFR-Expression - weder im Vergleich der einzelnen Gruppen gegeneinander noch im Gruppenvergleich Wildtyp vs. Polymorphismus - feststellen. Dies gilt sowohl in Bezug auf den Immunreaktiven Gesamtscore (IRS) als auch den prozentualen Anteil EGFR-exprimierender Zellen (Proz) (siehe Tabelle 4).

	-216			-191			497		
N	GG (WT)	GT	TT (Poly)	CC (WT)	CA	AA (Poly)	GG (WT)	GA	AA (Poly)
		38	46	4	66	19	3	55	27
	38	50		66	22		55	33	
Proz	2,4±3,0	3,1±3,2	0,6±0,7	2,8±3,1	2,0±2,8	4,0±5,1	2,3±3,0	3,3±3,2	3,1±3,5
	p=0,226			p=0,515			p=0,315		
	2,4±3,0	2,9±3,1		2,8±3,1	2,3±3,1		2,3±3,0	3,3±3,2	
	p=0,446			p=0,558			p=0,130		
IRS	3,3±5,0	4,1±5,5	0,5±0,7	3,8±5,3	2,5±3,9	7,2±10,6	3,0±4,7	4,5±5,6	4,9±7,6
	p=0,343			p=0,313			p=0,409		
	3,3±5,0	3,9±5,4		3,8±5,3	3,1±5,1		3,0±4,7	4,6±5,9	
	p=0,574			p=0,614			p=0,182		

Tabelle 4 - Polymorphismen und immunhistochemische EGFR-Expression: Die Darstellung der Werte erfolgt als Mittelwert ± Standardabweichung für die einzelnen Gruppen getrennt sowie gruppiert als Wildtyp (WT) vs. Polymorphismus (Poly)

3.3.1.c. Korrelation von Promotorpolymorphismen und klinisch-pathologischen Daten

94 Proben wurden auf Abhängigkeiten zwischen Klinik und Promotor-Genotyp untersucht. Es ließ sich keinerlei statistischer Zusammenhang zwischen dem Genotyp im Promotorbereich - 216 bzw. -191 und den untersuchten klinisch-pathologischen Faktoren finden. Dies traf für den Vergleich aller drei Gruppen untereinander und für den Gruppenvergleich Wildtyp vs. Polymorphismus (siehe Tabelle 5) als auch für die nach Geschlechtern getrennten Analysen (Daten nicht aufgeführt) zu.

		-216					-191				
		1 (WT) GG	2 GT	3 (Poly) TT	p*	p**	1 (WT) CC	2 CA	3 (Poly) AA	p*	p**
Alter		68,19	67,29	60,50	0,391	0,525	66,24	70,86	70,33	0,199	0,007
Sex					0,351	0,432				0,571	0,393
M	54	26 (48,1%)	27 (50%)	1 (1,9%)			42 (77,8%)	11 (20,4%)	1 (1,9%)		
W	40	16 (40%)	21 (52,5%)	3 (7,5%)			28 (70%)	10 (25%)	2 (5%)		
T					0,187	0,478				0,927	0,833
1	4	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)			3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)		
2	23	13 (56,5%)	10 (43,5%)	0 (0%)			16 (69,6%)	6 (26,1%)	1 (4,3%)		
3	41	16 (39%)	22 (53,7%)	3 (7,3%)			30 (73,2%)	9 (22%)	2 (4,9%)		
4	26	12 (46,2%)	14 (53,8%)	0 (0%)			21 (80,8%)	5 (19,2%)	0 (0%)		
N					0,246	0,101				0,814	0,666
0	48	20 (41,7%)	25 (52,1%)	3 (6,3%)			35 (72,9%)	11 (22,9%)	2 (4,2%)		
1	20	13 (65%)	7 (35%)	0 (0%)			14 (70%)	5 (25%)	1 (5%)		
2	26	9 (34,6%)	16 (61,5%)	1 (3,8%)			21 (80,8%)	5 (19,2%)	0 (0%)		
M					0,285	0,934				0,975	0,875
0	60	27 (45%)	29 (48,3%)	4 (6,7%)			45 (75,0%)	13 (21,7%)	2 (3,3%)		
1	34	15 (44,1%)	19 (55,9%)	0 (0%)			25 (73,5%)	8 (23,5%)	1 (2,9%)		
Stage					0,728	0,951				0,964	0,896
1	21	9 (42,9%)	11 (52,4%)	1 (4,8%)			17(81,0%)	4 (19,0%)	0 (0%)		
2	22	11 (50%)	9 (40,9%)	2 (9,1%)			16 (72,7%)	5 (22,7%)	1 (4,5%)		
3	18	8 (44,4%)	9 (50%)	1 (5,6%)			13 (72,2%)	4 (22,2%)	1 (5,6%)		
4	33	14 (42,4%)	19 (57,6%)	0 (0%)			24 (72,7%)	8 (24,2%)	1 (3%)		
G					0,281	0,669				0,479	0,471
1	7	2 (28,6%)	4 (57,1%)	1 (14,3%)			6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0%)		
2	67	31 (46,3%)	35 (52,2%)	1 (1,5%)			51 (76,1%)	13 (19,4%)	3 (4,5%)		
3	20	9 (45%)	9 (45%)	2 (10%)			13 (65,0%)	7 (35,0%)	0 (0%)		
Lok					0,808	0,666				0,288	0,886
Prox	38	18 (47,4%)	18 (47,4%)	2 (5,3%)			28 (73,7%)	10 (26,3%)	0 (0%)		
distal	56	24 (42,9%)	30 (53,6%)	2 (3,6%)			42 (75%)	11 (19,6%)	3 (5,4%)		
Rez					0,101	0,627				0,075	0,066
ja	81	37 (45,7%)	42 (51,9%)	2 (2,5%)			63 (77,8%)	15 (18,5%)	3 (3,7%)		
nein	13	5 (38,5%)	6 (46,2%)	2 (15,4%)			7 (53,8%)	6 (46,2%)	0 (0%)		
Mges					0,913	0,662				0,947	0,839
ja	47	21 (44,7%)	24 (51,1%)	2 (4,3%)			35 (74,5%)	11 (23,4%)	1 (2,1%)		
nein	46	21 (45,7%)	23 (50%)	2 (4,3%)			34 (73,9%)	10 (21,7%)	2 (4,3%)		
8	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)			1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)		

Tabelle 5 - Korrelation von Promotorpolymorphismen und klinisch-pathologischen Daten: Die Analyse erfolgte (*) für die einzelnen Gruppen getrennt sowie (**) gruppiert als Wildtyp vs. Polymorphismus

Auch in der Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ließen sich keine signifikanten Unterschiede für die verschiedenen Genotypen im Promotorbereich nachweisen:

Bei einem Wildtyp an der -216-Stelle des Promotor konnte ein mittleres Überleben von 53,6 Monaten sowie eine 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 53,1%, 36,5% bzw. 0% registriert werden, wobei sich auch hier für Patienten mit polymorphem Promotor bei einem mittleren Überleben von 57,4 Monaten und einer 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 53,2%, 44,3% bzw. 25,4% keine signifikanten Unterschiede nachweisen ließen ($p=0,865$) (Abb. 7).

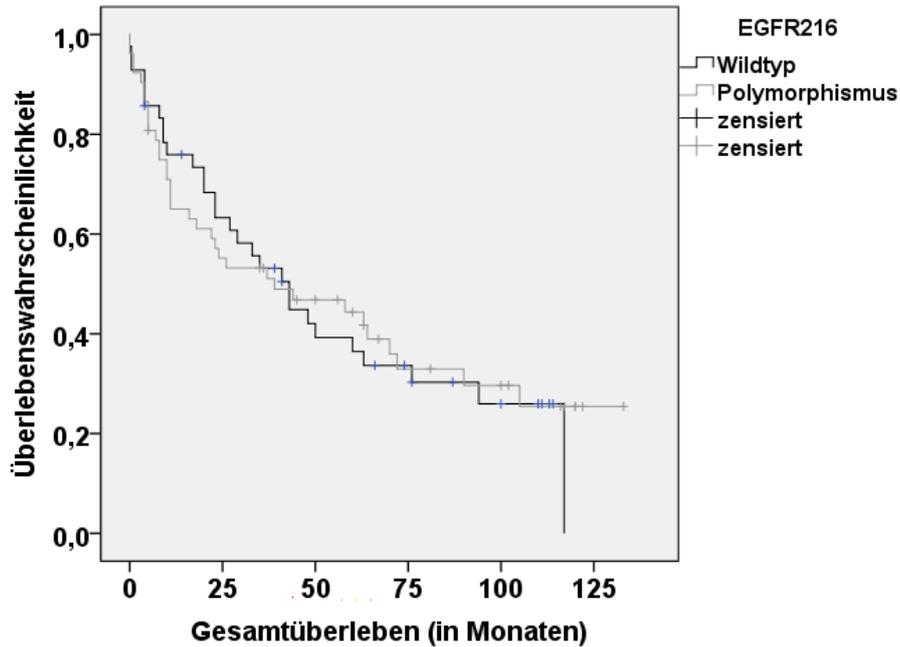


Abbildung 7 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom -216-Polymorphismus

Bezüglich der -191-Stelle zeigten Patienten mit Wildtyp-Promotor ein mittleres Überleben von 58,3 Monaten und eine 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 55,8%, 43,2% bzw. 23,2% im Vergleich zu einem mittleren Überleben von 51,8 Monaten bzw. einer 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 45,8%, 37,0% bzw. 21,6% der Patienten mit -191-Polymorphismus ($p=0,679$) (Abb. 8).

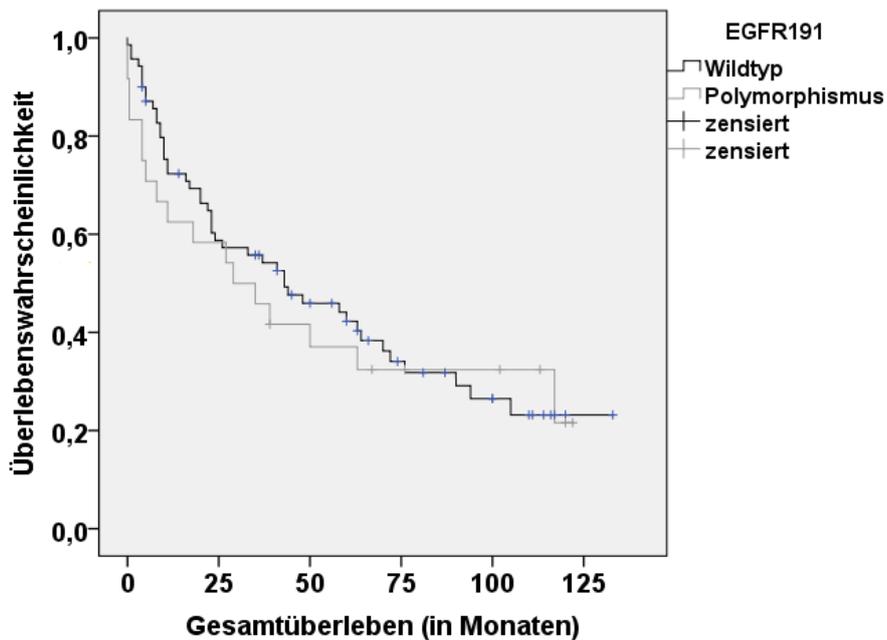


Abbildung 8 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom -191-Polymorphismus

3.3.2. G/A Austausch an Position 497

3.3.2.a. Häufigkeiten

Es wurden 94 DNA-Proben erfolgreich auf den 497-Status überprüft. Davon hatten 6 (6,4%) Probanden den Genotyp AA, 31 (33%) hatten AG und die größte Gruppe mit 57 (60,6%) Vertretern war homozygot für das Wildtyp Allel GG.

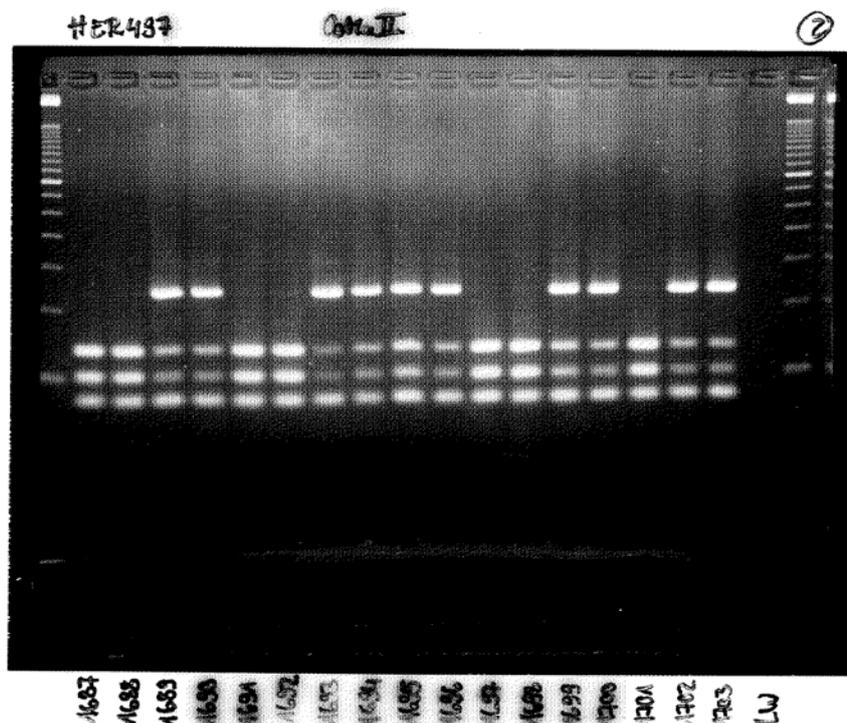


Abbildung 9 - Gelelektrophorese Polymorphismus 497

3.3.2.b. Korrelation des 497-Polymorphismus und EGFR-Expression

Es standen 88 Proben zum Vergleich von immunhistochemischer EGFR-Expression und genetischem EGFR-497-Status zur Verfügung. Es bestand kein statistisch relevanter Zusammenhang zwischen diesen beiden (siehe Tabelle 4 unter 3.3.1.b.).

3.3.2.c. Korrelation des 497-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Daten

Bei Korrelation zwischen EGFR-497-Status und klinisch-pathologischen Daten ließen sich mehrere Zusammenhänge feststellen (Tabelle 6). Der Polymorphismus AA findet sich signifikant häufiger bei fortgeschrittenem T, N und M Stadium. Außerdem ist er mit jüngerem Alter und männlichem Geschlecht assoziiert. Auch liegen bei einem 497-Polymorphismus ein

tendenziell höheres UICC Stadium sowie häufiger eine Gesamtmetastasierung vor. Grading, Lokalisation und Rezidivhäufigkeit korrelieren nicht mit dem Polymorphismus.

497		GG (WT)	GA	AA (Poly)	p*	p**
Alter		69,18	66,32	56,17	0,013	0,046
Sex					0,047	0,014
M	54	27 (50%)	23 (42,6%)	4 (7,4%)		
W	40	30 (75%)	8 (20%)	2 (5,0%)		
T					0,056	0,823
1	4	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)		
2	23	15 (65,2%)	8 (34,8%)	0 (0%)		
3	41	23 (56,1%)	17 (41,5%)	1 (2,4%)		
4	26	16 (61,5%)	5 (19,2%)	5 (19,2%)		
N					0,025	0,472
0	48	32 (66,7%)	15 (31,3%)	1 (2,1%)		
1	20	11 (55,0%)	9 (45,0%)	0 (0%)		
2	26	14 (53,8%)	7 (26,9%)	5 (19,2%)		
M					0,043	0,250
0	60	39 (65%)	20 (33,3%)	1 (1,7%)		
1	34	18 (52,9%)	11 (32,4%)	5 (14,7%)		
Stage					0,255	0,573
1	21	14 (66,7%)	7 (33,3%)	0 (0%)		
2	22	15 (68,2%)	6 (27,3%)	1 (4,5%)		
3	18	11 (61,1%)	7 (38,9%)	0 (0%)		
4	33	17 (51,5%)	11 (33,3%)	5 (15,2%)		
Grading					0,502	0,296
1	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0 (0%)		
2	67	38 (56,7%)	25 (37,3%)	4 (6%)		
3	20	13 (65,0%)	5 (25%)	2 (10%)		
Lok					0,698	0,400
proximal	38	25 (65,8%)	11 (28,9%)	2 (5,3%)		
distal	56	32 (57,1%)	20 (35,7%)	4 (7,1%)		
Rezidiv					0,968	0,943
0	81	49 (60,5%)	27 (33,3%)	5 (6,2%)		
1	13	8 (61,5%)	4 (30,8%)	1 (7,7%)		
M ges.					0,269	0,298
0	47	31 (66,0%)	15 (31,9%)	1 (2,1%)		
1	46	26 (56,5%)	15 (32,6%)	5 (10,9%)		
8	1	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)		

Tabelle 6- Korrelation des 497-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Daten: Die Analyse erfolgte (*) für die einzelnen Gruppen getrennt sowie (**) gruppiert als Wildtyp vs. Polymorphismus

In der Überlebensanalyse nach Kaplan Meier war das mittlere Überleben der Patienten mit Wildtyp mit 51,8 Monaten kürzer als das der Patienten mit Polymorphismus von 62,4 Monaten ($p=0,472$) (Abb. 10). Die 3-, 5- und 10- Jahresüberlebensrate betrugen 52,6%, 39,0% und 21,4% für Wildtyp-Patienten im Vergleich zu 54,0%, 44,0% und 23,1% der Patienten mit Polymorphismus.

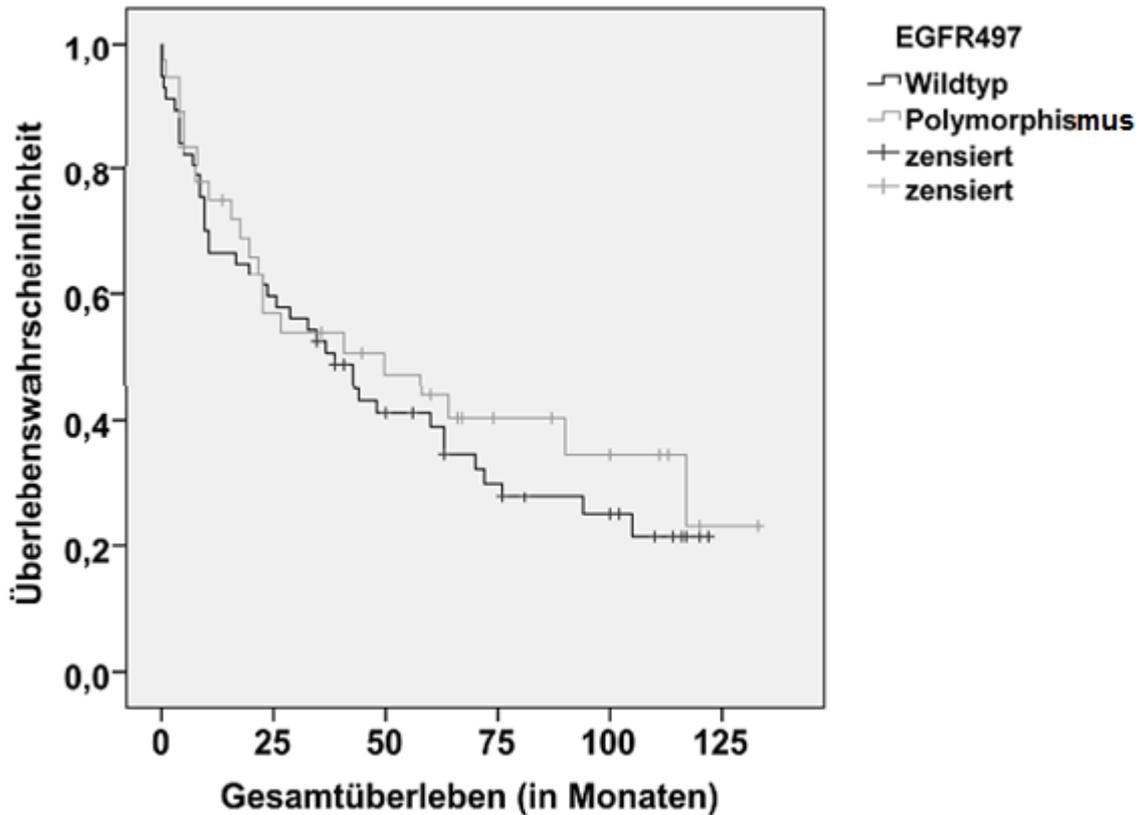


Abbildung 10 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom 497-Polymorphismus

In der nach Geschlechtern getrennten Analyse ergab sich für die Männer ein tendenziell höheres T-, N-, M- und UICC-Stadium und ein schlechterer Differenzierungsgrad bei Vorliegen eines Polymorphismus (Tab. 7). Die Frauen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen EGFR-497-Polymorphismus und Metastasierung sowie einen Trend zu höherem UICC Stadium und häufigerer Gesamtmetastasierung.

	Männer						Frauen					
	N	GG (WT)	GA	AA (Poly)	p*	p**	N	GG (WT)	GA	AA (Poly)	p*	p**
Alter	54	68,67	66,26	55,75	0,067	0,168	40	69,63	66,50	57,00	0,257	0,214
T					0,085	0,957					0,854	0,830
1	2	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)			2	2 (100%)	0	0		
2	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0 (0%)			12	9 (75%)	3 (25,%)	0		
3	24	11 (45,8%)	13 (54,2%)	0(0%)			17	12 (70,6%)	4 (23,5%)	1 (5,9%)		
4	17	9 (52,9%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)			9	7 (77,8%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)		
N					0,234	0,798					0,168	0,439
0	24	13 (54,2%)	10 (41,7%)	1 (4,2%)			24	19 (79,2%)	5 (20,8%)	0		
1	14	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0			6	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0		
2	16	8 (50%)	5 (31,3%)	3 (18,8%)			10	6 (60%)	2 (20%)	2 (20%)		
M					0,312	0,783					0,038	0,068
0	31	15 (48,4%)	15 (48,4%)	1 (3,2%)			29	24 (82,8%)	5 (17,2%)	0		
1	23	12 (52,2%)	8 (34,8%)	3(13%)			11	6 (54,5%)	3 (27,3%)	2 (18,2%)		
Stage					0,591	0,865					0,230	0,193
1	10	5 (50%)	5 (50%)	0 (0%)			11	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0		
2	10	6 (60%)	3 (30%)	1 (10%)			12	9 (75%)	3 (25%)	0		
3	12	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0 (0%)			6	6 (100%)	0	0		
4	22	11 (50%)	8 (36,4%)	3 (13,6%)			11	6 (54,5%)	3 (27,3%)	2 (18,2%)		
G					0,105	0,094					0,870	0,929
1	4	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)			3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0		
2	39	17 (43,6%)	20 (51,3%)	2 (5,1%)			28	21 (75%)	5 (17,9%)	2 (7,1%)		
3	11	6 (54,5%)	3 (27,3%)	2(18,2%)			9	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0		
Lok					0,728	0,580					0,474	0,456
Prox.	22	12 (54,5%)	8 (36,4%)	2 (9,1%)			16	13 (81,3%)	3 (18,8%)	0		
distal	32	15 (46,9%)	15 (46,9%)	2 (6,3%)			24	17 (70,8%)	5 (20,8%)	2 (8,3%)		
Rez.					0,632	1,00					0,687	0,810
0	48	24 (50%)	21 (43,8%)	3 (6,3%)			33	25 (75,8%)	6 (18,2%)	2 (6,1%)		
1	6	3 (50%)	2 (33,3%)	1(16,7%)			7	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0		
M ges					0,665	0,573					0,062	0,132
0	20	9 (45%)	10 (50%)	1 (5%)			27	22 (81,5%)	5 (18,5%)	0		
1	34	18 (52,9%)	13 (38,2%)	3 (8,8%)			12	8 (66,7%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)		
8	0						1	0	1 (100%)	0		

Tabelle 7 - Korrelation des 497-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Daten - geschlechtsspezifische Analyse. Die Analyse erfolgte (*) für die einzelnen Gruppen getrennt sowie (**) gruppiert als Wildtyp vs. Polymorphismus

In der Überlebensanalyse zeigten männliche Patienten mit Wildtyp-Promotor ein deutlich kürzeres mittleres Überleben von 39 Monaten und eine niedrigere 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 44,4%, 22,2% bzw. 14,8% im Vergleich zu einem mittleren Überleben von 63 Monaten bzw. einer 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von 52,9%,43,6% bzw. 31,0% der Patienten mit 497-Polymorphismus (p=0,124) (Abb. 11).

Bei den weiblichen Patienten korrelierte das Überleben nicht mit dem Genotyp (mittleres Überleben: 63 Monate vs. 61 Monate, p=0,759).

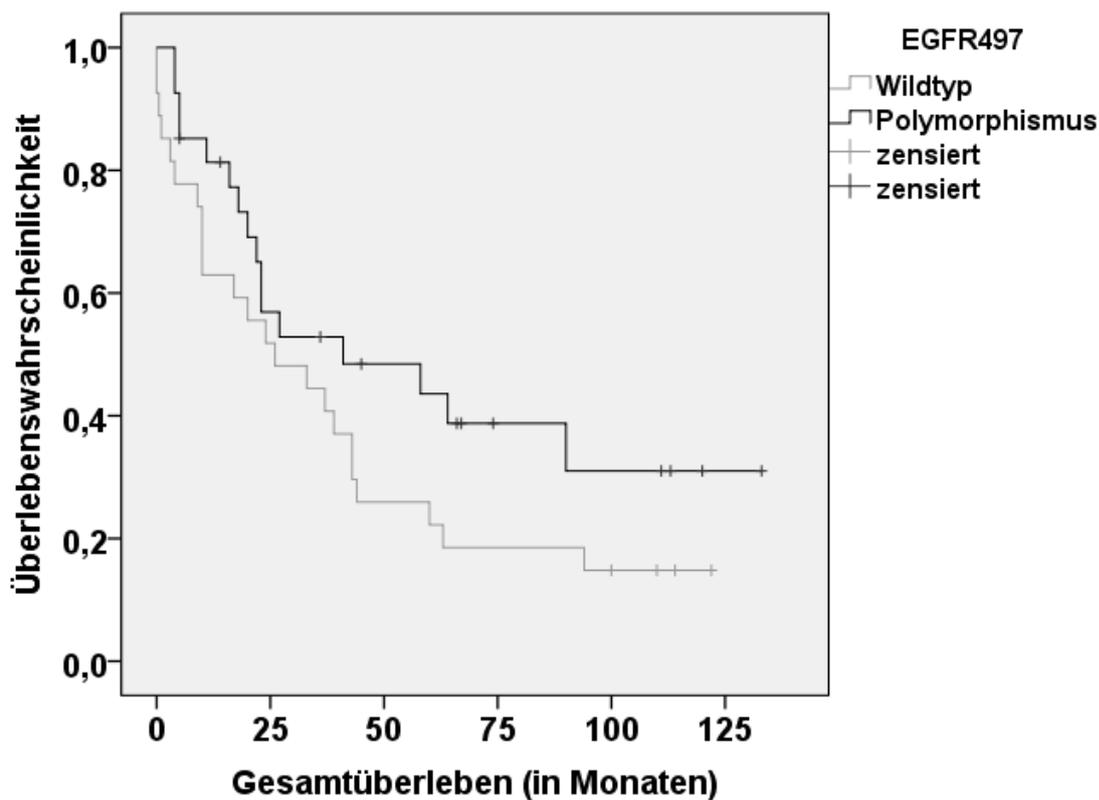


Abbildung 11 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom 497-Polymorphismus (nur männliche Patienten)

3.3.3. CA-Repeats in Intron 1

3.3.3.a. CA-Repeats Häufigkeiten und Gruppierung

Es wurden 81 Proben auf dieses Merkmal analysiert. Gegenstand der Untersuchung war die Anzahl der CA-Repeats, d.h. wie oft die Sequenz CA hintereinander in Intron 1 vorkam. Es wurden Frequenzen zwischen 14 und 21 gefunden. Der Mittelwert betrug 17,7.

Zur statistischen Untersuchung teilten wir die unterschiedlichen Genotypen in Gruppen ein. Zusammengefasst wurde einerseits die **Einzelallelängen**, d.h. die Anzahl der CA-Tandems jeweils getrennt für beide Allele. Wir gruppieren die Probanden in drei Gruppen. Die erste Gruppe KK (kurz-kurz) hatte zwei kurze Allele, die zweite KL (kurz-lang) ein kurzes und ein langes und die dritte LL (lang-lang) zwei lange Allele. Dabei wurden entsprechend der Literatur drei unterschiedliche Cut-off-Werte zur Definition von „lang“ und „kurz“ gewählt, und zwar jeweils bei 16, 18 und 20 CA-Repeats. Der Cut-off selbst zählte zur kürzeren Gruppe. Besaß beispielsweise ein Patient zwei Allele mit jeweils 16 CA-Repeats, so wurde er bei Cut-off 16 der Gruppe kurz-kurz (KK) zugeordnet.

Als zweite, ebenfalls an der Literatur orientierte, Gruppierungsvariante wurden die jeweiligen Repeats eines Patienten summiert. D.h. hatte ein Patient auf einem Allel 16 Repeats und auf dem anderen Allel lag die Anzahl 20 vor, so ergab sich eine Summe von 36. Das untersuchte Kollektiv zeigte **Allelsummenwerte** von 30 bis 41. Der Mittelwert betrug $35,4 \pm 2,5$. Es wurden jeweils die diskreten Summenwerte als Gruppen ausgewählt, d.h. alle Patienten mit Summe 36 bildeten eine Gruppe, alle mit Summe 37 eine weitere, alle mit Länge 38 eine weitere usw. Im zweiten Schritt wurde wiederum ein Cut-off gesucht und die Probanden in einer Gruppe mit Allelsumme kürzer als oder gleich lang wie der Cut-off einer Gruppe mit Allelsumme länger als der Cut-off gegenübergestellt. Als Cut-off dienten in der Korrelation mit der immunhistochemischen EGFR-Expression jeweils Allelsummen von 35, 36 bzw. 37.

3.3.3.b. Korrelation von CA-Repeats und EGFR-Expression

Die Ergebnisse zu der Gruppierungsvariante nach **Einzelallellängen** stellten sich wie folgt dar: Wenn man die Extremgruppen, d.h. zwei kurze mit zwei langen Allelen, verglich, fand sich in der kurzen Gruppe immer eine höhere Expression von EGFR. Dies bestätigte sich unabhängig vom gewählten Cut-off-Wert und sowohl für den prozentualen Anteil exprimierender Zellen (Proz) als auch den Immunreaktiven Score (IRS). Die Mittelgruppe bricht jedoch in allen Fällen aus. In der Gesamtheit der Gruppen ergibt sich daher unabhängig vom gewählten Cut-off-Wert keine statistisch signifikante Korrelation (Siehe Tabelle 9).

Im Vergleich der **Allelsummenwerte** ergaben sich über alle Längen von 32 bis 41 keine Signifikanzen. Auch hier haben die kürzesten Gruppen höhere Expressionswerte als die längsten, jedoch bricht alles dazwischen in verschiedene Richtungen aus. Wenn man die langen und kurzen Allelsummen gruppiert, egal ob man als Cut-off 35, 36 oder 37 wählt, sieht man ebenfalls bei den kurzen Summen höhere Werte sowohl im Immunreaktiven Score als auch der prozentualen Expression. Statistisch ergeben sich jedoch keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 8).

		n	EGFR IRS		EGFR Proz	
			MW ± SA	p	MW±SA	p
Cut off 16	KK	13	5,5±6,0	0,372	4,1±3,5	0,177
	KL	48	3,2±5,1		2,3±2,9	
	LL	20	3,6±5,3		2,6±3,1	
Cut off 18	KK	37	3,8±5,6	0,816	2,9±3,3	0,829
	KL	39	3,7±5,5		2,5±3,0	
	LL	5	2,2±2,4		2,2±2,4	
Cut off 20	KK	72	3,9±5,5	0,356	2,8±3,2	0,257
	KL	9	2,1±3,6		1,5±2,3	
	LL	0				
Summe	30	2	11,6±6,5	0,230	8,1±1,6	0,198
	32	11	4,1±5,5		3,0±3,0	
	33	8	4,3±5,6		3,3±3,5	
	34	11	1,2±2,4		1,3±2,4	
	35	4	0,4±0,8		0,4±0,8	
	36	24	4,9±6,6		3,4±3,7	
	37	6	1,4±2,1		1,5±2,1	
	38	8	2,1±2,8		2,2±2,8	
	39	2	5,3±7,4		2,6±3,7	
	40	3	3,0±2,8		3,0±2,8	
	41	2	1,5±2,1		1,5±2,1	
Summe Cut-off 35	≤35	36	3,3±4,9	0,706	2,5±3,1	0,737
	>35	45	3,7±5,4		2,8±3,2	
Summe Cut-off 36	≤36	60	3,9±5,7	0,213	2,9±3,4	0,311
	>36	21	2,3±3,0		2,1±2,4	
Cut-off 37	≤37	66	3,7±5,5	0,473	2,7±3,3	0,624
	>37	15	2,6±3,2		2,3±2,5	

Tabelle 8 - Korrelation von CA-Repeats und immunhistochemischer EGFR-Expression

3.3.3.c. Korrelation von CA-Repeats und klinisch-pathologischen Daten

Zur Darstellung der Zusammenhänge zwischen CA-Repeat-Länge und Klinik wurden erneut die vorher erläuterten Gruppierungsvarianten angewandt. Für die Darstellung der Gruppierung nach Einzelallelängen wurde der Cut-off 16 gewählt, da dieser in der Literatur eine dominante Rolle spielt (Tabelle 9). Bei den Allelsummen wurde aus demselben Grund die Daten bei einem Cut-off von 36 hier tabellarisch vorgestellt. (Tabelle 10)

	n (%)	SS	SL	LL	p-Wert
Gesamt	87	13 (14,9%)	50 (57,5%)	24 (27,6%)	
Alter	87	64,6	68,9	65,5	0,282
Geschlecht					0,451
Männlich	49	6 (12,2%)	31 (63,3%)	12 (24,5%)	
Weiblich	38	7 (18,4%)	19 (50%)	12 (31,6%)	
TNM-Klassifikation					0,440
Tumor					
T1	4	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	
T2	22	4 (18,2%)	13 (59,1%)	5 (22,7%)	
T3	38	7 (18,4%)	18 (47,4%)	13 (34,2%)	
T4	23	2 (8,7%)	17 (73,9%)	4 (17,4%)	
Lymphknotenstatus					0,534
N0	46	6 (13,0%)	26 (56,5%)	14 (30,4%)	
N1	18	4 (22,2%)	8 (44,4%)	6 (33,3%)	
N2	23	3 (13,0%)	16 (69,6%)	4 (17,4%)	
Metastasen					0,917
M0	56	9 (16,1%)	32 (57,1%)	15 (26,8%)	
M1	31	4 (12,9%)	18 (58,1%)	9 (29,0%)	
Grading					0,586
G1	7	2 (28,6%)	2 (28,6%)	3 (42,9%)	
G2	63	9 (14,3%)	38 (60,3%)	16 (25,4%)	
G3	17	2 (11,8%)	10 (58,8%)	5 (29,4%)	
UICC-Stage					0,697
I	21	4 (19,0%)	14 (66,7%)	3 (14,3%)	
II	20	2 (10%)	10 (50%)	8 (40%)	
III	16	3 (18,8%)	9 (56,3%)	4 (25%)	
IV	30	4 (13,3%)	17 (56,7%)	9 (30%)	
Tumorlokalisation					0,288
proximal	33	5 (15,2%)	22 (66,7%)	6 (18,2%)	
distal	54	8 (14,8%)	28 (51,9%)	18 (33,3%)	
Rezidiv					0,924
Nicht vorhanden	74	11 (14,9%)	42 (56,8%)	21 (28,4%)	
Vorhanden	13	2 (15,4%)	8 (61,5%)	3 (23,1%)	
Metastase gesamt					0,102
Nicht vorhanden	45	7 (15,6%)	23 (51,1%)	15 (33,3%)	
Vorhanden	41	5 (12,2%)	27 (65,9%)	9 (22,0%)	
	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tabelle 9 - Korrelation von CA-Repeats (Einzelallellängen) und klinisch-pathologischen Daten

Bei Cut-off 16 (**Einzelallellängen**) ergaben sich keine statistisch relevanten Zusammenhänge. Das mittlere Gesamtüberleben für Gruppe KK betrug 53,0±13 Monate, das von KL 54,8±6 Monate und in der Gruppe LL waren es 54,9±10 Monate (p=0,987). Wieder unterscheiden sich das Überleben der kurzen (KK) und der langen (LL) Gruppe deutlich, die Mittelgruppe bricht jedoch aus. (Abbildung 12) Bei Cut-off 18 bzw. 20 ergaben sich keine zusätzlichen Erkenntnisse.

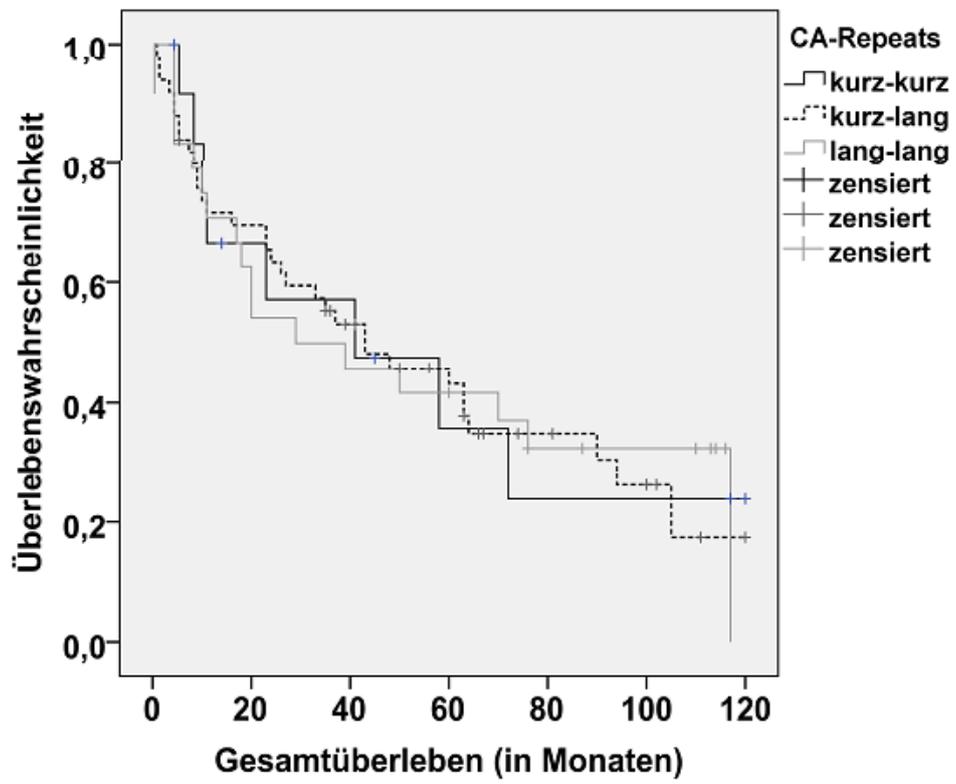


Abbildung 12 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CA-Repeatanzahl (Einzelallelängen, Cut-off 16)

	n (%)	(CA)n ≤36	(CA)n >36	p-Wert
Gesamt	87	62 (71,3%)	25 (28,7%)	
Alter	87	68,24	67,98	0,913
Geschlecht				0,316
Männlich	47	35 (74,5%)	12 (25,5%)	
Weiblich	40	27 (67,5%)	13 (32,5%)	
TNM-Klassifikation				0,718
Tumor				
T1	4	2 (50%)	2 (50%)	
T2	22	17 (77,3%)	5 (22,7%)	
T3	37	25 (67,6%)	12 (32,4%)	
T4	24	18 (75%)	6 (25%)	
Lymphknotenstatus				0,507
N1	48	34 (70,8%)	14 (29,2%)	
N2	19	12 (63,2%)	7 (36,8%)	
N3	20	16 (80%)	4 (20%)	
Metastasen				0,179
M0	58	39 (67,2%)	19 (32,8%)	
M1	29	23 (79,3%)	6 (20,7%)	
Grading				0,129
G1	6	3 (50%)	3 (50%)	
G2	65	50 (76,9%)	15 (23,1%)	
G3	16	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
UICC-Stage				0,598
I	20	15 (75%)	5 (25%)	
II	23	15 (65,2%)	8 (34,8%)	
III	16	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
IV	28	22 (78,6%)	6 (21,4%)	
Tumorlokalisation				0,688
proximal	32	24 (75%)	8 (25%)	
distal	55	38 (69,1%)	17 (30,9%)	
Rezidiv				0,609
Nicht vorhanden	76	54 (71,1%)	22 (28,9%)	
Vorhanden	11	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
Metastase gesamt				0,140
Nicht vorhanden	49	31 (63,3%)	18 (36,7%)	
Vorhanden	38	31 (81,6%)	7 (18,4%)	

Tabelle 10 - Korrelation von CA-Repeats (Allelsummen) und klinisch-pathologischen Daten

In Bezug auf die **Allelsummen** ergab sich eine Abhängigkeit des Überlebens vom Genotyp. Die Gruppe mit kürzerer Summe ≤36 überlebte im Mittel 54,5±7 Monate und damit kürzer als der Anteil >36 CA-Repeats, das im Mittel 62,8±10 Monate lebte. Die 3-Jahres-Überlebensrate betrug bei ≤36 Repeats 49,1% im Gegensatz zu >36 mit 64,0%. Bei 5 Jahren waren es jeweils 38,7% bzw. 47,1%. Entgegen des vorherigen Verlaufs waren jedoch nach 117 Monaten alle Patienten mit längerer Allelsumme verstorben. Die Gruppe hatte ein 10-Jahres-Überleben von 23,0%. Siehe auch Abbildung 13. Dadurch war der Zusammenhang nicht signifikant (p=0,434).

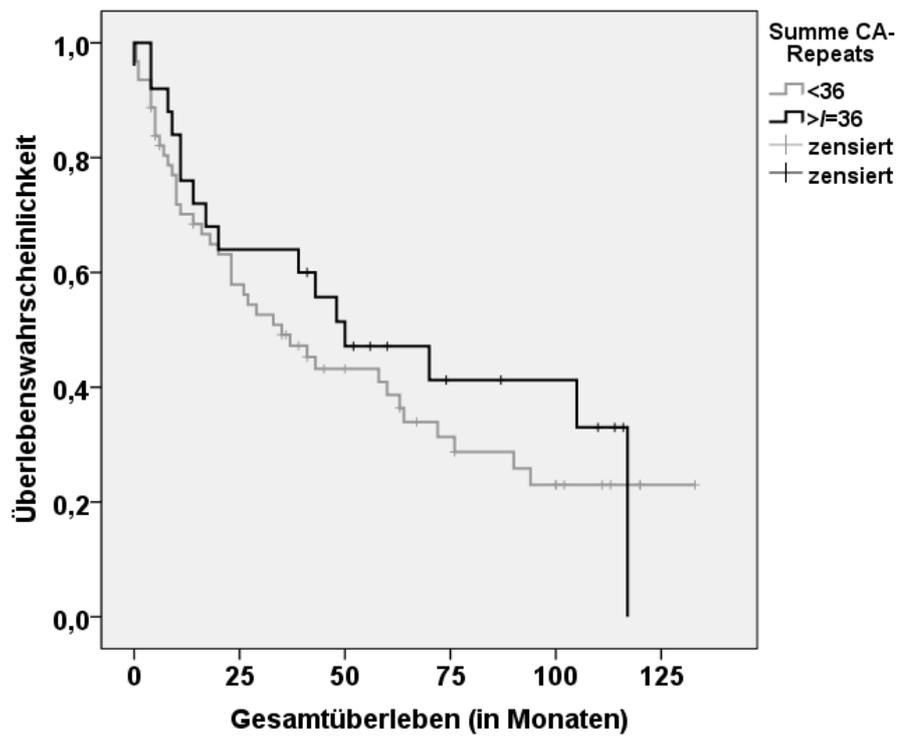


Abbildung 13 - Gesamtüberleben in Abhängigkeit von CA-Repeats (Allelsummen)

4. Diskussion

4.1. Patienten

Häufigkeiten: Das Kollektiv bestand aus 177 Individuen. 102 Patienten oder 57,6% waren männlich, 75 Personen oder 42,3% der Patienten waren weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 67,38 Jahre.

Die UICC-Stadienverteilung war wie folgt: Stadium I 34 (19,2%), Stadium II 49 (27,7%); Stadium III 43 (24,3%) und Stadium IV 51 (28,8%).

Dabei verteilten sich die Tumoren in 8 (4,5%) T1-Tumoren, bei 34 (19,2%) lag T2 vor, als T3 wurden 95 (53,7%) eingestuft und 40 (22,6%) als T4. Lymphknoteninvasion (N>0) fand sich bei 85 (48%) der Patienten, davon bei 44 (24,8%) bereits in fortgeschrittenem Stadium N2. Bei 53 Personen oder 30% der Patienten wurden Fernmetastasen festgestellt.

Zusammenfassend stimmte die Zusammensetzung des Patientenkollektivs bezüglich der Verteilung von Alter, Geschlecht und klinisch-pathologischer Parameter mit der aktuellen Literatur überein und ist somit als repräsentativ anzusehen ¹.

Prognose: Die mittlere Gesamt-Überlebenszeit war 48 Monaten, die 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten betragen 58,9%, 43,1% und 23,1%. Das Überleben war abhängig vom UICC-Stadium und den jeweiligen T-, N-, bzw. M- Kategorien, aber nicht von Geschlecht oder Lokalisation. Die untersuchte Gruppe ist damit hinsichtlich krankheitsfreiem und Gesamtüberleben repräsentativ. Unsere Zahlen liegen leicht unter der vom Robert-Koch-Institut angegebenen 5-Jahres-Überlebensrate von 52-63% ¹. Da unsere Patienten von 1995 bis 2006, damit Jahre vor Erscheinen der Robert-Koch-Zahlen, behandelt wurden, könnte ein mittlerweile verbessertes Therapieregime den Unterschied in der Mortalität erklären.

4.2. Immunhistochemie

Methodik: Die Methoden zum Nachweis der immunhistochemische Darstellung des EGF-Rezeptors waren weitestgehend etabliert. Das kontinuierlich als Positivkontrolle mitgeführte Plazentagewebe zeigte eine homogene Farbreaktion am Synzytiotrophoblasten ohne Artefakte. Die Technik der Tissue Microarrays ermöglicht eine simultane Analyse aller Proben hinsichtlich ihrer Proteinexpression unter identischen Untersuchungsbedingungen, so dass Unregelmäßigkeiten im Färbeprotokoll als Ursache für Expressionsunterschiede ausgeschlossen werden können.

Um eine mögliche Heterogenität im Expressionsprofil der Tumoren auszugleichen, wurde das Gewebe aus dem Tumorzentrum im Quadruplikat entnommen. Vor Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurde an Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparaten der Tissue Microarray von einem erfahrenen Pathologen sichergestellt, dass die Stenzen allesamt Tumorgewebe enthielten. Insgesamt waren durch ungenügende Trefferquote (Areale mit starker Entzündung und/oder Nekrose) oder durch ein Abschwimmen von Stenzen während der Färbeprozedur 7 der 177 eingeschlossenen Fälle (3,9%) nicht auswertbar.

Zwei Schwachpunkte des hier angewandten Fixier- und Färbeprotokolls müssen jedoch erwähnt werden, die zu Unregelmäßigkeiten im Färbeergebnis führen können und die Vergleichbarkeit der Proben untereinander sowie unseres Kollektives mit andere publizierten Studien einschränken: Zum einen hat die Fixierungsmethode einen starken Einfluss auf die Bindungseigenschaften des EGFR-Antikörpers. Atkins et al.¹⁶⁵ konnten in einer umfangreichen technischen Analysen zeigen, dass eine Fixierung der Proben länger als 24h oder in zu hoch konzentriertem Formalin (10% statt 4%) in einer zu starken Antikörperbindung und Farbreaktion und somit überbewertetem Expressionsscore resultiert. Um eine qualitativ hochwertige Aufarbeitung es Operationspräparates zu gewährleisten, d.h. z.B. Schnittländer, Tumortiefeninfiltration und Anzahl vorhandener/befallener Lymphknoten korrekt beurteilen zu können, werden jedoch kolorektale Tumorpräparate oftmals länger als 24h in formalinfixiert. Da der EGFR-Nachweis an Proben des Tumorresektates erfolgte, können so fixationsbedingte Unterschiede in der EGFR-Expressionsstärke in vorliegendem Untersuchungsgut nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wird aufgrund der therapeutischen Konsequenzen für aktuelle klinische Studien ein standardisierter immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors mit dem EGFR-pharmDx™-Antikörper Klon 2-18C9 (DakoCytomation) und dem Envision™ Visualisationsystem (Ventana Medical Systems) gefordert. Da diese Forderung zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Analysen noch nicht existierte, wurden in vorliegender Arbeit der EGFR-Antikörper Klon E30 (DakoCytomation) und das Detektionssystem iVIEW™ DAB (Ventana Medical Systems) verwendet. Obwohl die Auswertung nach gleichem, von der Firma DakoCytomation für klinische Studien empfohlenem Schema erfolgte, ist somit aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Antikörper die Vergleichbarkeit mit anderen Studien der Literatur eingeschränkt.

Häufigkeiten: Die Immunhistochemie war in unserem Kollektiv bei 64,3% der Betroffenen positiv für EGFR. 61 Tumoren banden keinerlei Antikörper. 88 Tumoren färbten sich

schwach positiv und 22 mäßig intensiv. Bei keinem Tumor fiel die immunhistochemische Reaktion stark positiv aus. Der durchschnittliche Anteil gefärbter Zellen lag bei 28,7%. Der mittlere IRS betrug 3,63 ($\pm 0,36$).

In der Literatur geht man von EGFR-Überexpression in 50-80% der CRC Patienten aus⁸³⁻⁸⁵. Unser Kollektiv bewegt sich ebenfalls in diesem Bereich.

Expression-Klinik: In unseren Untersuchungen zeigte sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und dem Überleben ($p=0,023$). Alle anderen klinisch-pathologischen Faktoren waren unabhängig.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Thesen. Generell wird aber davon ausgegangen, dass eine positive EGFR-Expression mit einer verschlechterten Prognose einhergeht. Dies trifft bei unterschiedlichen Tumorarten zu und ist insbesondere beim CRC bestätigt⁸⁹⁻⁹². Auch pathophysiologisch ist dies nachvollziehbar.

Zusätzlich ist die EGFR-Expression in einigen Publikationen mit höherem UICC-Stadium⁹³⁻⁹⁵, aggressiverem Invasionsverhalten und früherer Metastasierung assoziiert^{94,96}. Andere finden genau wie wir keinen Zusammenhang zum TNM Stadium⁸⁹.

Insofern stimmen wir mit dem Großteil der Literatur überein, dass eine erhöhte Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergeht. Unsere Daten geben dafür aber keinen Mechanismus her. Es wäre eigentlich zu erwarten, dass das verkürzte Überleben beispielsweise durch eine aggressivere Metastasierung zustande kommt. Vermutlich ist unser Kollektiv für den statistischen Nachweis feinerer Trends zu klein. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass durch die Verwendung von Tissue Microarrays, welche Gewebe des Tumorzentrums enthielten, nicht die Möglichkeit der Beurteilung der Invasionsfronten der Tumoren gegeben war. Zwar fand sich in vorliegendem Kollektiv eine homogene Expression der aus dem Tumorzentrum entnommenen Gewebestanzten. Für die Invasionsfront ist jedoch eine heterogene Expression und eine daraus resultierende fehlende Korrelation zwischen Grad der EGFR-Expression und klinisch-pathologischen Parametern beschrieben worden¹²⁷. Es ist aber auch nicht von der Hand zu weisen, dass einige Autoren generell keinen Zusammenhang zwischen EGFR-Status und Prognose bzw. Überleben fanden^{85,166-170}. Immer wieder wurde daher diskutiert, ob die Immunhistochemie die geeignete Methode ist, um die EGFR-Expression zu messen^{83,165}. Zum Untersuchungszeitpunkt stellt die Immunhistochemie jedoch ein lange etabliertes State-of-the-Art Verfahren dar, das allgemein der Standard für diese Fragestellung ist⁹⁶.

Auch bei der Indikationsstellung für den therapeutischen Einsatz von EGFR-Inhibitoren wird die Immunhistochemie immer noch gefordert. In Bezug auf diese Indikation mehren sich allerdings Zweifel an Ihrer Aussagekraft^{126,130,161}.

Mehrere klinische Studien zeigten, dass kein Zusammenhang zwischen dem EGFR-Status und dem Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren besteht: So korrelierte das Ansprechen auf den EGFR-Inhibitor Cetuximab nicht mit dem EGFR-Status¹²⁶ bzw. Patienten mit EGFR-negativem Karzinom zeigten eine ähnliche Ansprechrates wie EGFR-positive Patienten¹⁷¹. Andere immunhistochemische Studien identifizierten die Expression des EGF-Rezeptors in Kombination mit anderen Markern wie beispielsweise einer Negativität für den VEGF als positiven prädiktiven Marker für das Ansprechen auf eine präoperative Radiotherapie von cT3-Kolonkarzinomen¹⁷².

Vielmehr als die immunhistochemische EGFR-Expression ist die Mutation von KRAS, die sich in bis zu 50% der Kolonkarzinome findet¹⁴², ausschlaggebend für die Ansprechrates auf die derzeit zugelassenen EGFR-Inhibitoren. Das KRAS-Protein befindet sich in der EGFR-Signalkaskade downstream des EGF-Rezeptors. Die Mutation des KRAS-Gens führt zu einer konstitutiv aktiven Signalübertragung – auch bei Blockade der Signalkaskade über den EGF-Rezeptor. Kolonkarzinome mit mutiertem KRAS-Gen sprechen daher nicht auf eine Anti-EGFR-Therapie an, und der Mutationsstatus von KRAS hat somit prädiktiven Wert hinsichtlich einer Anti-EGFR-Behandlung sowohl mit TKIs¹⁵² als auch mit MAbs^{139,140}. In mehreren klinischen Studien zur Erst- und Zweitlinienbehandlung des metastasierten Kolonkarzinoms profitierten hauptsächlich Patienten mit KRAS-Wildtyp-Status von der Therapie mit den monoklonalen EGFR-Antikörpern Cetuximab (Erbix®) oder Panitumumab (Vecibix®), wohingegen Patienten mit KRAS-Mutation ein deutlich kürzeres progressionsfreies Überleben zeigten^{141,142,173–175}. Aufgrund dessen wird mittlerweile vor Einsatz eines EGFR-Inhibitors die Bestimmung des KRAS-Mutationsstatus zwingend gefordert.

4.3. Genetik

Die in der Molekulargenetik angewandten Methoden der DNA-Präparation, der PCR und der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse waren etabliert. Alle Tumorfälle, an denen diese Untersuchungen durchgeführt wurden, waren eindeutig auswertbar.

4.3.1. Polymorphismen im Promotorbereich

Frequenz: An der Stelle -216 fand sich bei 4 oder 4,2% Prozent der Probanden homozygot der Polymorphismus. 48 oder 51,1% waren heterozygot und 42 oder 44,6% der Probanden hatten auf beiden Chromosomen den Wildtyp GG. In der Literatur sieht die Verteilung wie folgt aus: 46%GG, 46%GT, 9%TT⁸³ bzw. GG32%, GT45%, TT23%¹⁰¹. Im Vergleich zu anderen Publikationen ist damit der Polymorphismus in unserem Kollektiv etwas unterrepräsentiert. Dies muss dem Zufall zugeschrieben werden. Es sind zwar ethnische Unterschiede beschrieben, aber bei unserem Kollektiv handelt es sich um Europäer (Kaukasier), bei denen in der Vergangenheit ein vergleichsweise hoher Anteil von bis zu 41,8% Polymorphismus gefunden wurde⁹⁹.

Bei -191 bestand der Polymorphismus AA bei 3 oder 3,2% der Fälle, 21 oder 22,3% waren heterozygot und bei 70 oder 74,5% war der Wildtyp CC erhalten. In der nur spärlich vorhandenen Literatur tritt der homozygote Austausch AA mit einer Frequenz von 13,6% auf⁹⁹. Auch für diesen Polymorphismus ist die Häufigkeit bei unserem Kollektiv deutlich niedriger als erwartet.

EGFR-Expression: Der Polymorphismus an der Stelle 216 zeigte in unseren Untersuchungen keinen Zusammenhang zur Höhe der EGFR Expression.

In mehreren Studien war der **-216T-Polymorphismus** signifikant mit einer höheren EGFR-RNA- und Proteinexpression assoziiert^{99,108,176}. Diese Studien wurden jedoch an verschiedenen Zelllinien wie von Mamma- und Nierenzellkarzinomen und insbesondere Zelllinien des NSCLC durchgeführt und basierten auf quantitativen Protein- und RNA-Bestimmungen. Nur einzelne Untersuchungen, beispielsweise die Analysen von Nomura et al. zum NSCLC, wurden an Gewebe resezierter Karzinome durchgeführt und fanden zumindest eine Korrelation zwischen Polymorphismus und erhöhter EGFR-Expression¹¹⁴.

Man findet aber etliche Studien, die zum selben Ergebnis kommen wie wir: Sowohl Spindler et al. als auch Milano et al. untersuchten den -216-Polymorphismus an Kolonkarzinomresektaten und konnten vergleichbar mit unseren Ergebnissen keinen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und RNA- oder Proteinexpression feststellen^{83,177}. Insbesondere lag keine Korrelation des -216-Status und der immunhistochemischen Expression von EGFR vor, so dass die Immunhistochemie als invalide Methode zum Nachweis der EGFR-Expressionsstärke diskutiert wurde⁸³. Auch bei anderen Tumorarten, beispielsweise dem Astrozytom, findet sich kein Zusammenhang zwischen -216-Status und EGFR-Expression¹⁷⁸.

Weiterhin ergab sich kein Zusammenhang zwischen -216-Status und **klinisch-pathologischen Faktoren oder Überleben**. Ein solcher Zusammenhang wurde bisher nur theoretisch postuliert. Auswirkungen auf das Überleben konnten bisher weder beim CRC noch bei anderen Karzinomen (Glioblastoma multiforme¹⁷⁹, Astrozytom¹⁷⁸) nachgewiesen werden.

Mittlerweile gibt es Studien an primären Kolonkarzinomzelllinien bzw. zum NSCLC, die eine durch den Genotyp an Stelle 216 verändertes Ansprechen¹⁰⁸ oder Prognose unter EGFR-Inhibitor-Therapie zeigen^{154,157}. Patienten mit fortgeschrittenem Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom zeigten so bei Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren bei einem -216G/T-Genotyp ein höheres Ansprechen (62,5% vs. 27,4%, $p=0.057$) sowie ein längeres progressionsfreies Überleben (16.7 vs. 5.1. Monate, $p=0.005$) als Patienten mit einem -216G/G-Genotyp¹⁸⁰. TKIs wurden bei unserem Kollektiv für die primäre Therapie zwar nicht eingesetzt, allerdings könnte beim Auftreten von Metastasen oder einem Rezidiv eine Therapie mit spezifischen Inhibitoren von Interesse und der Nachweis des EGFR-Status dann Voraussetzung für die Therapie sein. Es gibt außerdem Autoren, die einen Zusammenhang von -216 mit Ansprechen auf Radiochemotherapie oder bestimmten Chemotherapeutika beschreiben^{108,181}. So korrelierte beispielsweise in einer Studie an 77 Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom der EGFR-216 G/T-Polymorphismus im Vergleich zur GG-homozygoten Variante signifikant mit dem Ansprechen auf Radiochemotherapie mit 65Gy und Uftoral (=5-FU-Prodrug Tegafur + Uracil) (65% vs. 34%, $p=0.023$)¹⁸¹.

Was den **Polymorphismus an Stelle -191** angeht, fanden wir keinerlei Zusammenhang zu EGFR-Expression oder klinisch-pathologischen Faktoren. Für den Polymorphismus -191 war eine klinische Relevanz nur aufgrund seiner Position in der Sequenz vermutet worden. Diese bestätigte sich jedoch für den Polymorphismus alleine nie klinisch oder experimentell. Lediglich in Zusammenhang mit dem KRAS-Status konnte eine Untersuchung von Dahan et al. an einem Kollektiv von 58 Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom und Cetuximab-Therapie zeigen, dass KRAS-Wildtyp-Patienten mit EGFR -191 C/A-Polymorphismus ein längeres progressionsfreies Überleben aufwiesen¹⁸². Unterschiede im Gesamtüberleben fanden sich hier jedoch nicht.

Einschränkend zur eigenen Studie ist anzumerken, dass unsere Fallzahlen gering sind. Es waren nur vier bzw. drei Probanden homozygot in Bezug auf den jeweiligen Polymorphismus. Da die postulierten genetisch-klinischen Zusammenhänge jedoch auch in anderen Studien häufig nur mit Schwierigkeiten, z.B. in Abhängigkeit von gewissen

Therapieregimen nachgewiesen werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass wir bei einer größeren Patientenzahl zu anderen Ergebnissen gekommen wären.

4.3.2. G/A Austausch an Position 497

Häufigkeiten: In unserem Kollektiv waren 6 (6,4%) Probanden homozygot für den Polymorphismus AA, 31 (33%) hatten AG und mit 57 (60,6%) Vertretern die größte Gruppe war homozygot für das Wildtyp Allel GG. Im Vergleich zur Literatur (17% homozygot AA und 39% heterozygot GA, 43% der Patienten zeigen den Wildtyp GG^{98,106}) sind damit bei uns die Verhältnisse leicht zugunsten des Wildtyps verschoben.

EGFR-Expression: Es bestand kein relevanter Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und G497A Status. In der Literatur verhält es sich ebenso^{108,109}.

Was die **klinisch-pathologischen Daten** angeht, so korreliert der Polymorphismus signifikant mit höherem T, N, M, jüngerem Alter und männlichem Geschlecht. Daraus ergibt sich eine Tendenz zu höherem UICC Stadium, die allerdings nicht statistisch signifikant ist.

Trotzdem zeigt der Polymorphismus im Vergleich zu der Gegengruppe aus Wildtyp und Heterozygoten ein längeres **Gesamtüberleben**. Das mittlere Überleben der Patienten mit Polymorphismus ist mit 62,4 Monaten länger als das der Patienten mit Wildtyp von 51,8 Monaten ($p=0,472$). Die 3-, 5- und 10- Jahresüberlebensrate unterscheiden sich entsprechend. Dies ist bemerkenswert, da es im Gegensatz zu dem höheren T, N, M Stadium steht.

In der Literatur ist der homozygote Polymorphismus in Bezug auf Prognose ebenfalls der günstigere genetische Fall: Die Patienten überleben länger. Einige Autoren finden einen positiven Einfluss der Lysin-Variante auf Prognose und Überleben. Das kommt dort durch eine geringere Rückfallquote¹⁰⁶, weniger aggressive Invasion und Metastasierung und höhere Empfindlichkeit auf Chemotherapie¹⁰⁷ zustande. Bei Wang et al. ist der 497-Genotyp sogar ein unabhängiger prognostischer Faktor. Allerdings konnten nicht alle Autoren diesen Zusammenhang nachvollziehen¹⁸³.

Unter Cetuximab-Therapie, die bei uns allerdings nicht eingesetzt wurde, fand sich bei manchen Autoren ein positiver Zusammenhang zwischen 497-Polymorphismus und Überleben. So zeigten in einer klinischen Phase-II-Studie zur Monotherapie mit Cetuximab Patienten mit EGFR +497 G>A Genotyp ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit dem Wildtyp oder anderen Genotypen (2.6 Monate vs. 1.3 Monate, $p=0.017$), wobei dieser Polymorphismus in der Multivariatanalyse – unabhängig

vom KRAS-Mutationsstatus - sogar als unabhängiger Prognosefaktor des metastasierten Kolonkarzinoms identifiziert werden konnte¹³⁷. In anderen Publikationen ließ sich dies nicht nachweisen¹²⁹.

Bei anderen Karzinomarten finden sich ebenfalls unterschiedliche Trends: Auch bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) und Mammakarzinomen fand man eine bessere Prognose bzw. günstigere klinische Situation beim Polymorphismus^{184,185}. Beim Ösophagus-Karzinom lässt sich kein Zusammenhang feststellen^{186,187}, beim Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zeichnet er sich lediglich bei Lymphknoten-positiven Tumoren ab.

Wir untersuchten die Auswirkungen des G/A-Austausches an Position 497 des EGF-Rezeptors auf klinisch-pathologische Faktoren auch **geschlechtergetrennt**. Hierbei ergaben sich die genannten Veränderungen vor allem in der Männergruppe. Männer mit Polymorphismus zeigten das o.g. höhere T-, N-, M- und UICC-Stadium sowie das paradox verlängerte Überleben (63 Monate vs. 39 Monate, $p=0,124$). Bei Frauen waren M- und UICC-Stadium mit dem Genotyp assoziiert, das Überleben jedoch nicht.

Das heißt dass die Hauptveränderungen im Kollektiv hauptsächlich auf die Männer zurückgehen.

In der Literatur gibt es einen Artikel, der einen geschlechtsabhängig gegensätzlichen Einfluss des 497G/A-Austausches auf die Prognose beschrieb. In diesem war bei Patienten mit metastasiertem Kolon-Karzinom die Prognose der Polymorphismus-Träger verbessert, wenn der Betroffene ein Mann, jedoch verschlechtert, wenn der Patient weiblichen Geschlechts war⁹⁸. Bei unserem Kollektiv war die Prognose für Männer mit Polymorphismus tatsächlich verbessert, die für Frauen war unabhängig vom Genotyp. Geschlechtsabhängige Effekte könnten z.B. durch den Einfluss von Östrogenrezeptoren auf EGFR vermittelt werden¹⁸⁸.

4.3.3. CA Repeats in Intron 1

Häufigkeiten. Wir fanden CA-Frequenzen zwischen 14 und 21. Der Mittelwert betrug 17,7. Die häufigsten Allele in unserem Kollektiv waren 16 (42,0%), 20 (23,0%) und 18 (16,1%). Das entspricht den Angaben in der Literatur. Dort fanden sich Allel-Repeatzahlen zwischen 14 und 24 bzw. 14 bis 22. Die häufigsten Genotypen waren 16, 18 und 20^{98,99,101,106}. Es scheint interethnische Unterschiede zu geben¹¹³. Unser Kollektiv ist aber ethnisch homogen.

Die Gruppierungen wurden in der Literatur unterschiedlich gehandhabt. Die o.g. Studien teilen teilweise nach Einzelallelängen ein, wobei meist der Cut-off 16 gewählt wurde, teilweise auch 17. Auch Allelsummenvergleiche wurden durchgeführt, meist mit Cut-off 36.

EGFR-Expression. In unseren Untersuchungen zeigt sich bei längeren Allelen eine geringere Expression. Dieser Trend erreicht zwar keine statistische Signifikanz, bestätigt sich aber unabhängig von der gewählten Gruppierungsart oder der immunhistochemischen Maßparameter (Immunreaktiver Gesamtscore IRS oder prozentualer Anteil EGFR-exprimierender Zellen), zu der korreliert wird.

Andere Autoren finden keinen Zusammenhang zwischen CA-Genotyp und EGFR Expression bei CRC^{85,189}, in verschiedenen Tumorzelllinien beispielsweise des Mamma- Nierenzell- oder Kolonkarzinoms¹⁰⁸ oder beim Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC)⁸⁰.

Größtenteils kommt die Literatur aber zum selben Ergebnis wie wir: Längere CA-Repeats sind mit geringerer EGFR-Expression assoziiert. Gebhardt et al. finden bei sehr langen CA-Repeats von 21 beispielsweise nur 20 % der Transkriptionsaktivität von CA-16. Dies ist in anderen Publikationen durchaus statistisch signifikant, sowohl beim CRC^{109,116,119} als auch bei fortgeschrittenem Magenkarzinom¹³⁵, Lungenkarzinom¹⁹⁰ Mammakarzinomzellen¹⁹¹ und Osteosarkom¹⁹². Auch in gesundem Lungengewebe und Bronchialepithelzellen findet sich dieser Zusammenhang¹⁹³. Außerdem war ein langes Allel mit einer geringeren Rate an KRAS-Mutationen behaftet¹¹⁶. Eine Verlängerung scheint besonders auch im Rahmen von Mikrosatelliten-Instabilität vorzukommen, ist aber nicht an als Teil der Kanzerogenese zu sehen^{116,189}. Bei dem in unserer Arbeit untersuchten Kollektiv wurde jedoch eine Mikrosatelliteninstabilität bei allen Patienten im Rahmen anderer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen.

Klinisch-pathologische Daten: Bei uns ergab sich kein Zusammenhang zu UICC Stadium oder histologischen Daten.

Prognose/Überleben In unseren Untersuchungen zeigte sich in der Gruppierung nach Allelsummen ein statistisch allerdings nicht signifikanter Zusammenhang zwischen CA-Status und Überleben ($p=0,434$). Die längere Gruppe zeigt dabei zunächst das jeweils höhere Überleben zu einem bestimmten Zeitpunkt. Gegen Ende des Beobachtungszeitraums waren jedoch entgegen des vorherigen Verlaufes alle Individuen der Gruppe >36 Repeats verstorben. Sonst wäre die bessere Prognose möglicherweise statistisch signifikant gewesen.

Ein längeres Überleben bei längeren CA-Repeats ist pathophysiologisch einleuchtend, da mehr Repeats wie oben beschrieben geringere EGFR-Expression zur Folge haben. Erhöhte EGFR-Spiegel sind mit schlechterer Prognose assoziiert. Man erwartet also von längeren Allelen bessere Verläufe. Dieser Effekt wurde auch von anderen Autoren beim CRC beschrieben: Längere CA-Repeats gehen mit geringerem Rückfall-Risiko einher^{106,183}. Die Überlebenszeit ist verlängert¹⁹⁴. Auch beim Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und beim Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) konnte ein Zusammenhang zwischen längeren Allelen und längerem Überleben nachgewiesen werden^{184,195}.

Es gibt zwar gegensätzliche Berichte: Bei McKay et al. und Etienne-Grimaldi et al. besteht kein Zusammenhang zwischen Überleben (McKay)⁸⁵ bzw. Stadium und Histologie (Etienne-Grimaldi)⁸⁰ und CA-Repeat Länge. Bei McKay et al. ergibt sich aber auch schon keine Assoziation von CA-Repeats und Expression, die allgemein für den vermittelnden Mechanismus der Prognoseänderung gehalten wird^{80,85}.

Press et al. fanden einen bei Frauen und Männern gegenläufigen Trend CA-Repeat - Überleben, der noch stärker wurde wenn man den Polymorphismus G497A mit einrechnet. Bei uns zeigten sich für den zweiten Polymorphismus aber keine gegensätzlichen Trends entsprechend Press' Vermutungen⁹⁸. Der CA-Repeat wurde von uns nicht geschlechtergetrennt untersucht.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland der zweithäufigste maligne Tumor bei beiden Geschlechtern. Die Rolle von EGFR in seiner Karzinogenese ist in der Vergangenheit gut beschrieben und hat zur Entwicklung von neuen Medikamenten geführt, die spezifisch den EGF-Rezeptor inhibieren.

Vier Polymorphismen, die im Bereich des EGFR-Gens auftreten, haben möglicherweise Auswirkungen auf die Expression des Genprodukts und damit auf Verlauf und Prognose. Wir haben den Zusammenhang zwischen diesen Polymorphismen und EGFR Expression, sichtbar gemacht durch Immunhistochemie, sowie klinisch-pathologischen Daten untersucht. Dafür wurden die Einzelbasenaustausch-Polymorphismen an den Positionen -216 und -191 und der G/A-Austausch an Position 497 des EGF-Rezeptors für 94 Patienten sowie die Anzahl der CA-Repeats in Intron 1 für 81 Patienten mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse untersucht. Die immunhistochemische Detektion der EGFR-Expression erfolgte für 177 Patienten an Tissue Microarrays.

In der Literatur wird die Bedeutung aller dieser Polymorphismen widersprüchlich diskutiert.

Unsere Daten zeigen keine Assoziation der Promotor-Polymorphismen mit EGFR-Expression oder klinisch-pathologischen Daten.

Der Polymorphismus an Stelle 497 hatte einen nicht signifikanten positiven Einfluss auf das Überleben ($p=0,124$), war dabei aber auch mit höherem T, N, M assoziiert. Die EGFR-Expression blieb von dieser genetischen Variante unberührt.

Die CA-Repeats zeigten einen Trend zu niedrigerer EGFR-Expression bei längeren Repeatzahlen, dies bestätigt sich unabhängig von der Art der Gruppierung. Das Überleben war von längeren Repeats positiv beeinflusst, der Zusammenhang aber statistisch nicht signifikant ($p=0,434$). Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Autoren.

Unsere Ergebnisse bestätigen zwar häufig zuvor gefundene Zusammenhänge, konnten aber in Bezug auf die meisten Veränderungen keine statistische Signifikanz erreichen. Das könnte auch an den geringen Gruppengrößen liegen: in unserem Kollektiv lag die Homozygotenfrequenz von drei der untersuchten Polymorphismen deutlich unter der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit. Größere Studien sind vonnöten um die Relevanz der Polymorphismen zu belegen.

6. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe. Berlin, 2012.
2. Robert Koch Institut (Hrsg.), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (Hrsg.). Krebs in Deutschland 2005/06, 7. Ausgabe. Berlin: Robert Koch Institut, 2009.
3. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br. Med. Bull.* 2002;64:1–25.
4. Ströhle A, Wolters M, Hahn A. Folic acid and colorectal cancer prevention: molecular mechanisms and epidemiological evidence (Review). *Int. J. Oncol.* 2005;26:1449–64.
5. Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W. S3-Leitlinie "Kolorektales Karzinom", Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI und VII). *Z Gastroenterol* 2008;(46):1–73.
6. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 1968;40:43–68.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759–67.
8. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235–7.
9. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur. J. Cancer* 1999;35:1986–2002.
10. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994;35:1590–2.
11. Strul H, Kariv R, Leshno M, et al. The prevalence rate and anatomic location of colorectal adenoma and cancer detected by colonoscopy in average-risk individuals aged 40-80 years. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:255–62.
12. Wittekind C. TNM, Klassifikation maligner Tumoren. 7th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2010. 295 p. ISBN: 9783527327591.
13. Wittekind C. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 6th ed. International Union against Cancer. Heidelberg: Springer Medizin, 2005. 223 p. ISBN: 3540436642.
14. Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J. Clin. Oncol.* 2003;21:2912–9.
15. George S, Primrose J, Talbot R, et al. Will Rogers revisited: prospective observational study of survival of 3592 patients with colorectal cancer according to number of nodes examined by pathologists. *Br. J. Cancer* 2006;95:841–7.

16. Caplin S, Cerottini JP, Bosman FT, Constanda MT, Givel JC. For patients with Dukes' B (TNM Stage II) colorectal carcinoma, examination of six or fewer lymph nodes is related to poor prognosis. *Cancer* 1998;83:666–72.
17. Zirngibl H, Husemann B, Hermanek P. Intraoperative spillage of tumor cells in surgery for rectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1990;33:610–4.
18. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:3408–19.
19. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J. Clin. Oncol.* 2004;22:1797–806.
20. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:3109–16.
21. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355:1041–7.
22. Lenz H, van Cutsem E, Khambata-Ford S, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:4914–21.
23. 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;96:1420–5.
24. Haley J, Whittle N, Bennet P, Kinchington D, Ullrich A, Waterfield M. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res.* 1987;1:375–96.
25. Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002;110:763–73.
26. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110:775–87.
27. Riese DJ, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15:5770–6.
28. Groenen LC, Nice EC, Burgess AW. Structure-function relationships for the EGF/TGF-alpha family of mitogens. *Growth Factors* 1994;11:235–57.
29. Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995;80:213–23.
30. Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 1998;273:11987–90.

31. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767–78.
32. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16:1647–55.
33. Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:5042–51.
34. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 1996;15:2452–67.
35. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16:5276–87.
36. Ferguson KM, Darling PJ, Mohan MJ, Macatee TL, Lemmon MA. Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *EMBO J.* 2000;19:4632–43.
37. Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene* 2002;21:328.
38. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv. Cancer Res.* 2000;77:25–79.
39. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004;58:903–13.
40. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:127–37.
41. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211–25.
42. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer* 2001;8:11–31.
43. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355–65.
44. Meier R, Hemmings BA. Regulation of protein kinase B. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 1999;19:121–8.
45. Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer* 2005;103:2435–46.
46. Waterman H, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 2001;490:142–52.
47. Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 1999;274:8865–74.

48. Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 1999;4:1029–40.
49. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999;286:309–12.
50. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J. Biol. Chem.* 1998;273:13819–27.
51. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 1998;17:3385–97.
52. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000;19:6102–14.
53. Danielsen AJ, Maihle NJ. The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. *Growth Factors* 2002;20:1–15.
54. Burden S, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997;18:847–55.
55. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995;376:337–41.
56. Sibilina M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* 1998;17:719–31.
57. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J. Clin. Oncol.* 2002;20:110–24.
58. Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Alonso ME, et al. Gene dosage and mutational analyses of EGFR in oligodendrogliomas. *Int. J. Oncol.* 2007;30:209–15.
59. Liu L, Ichimura K, Pettersson EH, Collins VP. Chromosome 7 rearrangements in glioblastomas; loci adjacent to EGFR are independently amplified. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998;57:1138–45.
60. Wong K, Tsang YTM, Chang Y, et al. Genome-wide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array. *Cancer Res.* 2006;66:11172–8.
61. Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1993;103:42–52.
62. Sheu JJ, Hua C, Wan L, et al. Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009;69:2568–76.
63. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2003;21:3798–807.

64. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996;6:217-23; discussion 23-4.
65. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11:162-7.
66. Guérin M, Gabillot M, Mathieu MC, et al. Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int. J. Cancer* 1989;43:201-8.
67. Bellone S, Frera G, Landolfi G, et al. Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (EGF-R1) in cervical cancer: implications for Cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease. *Gynecol. Oncol.* 2007;106:513-20.
68. Shen L, Shui Y, Wang X, et al. EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy. *BMC Cancer* 2008;8:232.
69. Gullick WJ, Marsden JJ, Whittle N, Ward B, Bobrow L, Waterfield MD. Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res.* 1986;46:285-92.
70. Smith K, Fennelly JA, Neal DE, Hall RR, Harris AL. Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res.* 1989;49:5810-5.
71. Wright C, Mellon K, Johnston P, et al. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br. J. Cancer* 1991;63:967-70.
72. Neal DE, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990;65:1619-25.
73. Ghanem MA, van der Kwast TH, Den Hollander JC, et al. Expression and prognostic value of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor-alpha, and c-erb B-2 in nephroblastoma. *Cancer* 2001;92:3120-9.
74. Freeman SS, Allen SW, Ganti R, et al. Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer* 2008;113:1453-61.
75. Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2002;87:84-9.
76. Kedzia W, Schmidt M, Frankowski A, Spaczyński M. Immunohistochemical assay of p53, cyclin D1, c-erbB2, EGFR and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancers. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002;40:37-41.
77. Lee CM, Lee RJ, Hammond E, et al. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol. Oncol.* 2004;93:209-14.

78. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* 1999;5:577–86.
79. Brandt BH, Beckmann A, Gebhardt F, et al. Translational research studies of erbB oncogenes: selection strategies for breast cancer treatment. *Cancer Lett.* 1997;118:143–51.
80. Etienne-Grimaldi M, Pereira S, Magné N, et al. Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann. Oncol.* 2005;16:934–41.
81. Mellon JK, Cook S, Chambers P, Neal DE. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor levels in bladder cancer and their relationship to epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer* 1996;73:654–8.
82. Gamboa-Dominguez A, Dominguez-Fonseca C, Quintanilla-Martinez L, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod. Pathol.* 2004;17:579–87.
83. Spindler KG, Lindebjerg J, Nielsen JN, et al. Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: a comparison of methods. *Int. J. Oncol.* 2006;29:1159–65.
84. Giralt J, Eraso A, Armengol M, et al. Epidermal growth factor receptor is a predictor of tumor response in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002;54:1460–5.
85. McKay JA, Murray LJ, Curran S, et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur. J. Cancer* 2002;38:2258–64.
86. Park JH, Han S, Oh D, et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011;68:1045–55.
87. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331–46.
88. Cohen G, Mustafi R, Chumsangsri A, et al. Epidermal growth factor receptor signaling is up-regulated in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 2006;66:5656–64.
89. Giralt J, las Heras M de, Cerezo L, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74:101–8.
90. Zlobec I, Vuong T, Hayashi S, et al. A simple and reproducible scoring system for EGFR in colorectal cancer: application to prognosis and prediction of response to preoperative brachytherapy. *Br. J. Cancer* 2007;96:793–800.
91. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:3069–75.

92. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann. Surg. Oncol.* 2006;13:823–35.
93. Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg* 1990;77:1352–4.
94. Hemming AW, Davis NL, Kluftinger A, et al. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 1992;51:147–52.
95. Tampellini M, Longo M, Cappia S, et al. Co-expression of EGF receptor, TGF α and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch.* 2007;450:321–8.
96. Radinsky R, Risin S, Fan D, et al. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 1995;1:19–31.
97. Italiano A, Saint-Paul M, Caroli-Bosc F, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann. Oncol.* 2005;16:1503–7.
98. Press OA, Zhang W, Gordon MA, et al. Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphisms in metastatic colon cancer. *Cancer Res.* 2008;68:3037–42.
99. Liu W, Innocenti F, Wu MH, et al. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res.* 2005;65:46–53.
100. Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer H. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:1485–92.
101. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, et al. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008;26:1427–34.
102. Garm Spindler K, Pallisgaard N, Rasmussen AA, et al. The importance of KRAS mutations and EGF61AG polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2009;20:879–84.
103. Johnson AC, Ishii S, Jino Y, Pastan I, Merlino GT. Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J. Biol. Chem.* 1988;263:5693–9.
104. Gonçalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, et al. A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. *BMC Cancer* 2008;8: 169.
105. Huang C, Yang C, Yeh K, et al. EGFR intron 1 dinucleotide repeat polymorphism is associated with the occurrence of skin rash with gefitinib treatment. *Lung Cancer* 2009;64:346–51.

106. Zhang W, Park DJ, Lu B, et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:600–5.
107. Wang W, Chen P, Chiou T, et al. Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:3597–604.
108. Puyo S, Le Morvan V, Robert J. Impact of EGFR gene polymorphisms on anticancer drug cytotoxicity in vitro. *Molecular diagnosis & therapy* 2008;12:225–34.
109. Nie Q, Wang Z, Zhang G, et al. The epidermal growth factor receptor intron1 (CA) n microsatellite polymorphism is a potential predictor of treatment outcome in patients with advanced lung cancer treated with Gefitinib. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;570:175–81.
110. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:10217–21.
111. Brandt B, Hermann S, Straif K, Tidow N, Buerger H, Chang-Claude J. Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the egfr gene. *Cancer Res.* 2004;64:7–12.
112. Bielawski KP, Klos P, Welnicka-Jaskiewicz M, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism in healthy women in Poland. *Int. J. Biol. Markers* 2005;20:184–8.
113. Liu W, Innocenti F, Chen P, Das S, Cook EH, Ratain MJ. Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:1009–12.
114. Nomura M, Shigematsu H, Li L, et al. Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med.* 2007;4:e125.
115. Kharrat N, Al'Fadhli S, Rebai M, et al. (AC) dinucleotide repeat polymorphism in intron 1 of human EGFR shows ethnic specificities and high evidence for association with breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* 2007;22:258–64.
116. Baranovskaya S, Martin Y, Alonso S, et al. Down-regulation of epidermal growth factor receptor by selective expansion of a 5'-end regulatory dinucleotide repeat in colon cancer with microsatellite instability. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:4531–7.
117. Buerger H, Packeisen J, Boecker A, et al. Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J. Pathol.* 2004;203:545–50.
118. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res.* 2004;64:9139–43.
119. Gebhardt F, Bürger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by a polymorphic repetitive sequence--a link between genetics and epigenetics. *Int. J. Biol. Markers* 2000;15:105–10.
120. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 2007;14:295–304.

121. Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today* 2003;39 Suppl C:1–16.
122. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 2007;25:3712–8.
123. Fachinformation Erbitux® (Cetuximab), Stand Februar 2013, Merck KGaA, Darmstadt. Zulassungsnummern EU/1/04/281/003, EU/1/04/281/005. URL: <http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=008483&RL=Erbitux%26reg%3B%205%26nbsp%3Bmg/ml%20Infusionsl%26ouml%3Bsung>
124. Weiss KF. Letter of approval Cetuximab: FDA, 2004. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2004/125084ltr.pdf zuletzt geprüft 06.10.2013
125. Fachinformation Vectibix® (Panitumumab), Stand Juli 2013. Amgen Europe B.V., Breda, Niederlande. Zulassungsnummern EU/1/07/423/001, EU/1/07/423/002, EU/1/07/423/003, URL: <http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=010672&RL=Vectibix%26reg%3B%2020%26nbsp%3Bmg/ml%20Konzentrat%20zur%20Herstellung%20einer%20Infusionsl%26ouml%3Bsung>
126. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:1201–8.
127. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:337–45.
128. Peeters M, Siena S, van Cutsem E, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer* 2009;115:1544–54.
129. Zhang W, Gordon M, Press OA, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet. Genomics* 2006;16:475–83.
130. Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:3536–44.
131. Stintzing S, Kapaun C, Laubender RP, et al. Prognostic value of cetuximab-related skin toxicity in metastatic colorectal cancer patients and its correlation with parameters of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway: results from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group. *Int. J. Cancer* 2013;132:236–45.
132. Hecht JR, Patnaik A, Berlin J, et al. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2007;110:980–8.
133. Kendall A, Lord R, Maisey N. Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 2010;5:142–51.

134. Zhang W, Azuma M, Lurje G, et al. Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res.* 2010;30:4209–17.
135. Han S, Oh D, Im S, et al. Epidermal growth factor receptor intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and survival of advanced gastric cancer patients treated with cetuximab plus modified FOLFOX6. *Cancer Sci.* 2010;101:793–9.
136. Klinghammer K, Knödler M, Schmittel A, Budach V, Keilholz U, Tinhofer I. Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:304–10.
137. Lurje G, Nagashima F, Zhang W, et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor are associated with progression-free survival independent of K-ras in metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *Clin. Cancer Res.* 2008;14:7884–95.
138. Etienne-Grimaldi M, Bennouna J, Formento J, et al. Multifactorial pharmacogenetic analysis in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based therapy together with cetuximab-irinotecan. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73:776–85.
139. Paez D, Paré L, Espinosa I, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? *Cancer Sci.* 2010;101:2048–53.
140. Etienne-Grimaldi M, Formento J, Francoual M, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin. Cancer Res.* 2008;14:4830–5.
141. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:663–71.
142. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008;26:1626–34.
143. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J. Clin. Oncol.* 2003;21:2237–46.
144. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003;290:2149–58.
145. Fachinformation Tarceva (Erlotinib), Stand Juni 2013, Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, UK. Zulassungsnummern: Tarceva 25mg Filmtabletten EU/1/05/311/001 Tarceva 100 mg Filmtabletten EU/1/05/311/002 Tarceva 150 mg Filmtabletten EU/1/05/311/003. URL: <http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=009240&RL= Tarceva%26reg%3B%2025%26nbsp%3Bmg/100%26nbsp%3Bmg/150%26nbsp%3Bmg%20 Filmtabletten>
146. Fachinformation Iressa (Gefitinib), Stand Juni 2013, AstraZeneca AB, Södertälje, Schweden. Zulassungsnummern: EU/1/09/526/001 EU/1/09/526/002. URL:

<http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=011905&RL=IRESSA%26reg%3B%20250%26nbsp%3Bmg%20Filmtabletten>

147. Ichihara S, Toyooka S, Fujiwara Y, et al. The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 2007;120:1239–47.
148. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497–500.
149. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2129–39.
150. Buckingham LE, Coon JS, Morrison LE, et al. The prognostic value of chromosome 7 polysomy in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Thorac Oncol* 2007;2:414–22.
151. Pham D, Kris MG, Riely GJ, et al. Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:1700–4.
152. Wang S, An T, Wang J, et al. Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:1324–30.
153. Ma F, Sun T, Shi Y, et al. Polymorphisms of EGFR predict clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with Gefitinib. *Lung Cancer* 2009;66:114–9.
154. Liu G, Gurubhagavatula S, Zhou W, et al. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Pharmacogenomics J.* 2008;8:129–38.
155. Tiseo M, Rossi G, Capelletti M, et al. Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): study of a comprehensive panel of molecular markers. *Lung Cancer* 2010;67:355–60.
156. Tiseo M, Capelletti M, Palma G de, et al. Epidermal growth factor receptor intron-1 polymorphism predicts gefitinib outcome in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008;3:1104–11.
157. Gregorc V, Hidalgo M, Spreafico A, et al. Germline polymorphisms in EGFR and survival in patients with lung cancer receiving gefitinib. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008;83:477–84.
158. Rothenberg ML, LaFleur B, Levy DE, et al. Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:9265–74.
159. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J. Clin. Oncol.* 2002;20:2240–50.

160. Kimura T, Maesawa C, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in gastrointestinal tract tumor cell lines. *Oncol. Rep.* 2006;15:1205–10.
161. Ogino S, Meyerhardt JA, Cantor M, et al. Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:6650–6.
162. Metzger B, Chambeau L, Begon DY, et al. The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain. *BMC Med. Genet.* 2011;12:144.
163. Hamilton S, Aaltonen L (World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2000. 314 p. ISBN: 92 832 2410 8.
164. Junginger T, Hermanek P, Klimpfinger M. Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts. Berlin [u.a.]: Springer, 2002. XV, 381 S. (Klassifikation maligner Tumoren). ISBN: 978-3-540-42809-1.
165. Atkins D, Reiffen K, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Störkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 2004;52:893–901.
166. Fernebro E, Bendahl P, Dictor M, Persson A, Fernö M, Nilbert M. Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int. J. Cancer* 2004;111:921–8.
167. Li S, Kim J, Kim J, et al. Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006;65:705–12.
168. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, et al. Clinicopathologic significance of EGFR and Her-2/neu in colorectal adenocarcinomas. *Cancer J* 2006;12:229–36.
169. Spano J, Lagorce C, Atlan D, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann. Oncol.* 2005;16:102–8.
170. Llyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006;12:1184–91.
171. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:1803–10.
172. Zlobec I, Vuong T, Compton CC, et al. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br. J. Cancer* 2008;98:450–6.
173. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:1757–65.
174. van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007;25:1658–64.

175. Douillard J, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:4697–705.
176. Liu W, Wu X, Zhang W, et al. Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:6788–95.
177. Milano G, Etienne-Grimaldi M, Dahan L, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2008;19:2033–8.
178. Barbosa KC, Oba-Shinjo SM, Uno M, et al. Association of EGFR c.2073AT polymorphism with decreased risk of diffusely infiltrating astrocytoma in a Brazilian case-control study. *Int. J. Biol. Markers* 2008;23:140–6.
179. Carpentier C, Laigle-Donadey F, Marie Y, et al. Polymorphism in Sp1 recognition site of the EGF receptor gene promoter and risk of glioblastoma. *Neurology* 2006;67:872–4.
180. Jung M, Cho BC, Lee CH, et al. EGFR polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with EGFR-TKI. *Yonsei Med. J.* 2012;53:1128–35.
181. Spindler KG, Nielsen JN, Lindebjerg J, Brandslund I, Jakobsen A. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006;66:500–4.
182. Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi M, et al. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 2011;11:496.
183. Zhang W, Stoehlmacher J, Park DJ, et al. Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005;5:124–31.
184. Bandrés E, Barricarte R, Cantero C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 2007;43:713–9.
185. Kallel I, Rebai M, Khabir A, Farid NR, Rebaï A. Genetic polymorphisms in the EGFR (R521K) and estrogen receptor (T594T) genes, EGFR and ErbB-2 protein expression, and breast cancer risk in Tunisia. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009;2009:753683.
186. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Interaction of EGFR 497ArgLys with EGF +61AG polymorphism: modulation of risk in esophageal cancer. *Oncol. Res.* 2008;17:167–74.
187. Jain M, Kumar S, Upadhyay R, et al. Influence of apoptosis (BCL2, FAS), cell cycle (CCND1) and growth factor (EGF, EGFR) genetic polymorphisms on survival outcome: an exploratory study in squamous cell esophageal cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2007;6:1553–8.
188. Speer G, Cseh K, Winkler G, et al. Oestrogen and vitamin D receptor (VDR) genotypes and the expression of ErbB-2 and EGF receptor in human rectal cancers. *Eur. J. Cancer* 2001;37:1463–8.
189. Buisine M, Wacrenier A, Mariette C, et al. Frequent mutations of the CA simple sequence repeat in intron 1 of EGFR in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *World J. Gastroenterol.* 2008;14:1053–9.

190. Suzuki M, Kageyama S, Shinmura K, et al. Inverse relationship between the length of the EGFR CA repeat polymorphism in lung carcinoma and protein expression of EGFR in the carcinoma. *J Surg Oncol* 2008;98:457–61.
191. Zhou Q, Cheung YB, Jada SR, et al. EGFR Intron 1 polymorphism in Asian Populations and its correlation with EGFR gene expression and amplification in breast tumor tissues. *Cancer Biol. Ther.* 2006;5:1445–9.
192. Kersting C, Agelopoulos K, Schmidt H, et al. Biological importance of a polymorphic CA sequence within intron 1 of the epidermal growth factor receptor gene (EGFR) in high grade central osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:657–64.
193. Sueoka-Aragane N, Imai K, Komiya K, et al. Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1. *Cancer Sci.* 2008;99:1180–7.
194. Zhang W SJPDea. A polymorphic dinucleotide repeat in intron 1 of EGFR (epithelial growth factor receptor) gene is associated with clinical response to platinum based chemotherapy in patients with advanced colorectal disease. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:abstr 533..
195. Dubey S, Stephenson P, Levy DE, et al. EGFR dinucleotide repeat polymorphism as a prognostic indicator in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1:406–12.

7. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

EGFR Polymorphismen beim kolorektalen Karzinom

im Institut für Pathologie

mit Unterstützung durch Frau Priv. Doz. Dr. med. Dörthe Jechorek, geb. Küster, Frau Dipl. Ök. Brigitte Peters, Frau Prof. Dr. rer. nat. Regine Schneider-Stock und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Jan Stöhlmacher

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 07.10.2013

Dorothee Maria Gisela Böcker

8. Danksagung

Ich danke an erster Stelle meiner Betreuerin, Frau Priv. Doz. Dr. med. Dörthe Jechorek, geb. Küster, für das Engagement, die andauernde Unterstützung, die vielen wertvollen Anregungen und die Geduld sowie für die problemlose Übernahme der Betreuung nach Frau Prof. Dr. rer. nat. Schneider-Stocks Wechsel an die Universität Erlangen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Albert Roessner für die Gelegenheit an seinem Institut zu promovieren, Frau Prof. Dr. rer. nat. Regine Schneider-Stock für die ursprüngliche Initiierung und Überlassung des Themas und Herrn Priv. Doz. Jan Stöhlmacher für die Unterstützung bei den genetischen Untersuchungen.

Auch danke ich Herrn OA Prof. Dr. med. Frank Meyer aus der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie für die Betreuung und Hilfe bei der Erfassung der klinischen Daten und des Follow-Ups.

Ich danke Frau Dipl. Ök. Brigitte Peters für die willkommene und notwendige Hilfe bei den statistischen Berechnungen.

Ich danke den MTAs in Nürnberg und Dresden: In Magdeburg insbesondere Frau Kügler in der Immunhistochemie sowie Frau Stix und Frau Scharfenort im DNA-Labor. In Dresden für die herzliche Aufnahme und die zahlreichen wertvollen Hinweise Frau Dr. rer. nat. Stix, Frau Lehmann, Frau Zimmermann-Höffken, Frau Mogck und Frau Obermann.

Herzlichen Dank auch an Frau Fähe in der Bibliothek des Instituts für Pathologie für die freundliche Hilfe bei der Literaturrecherche.

Danke an meine Eltern, meinen Zukünftigen, meine Geschwister und Freunde für die zahlreichen Ermutigungen und die moralische Unterstützung. Horst Seithe für einen ganz entscheidenden Motivationsschub. Den gleichzeitig Promovierenden außerdem für die Gelegenheiten zum gemeinsamen Diskutieren der jeweils aktuellen Hindernisse: Marieluise Stumpf, Fabian Schwarzbach, Johanna Harai und Sonja Kaspar.

9. Curriculum vitae

Name	Dorothee Maria Gisela Böcker
Geburtsdatum	20.12.1983
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schulbildung	September 1990 - Juli 1993 Grundschule Vaterstetten September 1993 - Juli 1994 Grundschule Eibelstadt September 1994 - Juni 2003 Gymnasium Marktbreit Juni 2003 Schulabschluss mit allgemeiner Hochschulreife (Abitur) am Gymnasium Marktbreit
Studium	Oktober 2003 – November 2009 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg November 2009 Hochschulabschluss und Approbation November 2009 - Juni 2010 Promotionsstudium
Ärztliche Tätigkeit	Seit Juni 2010 Assistenzärztin in der Klinik für Neugeborene, Kinder und Jugendliche, Klinikum Nürnberg

Nürnberg, den 07.10.2013

Dorothee Maria Gisela Böcker

10. Anhang

T-Kategorie	
Tis	Carcinoma in situ: Mukosa bis maximal muscularis mucosae
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder perikolisches Fettgewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N-Kategorie	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M-Kategorie	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Anhang 1 - TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms¹³

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3, T4	N0	M0
Stadium II A	T3	N0	M0
Stadium II B	T4	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1, N2	M0

Stadium III A	T1, T2	N1	M0
Stadium III B	T3, T4	N 1	M0
Stadium III C	Jedes T	N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Anhang 2 - Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC von 2002¹³

Polymorphismus	Primer Sequenz	PCR Protokoll	Restriktionsenzym
(CA) _n	EGFR-F_FAM 5' GTT TGA AGA ATT TGA GCC AAC C3' EGFR-R 5' TTC TTC TGC ACA CTT GGC AC 3'	94°C 2 min 94°C 30 sec 55°C 30 sec 72°C 30 sec Absatz 2 30x wiederholen 72°C 4 min 60°C 40 min	-
-191	EGFRRE-2F 5' TCT GCT CCT CCC GAT CCC TCC T 3' EGFRRe-1R 5'GAGGTGGCCTGTCGTCCGGTCT 3'	98°C 15 min 98°C 5 sec 68°C-60°C 10 sec 72°C 20 sec 98°C 5 sec 59°C 10 sec 72°C 20 sec Absatz 2 35 x wiederholen 72°C 10 min	SacII 20,000U/ml
-216	EGFRRe-2F 5' TCT GCT CCT CCC GAT CCC TCC T 3' EGFRRe-1R 5'GAG GTG GCC TGT CGT CCG GTC T 3'	98°C 15 min 98°C 5 sec 68°C-60°C 10 sec 72°C 20 sec 98°C 5 sec 59°C 10 sec 72°C 20 sec Absatz 2 35 x wiederholen 72°C 10 min	BseRI 10,000U/ml
497	HER497 (lenz)-F 5' TGC TGT GAC CCA CTC TGT CT 3'	94 ° 2 min 94° 1 min 62°C 45 min 72 °C 30 min Absatz 2 35 x wdh 72°C 2 min	BstN1 (NEB R0168S) 10,000U/ml

Anhang 3 - Primer-Sequenzen und PCR-Protokolle