

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantationschirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Duale Expression ausgewählter Biomarker beim kolorektalen Karzinom und  
seinen Lebermetastasen: prognostische Wertigkeit und therapeutische  
Konsequenz**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jakob Gülden

aus

Lindenberg i. Allg.

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Barbara Mayer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Schirra  
Prof. Dr. med. Jens Neumann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Tobias Schiergens

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2020

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Jakob Gülden, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Duale Expression ausgewählter Biomarker beim kolorektalen Karzinom und seinen Lebermetastasen: prognostische Wertigkeit und therapeutische Konsequenz“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Berlin, 23.07.2019

Unterschrift: JAKOB GÜLDEN

## **Erklärung**

Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten immunhistochemischen Daten wurde von Frau Melanie Zoller erhoben und dankenswerterweise für die Verbesserung der statistischen Aussagekraft zur Verfügung gestellt.

## **Danksagung**

Ich danke allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Für die wissenschaftliche Leitung und die umfassende Betreuung:

Frau PD Dr. Barbara Mayer

Herrn Prof. Dr. Karl-Walter Jauch

Herrn PD Dr. Andreas Jung

Frau Dr. Mareile Joka

Für die unzähligen Tipps, die vielseitige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Labor:

Melanie Zoller, Andreas Bogner, Thomas Singer, Laura Rava, Karoline Weiler, Maximilian Beier, Karin von Dehn-Rotfelser, Francesca Weller, Christian Ilmberger und Veronika Geigenberger

Für die großartige Unterstützung, Ratschläge und das Korrekturlesen:

Frau Melina Dabel

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	4
1.1	Kolorektales Karzinom .....	4
1.2	Therapie .....	6
1.3	Biomarker .....	9
1.3.1	KRAS .....	10
1.3.2	BRAF .....	11
1.3.3	ERCC1 .....	11
1.3.4	CD44v6 .....	12
1.3.5	MUC1 (Mucin-1) .....	13
1.3.6	HGF-Rezeptor .....	13
1.3.7	IGF1-Rezeptor .....	14
1.3.8	HSP90 .....	15
1.3.9	rpS6-Kinase .....	15
1.4	Zusammenhänge zwischen den Biomarkern .....	16
1.5	Ziele dieser Arbeit .....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Patientenkollektiv .....	18
2.2	Gewebebegewinnung .....	20
2.3	Zelllinien .....	21
2.3.1	Zelllinien in der Immunhistochemie .....	21
2.3.2	Zelllinien in der Molekularbiologie .....	22
2.4	Materialien für die immunhistochemische Färbung und Pyrosequenzierung .....	23
2.4.1	Antikörper .....	23
2.4.2	Negativkontrollen .....	24

2.4.3	Reagenzien und Chemikalien .....	25
2.4.4	Lösungen .....	27
2.5	Methoden .....	31
2.5.1	Grundlagen .....	31
2.5.2	Etablierung der verschiedenen Methoden anhand des ERCC1-Genanalyse .....	32
2.5.3	Kryomunhistochemie .....	33
2.5.4	Molekularbiologische Verfahren .....	36
2.5.5	Gelelektrophorese und Vergleich zur Pyrosequenzierung .....	47
2.6	Statistik .....	49
2.6.1	Bildung von Gruppen .....	49
2.6.2	Zusammenfassen zweier Biomarker .....	50
3	Ergebnisse .....	51
3.1	Patientenkollektiv .....	51
3.1.1	Primärtumor .....	51
3.1.2	Lebermetastasen .....	54
3.2	Zelllinien .....	56
3.3	Die Genauigkeit der Gelelektrophorese im Vergleich zur Pyrosequenzierung am Beispiel des ERCC1-Polymorphismus .....	57
3.4	ERCC1 – Abschließende Betrachtung des Methodenvergleichs .....	62
3.5	Statistische Auswertung der untersuchten Biomarker .....	63
3.5.1	Häufigkeit und Verteilung .....	63
3.5.2	Bivariate Analyse .....	67
3.5.3	Nichtparametrische Überlebensfunktion – Kaplan-Meier-Schätzer .....	84
3.5.4	Cox-Regressionsmodell .....	92
3.6	Subgruppenanalyse .....	101
4	Diskussion .....	102

4.1	Die Entwicklung der Doppelmarker.....	105
4.2	Das Patientenkollektiv.....	106
4.2.1	Primärtumore.....	106
4.2.2	Lebermetastasen.....	108
4.2.3	Prognostische Wertigkeit der Biomarker.....	110
4.2.4	Spezielle Aspekte der prognostischen Wertigkeit bei den Lebermetastasen .	113
4.3	Klinischer Bezug der Biomarker im Kontext der aktuellen Literatur.....	116
4.3.1	Einzelmarker.....	117
4.3.2	Doppelmarker .....	125
4.4	Therapeutische Konsequenz und Ausblick.....	126
5	Anhang.....	128
5.1	Tabellen zur Tumorklassifikation.....	128
5.2	Beispiel eines Auswertungsbogens für die immunhistochemische Färbung.....	130
5.3	Vollständige tabellarische Auflistung der Korrelationen (Test nach Fisher).....	131
5.3.1	Tabellen: Primärtumore, Einzelmarker mit klin.-path. Faktoren.....	131
5.3.2	Tabellen: Primärtumore, Einzelmarker mit tumorbiologischen Faktoren.....	137
5.3.3	Tabellen: Lebermetastasen, Einzelmarker mit klin.-path. Faktoren.....	143
5.3.4	Tabellen: Lebermetastasen, Einzelmarker mit tumorbiologischen Faktoren..	149
5.3.5	Tabellen: Primärtumoren, Doppelmarker mit klin.-pat. Faktoren.....	155
5.3.6	Tabellen: Primärtumoren, Doppelmarker mit tumorbiologischen Faktoren ..	164
5.3.7	Tabellen: Lebermetastasen, Doppelmarker mit klin.-path. Faktoren.....	173
5.3.8	Tabellen: Lebermetastasen, Doppelmarker mit tumorbiologischen Faktoren	180
5.3.9	Tabellen: Überlebensanalysen .....	188
5.3.10	Tabellen: Subgruppenanalysen .....	191
6	Literaturverzeichnis .....	198

# 1 Einleitung

## 1.1 Kolorektales Karzinom

Die Prävention, Behandlung und Nachsorge von Krebserkrankungen stellen eine enorme Herausforderung für das Gesundheitssystem in Deutschland und weltweit dar. In den Industrienationen sind maligne Tumorleiden die zweit häufigste Todesursache nach kardiovaskulären Erkrankungen [1, 2]. Die kolorektalen Karzinome wiederum stehen als Todesursache unter allen Tumorerkrankungen je nach Population an zweiter beziehungsweise dritter Stelle. In Europa variiert die Inzidenz zwischen 20 (Griechenland) und 70 (Deutschland) Neuerkrankungen/100.000/Jahr. Trotz der sich stetig weiterentwickelnden Therapiekonzepte lag die Zahl der Todesfälle in Deutschland bei ca. 25.000 im Jahr 2014. Laut der aktuellen Statistik des RKI (Publikation von 2016 mit Daten aus dem Jahr 2013) sind Darmtumoren in Deutschland bei Frauen die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache mit 11.818 Fällen pro Jahr (Mammakarzinom: 17.853, Lungenkarzinom: 15.140) und bei Männern die zweithäufigste Todesursache mit 13.444 Fällen pro Jahr (Prostatakarzinom: 13.408, Lungenkarzinom: 29.708) [3]. Die Mortalität dieser Erkrankung sank ebenso wie die Inzidenz seit den 1990er Jahren in Deutschland kontinuierlich ab, was vornehmlich auf die gleichzeitig gestiegene Anzahl routinemäßig durchgeführter Vorsorgekoloskopien zurückzuführen ist. Hierdurch können Adenome vor der Weiterentwicklung in Karzinome, entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz (auch Vogelstein-Sequenz) [4, 5], erkannt und entfernt werden. Ohne Risikofaktoren liegt das Erkrankungsrisiko für ein kolorektales Karzinom in der Normalbevölkerung im Alter ab 40 Jahren bei 6%. Patienten mit Risikofaktoren wie der FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) oder HNPCC (Hereditäres, nicht-Polyposis-assoziiertes Kolonkarzinom) haben ein bis zu hundertprozentiges Erkrankungsrisiko und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt [6-9].

Bei Stellung der Diagnose liegt in 25% der Fälle bereits eine Fernmetastasierung vor. Die Metastasen sind in 13% der Fälle auf ein Organ beschränkt und in 12% in mehr als einem Organ oder im Peritoneum nachweisbar. Eine hepatische Metastasierung findet sich in 19% der Fälle im Rahmen des Stagings. Insgesamt entwickeln mehr als 50% aller Patienten mit einem kolorektalem Karzinom im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen. Bei 3% der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Metastasierung der Lunge und in 9% eine

Metastasierung im Peritoneum vor. Weitere Fernmetastasen können sich mit einer Häufigkeit von jeweils 1-2% in nichtregionären Lymphknoten, der Haut und in allen übrigen Lokalisationen zeigen [9]. Die hämatogene Metastasierung folgt dem venösen Abfluss über die V. portae. Nur beim distalen Rektumkarzinom können direkte Lungenmetastasen durch die venöse Versorgung über die Vv. rectales mediae et inferae zur V. cava entstehen. Aufgrund der Tumorbiologie und der unterschiedlichen Metastasierungswege wird zwischen kolorektalen Tumoren und distalen Rektumkarzinomen unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurden nur kolorektale Karzinome untersucht.

Die Trennlinie zwischen Kolon- und Rektumkarzinom ist dem internationalen Dokumentationssystem und der aktuellen S3-Leitlinie zufolge [9-11] bei 16cm ab ano festgelegt. Das heißt, zwischen aboralem Tumorrand und Anokutanlinie müssen mindestens 16cm liegen, wenn es sich per definitionem um ein kolorektales Karzinom handelt. In den USA wurde diese Grenze wegen der Häufigkeit an Lokalrezidiven des Rektumkarzinoms, bei 12cm ab ano festgelegt [12].

Für synchrone als auch metachrone Metastasen der Leber oder der Lunge ist eine kurative Therapie durch vollständige operative Entfernung möglich. Zeigt sich im Rahmen des Stagings und der weiteren Diagnostik, dass eine R0-Resektion erreicht werden kann, wird die primäre Operation empfohlen. Resektable Lebermetastasen liegen der Leitlinie nach vor, wenn

- eine nicht-resektable extrahepatische Tumormanifestation ausgeschlossen ist
- weniger als 70% des Parenchyms befallen sind
- weniger als 3 Lebervenen und weniger als 7 Segmente betroffen sind
- keine Leberinsuffizienz oder Child B- oder C-Zirrhose vorhanden ist
- keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen vorliegen

Für Lungenmetastasen liegen solche Kriterien in Bezug auf die chirurgischen Therapieoptionen aufgrund der deutlich geringeren Häufigkeit des Auftretens nicht vor. In diesen Fällen sollte die Resektabilität in einem Zentrum mit ausreichender Expertise geprüft werden.

Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Resektion synchroner Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms liegt zwischen 28 und 39,2% [13-16]. Trotz nachgewiesener R0-Resektion bleiben nur ca. 30% der Patienten langfristig rezidivfrei. Es kann daher auch in diesen Fällen eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Im Gegensatz dazu liegt die 5-Jahres-

Überlebensrate bei der R0-Resektion des primären kolorektalen Karzinoms ohne das Vorliegen einer Fernmetastasierung bei 70-80%.

Als Basis für die Therapie des kolorektalen Karzinoms gilt die S3-Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft in der aktuellen Version von 2014 [9]. Für die Einteilung und Klassifizierung des Tumors, aus der sich dann das Therapiekonzept ableitet, werden zum einen die erweiterte TNM-Klassifikation (siehe *Tabelle 50* im Anhang) sowie der Differenzierungsgrad und das Ergebnis der histologischen Untersuchung des Resektats herangezogen. Auf der Grundlage der TNM-Klassifikation kann die UICC (Union internationale contre le cancer) - Stadieneinteilung vorgenommen werden (siehe *Tabelle 51* im Anhang). Ergänzend können durch den Pathologen zur Therapiesteuerung bei geplanter adjuvanter Chemotherapie oder bei Verdacht auf das Vorliegen eines HNPCC, Untersuchungen auf Mikrosatelliteninstabilität und weitere Mutationen wie beispielsweise H-/K-/NRAS, BRAF und ALK durchgeführt werden.

## 1.2 Therapie

Für die Entwicklung einer effektiven Behandlungsstrategie empfiehlt die S3-Leitlinie bei fortgeschrittenem Kolonkarzinom (UICC-Stadien III und IV [9]) eine Vorstellung in der interdisziplinären Tumorkonferenz bereits vor der chirurgischen Primärtherapie. In der Regel ist die Tumorresektion mit entsprechender Radikalität der wichtigste Faktor für einen kurativen Ansatz. Darunter versteht man die vollständige Resektion des Tumors mit einem ausreichenden Abstand im gesunden Gewebe unter Mitnahme des Lymphabflussgebietes mit mindestens zwölf Lymphknoten (En-bloc-Resektion). Je nach Tumorlokalisation im Kolon kann eine (ggf. erweiterte) Hemikolektomie durchgeführt werden. Sofern bei Erstdiagnose bereits Lebermetastasen vorliegen, können diese in Abhängigkeit vom Primärtumor, der Anzahl der Metastasen und möglicher Komorbidität des Patienten simultan reseziert werden. Bei multiplen Lebermetastasen muss je nach Befund und Staging ein zweizeitiges Vorgehen, respektive eine reine Chemotherapie der Metastasen diskutiert werden. Nicht resektable Lebermetastasen können zudem mittels eines lokalablativen Verfahrens wie der Radiofrequenzablation, SIRT und LITT behandelt werden [9].

Eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie wird nur bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen (UICC-Stadien II und III), nicht aber bei Kolonkarzinomen empfohlen. Beim nodal positiven

Kolonkarzinom (UICC-Stadium III) verbessert die adjuvante Therapie mit postoperativer Gabe des FOLFOX-Schemas (s.u.) über sechs Monate die 5-Jahresüberlebenrate um 15-20% und die 5-Jahres-Rezidivfreiheit um ca. 70% [17-19].

Im UICC-Stadium II ist der Literatur zufolge kein eindeutiger Benefit durch eine adjuvante Chemotherapie für den Patienten abzuleiten. Es verbesserte sich in diesem Stadium zwar das krankheitsfreie 5-Jahres-Intervall, jedoch ohne Effekt auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben [17, 20, 21]. Die adjuvante Chemotherapie wird im Stadium II daher nur bei einer vorhandenen Risikokonstellation (zum Beispiel bei T4-Tumor, Notfalloperation, Tumorperforation, weniger als zwölf Lymphknoten entfernt) empfohlen.

Beim Primärtumor werden mit dem FOLFOX-Schema, im Vergleich zur 5FU-Monotherapie, signifikant höhere Ansprechraten und ein ebenso längeres progressionsfreies Überleben, bei nicht signifikant verlängertem Gesamtüberleben erreicht [22, 23]. Aufgrund der Unverträglichkeit und den teilweise schweren Nebenwirkungen von Oxaliplatin, unter anderem mit Neutropenie (Schweregrad 3 und 4 bei 41,7% versus 5,3% der Patienten), Diarrhoe (Schweregrad 3 und 4 bei 11,9% versus 5,3% der Patienten) und Neurotoxizität (Schweregrad 3 bei 18,2% versus 0% der Patienten) [23], wird die Dosis häufig reduziert oder auf eine 5FU-Monotherapie umgestellt. Unter 5FU-Monotherapie (Ansprechraten 26%), bei der durch orale Einnahme der Patientenkomfort deutlich erhöht wird, liegt das Gesamtüberleben bei 12,9 Monaten [24]. Diese Patienten können in der Verlaufsbetrachtung und bei Fragen nach dem Therapieansprechen höchsten noch unter Vorbehalt ausgewertet werden.

Kontraindikationen für eine adjuvante Chemotherapie sind:

- Schlechter Allgemeinzustand
- Unkontrollierte Infektion
- Leberzirrhose Child B und C
- Schwere KHK oder Herzinsuffizienz (NYHA III und IV)
- Präterminale und terminale Niereninsuffizienz
- Eingeschränkte Knochenmarkfunktion
- Andere, die Lebenserwartungen bestimmende Komorbiditäten
- Unvermögen, an regelmäßigen Kontrolluntersuchungen teilzunehmen

Nach der R0-Resektion von Lebermetastasen kann auf der Grundlage der S3-Leitlinie eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden. Da keine placebokontrollierten und verblindeten Studien zur systemischen adjuvanten Therapie nach Metastasenresektion vorliegen, ist die Datenlage limitiert. Anhand prospektiver Studien zeichnet sich allerdings ein Vorteil für eine 5-FU-basierte Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Operation hinsichtlich des Gesamtüberlebens ab [25].

Die Auswahl des Chemotherapieregimes bei nicht-resektablen Lebermetastasen ist abhängig von der therapeutischen Zielsetzung, also davon, ob eine sekundäre Resektabilität angestrebt oder eine rein palliative/symptomorientierte Behandlung intendiert ist. Auch bei primärerer Irresektabilität der Lebermetastasen sollte unter systemischer Therapie die regelmäßige Evaluation einer möglichen sekundären Resektabilität erfolgen. Studien, die neoadjuvante Therapieregime mit Kombinationen aus FOLFOX, FOLFIRI und Cetuximab anwendeten, zeigten zum Teil gute Ansprech- und Resektionsraten [26-28].

Das FOLFOX-Schema basiert auf einer Kombination von Folinsäure (FOL), Fluorouracil (F) und Oxaliplatin (OX). Es werden verschiedene Protokolle des FOLFOX-Schemas (beispielsweise FOLFOX-6) angewandt. Als Alternative wird immer wieder die Verwendung irinotecanhaltiger Protokolle (FOLFIRI) diskutiert. Diese können wiederum auch mit einem FOLFOX-Schema kombiniert werden [29-31].

Zu den oben genannten Schemata für die Erstlinientherapie können monoklonale Antikörper wie Bevacizumab (Hemmung der Angiogenese über VEGF) und Cetuximab (Hemmung des Wachstumsfaktors EGFR) gegeben werden. Einige Studien [27, 28, 32] zeigten darunter ein längeres progressionsfreies Überleben beziehungsweise ein besseres Gesamtüberleben, sodass diese beiden Therapeutika in die Leitlinie von 2014 [9] aufgenommen wurden.

Seither wurden weitere vielversprechende Antikörper und Inhibitoren in Studien getestet und finden möglicherweise Eingang in die nächste Version der Leitlinie. Dem vorausgreifend werden die Therapeutika, welche gegen die in dieser Arbeit untersuchten Zielmoleküle gerichtet sind, im Rahmen des Diskussionsteils besprochen.

### 1.3 Biomarker

Für das Ansprechen auf die Chemotherapie ist, neben der korrekten Durchführung des Therapieschemas, der Mutationsstatus des Patienten entscheidend. Die Veränderungen der Tumorbiologie auf molekularer Ebene können zum Beispiel im Fall der K-/N-/HRAS-Mutation dazu führen, dass die Signaltransduktion der Zellen dereguliert ist. Dadurch können Chemotherapeutika, im folgenden Beispiel Cetuximab, ihre Wirkung verlieren. Cetuximab ist ein monoklonaler IgG1-Antikörper, der unter anderem für eine Kombinationstherapie mit FOLFOX oder als Monotherapie zugelassen ist. Er bindet an den Wachstumsfaktor EGFR (epidermal growth factor receptor) und hemmt damit die von hier ausgehende Signaltransduktion über das untergeordnete Ras-Protein, welches auf dem intrazellulären Signalweg liegt. Ist H-/K-/NRAS nun mutiert, wird es nicht mehr in Abhängigkeit von EGFR reguliert, sondern ist permanent aktiv. Die Hemmung des höherliegenden EGF-Rezeptors hat auf diesen Signalweg somit keinen Effekt mehr [33-35].

Außer der RAS-Mutation gibt es weitere Biomarker, die einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit der Chemotherapie haben oder zentrale Funktionen für das Tumorstadium innerhalb der Zelle wahrnehmen und damit unter dem Sammelbegriff „therapierelevante Tumormarker“ zusammengefasst wurden. Unter diesem Gesichtspunkt ist bei der Entwicklung neuer Chemotherapeutika die Suche nach sogenannten „drugable targets“ in den Fokus gerückt. Je weiter die Kenntnis über die einzelnen Faktoren und die damit verbundenen Therapieoptionen voranschreitet, desto effektiver kann die Therapie auf jeden einzelnen Patienten, im Sinne einer individualisierten medikamentösen Therapie, abgestimmt und angepasst werden. Zu diesem Ziel soll auch die vorliegende Arbeit beitragen. Dafür wurden jeweils zwei Biomarker aus verschiedenen Funktionsbereichen in der Zelle ausgewählt:

- Zelladhäsionsmoleküle: CD44v6 und MUC1
- Wachstumsfaktorezeptoren: HGFR und IGF1R
- Signaltransduktionsmoleküle: HSP90 und rpS6-Kinase
- Genotypische Biomarker: KRAS und BRAF
- ERCC1 (Verwendung nur im Rahmen der Etablierungsphase)

Die genotypischen Biomarker (KRAS, BRAF) wurden vergleichend, als bereits etablierte und therapieentscheidende Biomarker hinzugefügt, um die therapeutische Wertigkeit der neuen

Biomarker zu zeigen. Für die Auswahl der anderen, neuen Biomarker war mitentscheidend, dass sie bereits als Zielmoleküle für die Tumorthherapie bekannt waren und dass sich entsprechende Therapeutika auf dem Markt oder im Zulassungsprozess befanden. Teilweise lagen für diese Therapeutika nur Untersuchungen an anderen Tumorentitäten vor, womit ihre Anwendung im Rahmen eines Off-label-use beim kolorektalen Karzinom möglich ist.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer möglichen Doppelhemmungsstrategie auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse über die Ausprägungsmerkmale der Biomarker. Mit Doppelhemmung ist die gleichzeitige Inhibition zweier unterschiedlicher Zielmoleküle gemeint, mit der die Effektivität der Therapie gesteigert oder mögliche synergistische und additive Effekte genutzt werden können. Dies wäre beispielsweise durch die Vakzinierung gegen einen Marker und die parallele Inhibition eines weiteren hochexprimierten Biomarkers möglich.

Die hierin untersuchten Biomarker werden im Folgenden kurz charakterisiert und allgemein beschrieben. Der Bezug auf die Therapierelevanz beim kolorektalen Karzinom wird in der Diskussion hergestellt.

### 1.3.1 KRAS

Das Kirsten-Ras (KRAS) Onkogen gehört zur Familie der Ras-Gene und kodiert für eine GTPase. Neben KRAS gehören H-Ras und N-Ras zu den wichtigsten Onkogenen beim Menschen. Im gesunden Gewebe ist es für die intrazelluläre Signaltransduktion, ausgehend von membranständigen Rezeptoren wie EGFR, HGFR und IGF1R, verantwortlich. Wie bereits im oben genannten Beispiel beschrieben, treten Punktmutationen auf, die in verschiedenen malignen Tumorerkrankungen zu einer Autoaktivierung des Proteins führen. Mutationen im KRAS-Gen treten hauptsächlich im Exon 2 und hier in den Codons 12, 13 und 61 auf. Sie finden sich bei 35-45% der Patienten mit kolorektalem Karzinom. Im mutierten KRAS-Protein ist GTP dauerhaft gebunden, wodurch das Protein permanent aktiv ist. Da nur Patienten mit dem KRAS Wildtyp von einer Therapie mit dem EGFR-Inhibitor Cetuximab profitieren, ist vor der Einleitung der Therapie der Mutationsstatus zu prüfen. Neuere Studien zeigen allerdings, dass die Mutation im Codon 13 in Bezug auf das Therapieansprechen wie der Wildtyp anzusehen ist und Träger dieser Mutation von einer Therapie mit Cetuximab profitieren können. [9, 33, 36-39].

### 1.3.2 BRAF

Das BRAF-Protoonkogen kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase der RAF/MIL-Familie. Das Ras-Protein wird durch RAF aktiviert und spielt in der Regulation des MAP-Kinase/ERK-Signalwegs, welcher die Zellteilung und Zelldifferenzierung beeinflusst, eine Rolle. Mutationen können in zwei unterschiedlichen Formen in Erscheinung treten. Angeborene Mutationen des BRAF-Gens führen zum seltenen Kardio-fazio-kutanen Syndrom. Es zeichnet sich durch eine Kombination von Fehlbildungen und geistiger Entwicklungsverzögerung aus. Erworbene Mutationen des BRAF-Gens sind mit verschiedenen Karzinomen assoziiert und kommen am häufigsten bei malignen Melanomen vor. Die wichtigsten Varianten sind die V600E- und V600K – Mutation, die ca. 75%, respektive 25% der BRAF-Mutationen beim malignen Melanom ausmachen. Die für das kolorektale Karzinom relevante Mutation liegt im Exon 15 und wird entsprechend ihrer Lokalisation und der beteiligten Aminosäuren als Mutation V600E bezeichnet. Es handelt sich um eine Gain-of-function-Mutation, die, ähnlich der KRAS-Mutation, eine Steigerung der Proteinaktivität zur Folge hat. Die BRAF-Mutation tritt bei 8-15% der kolorektalen Karzinome auf und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Ob sich darüber hinaus eine therapeutische Konsequenz für das kolorektale Karzinom ableiten lässt bleibt zurzeit unklar. Inhibitoren wie beispielsweise Vemurafenib sind bisher für das maligne Melanom, Leber- und Nierentumoren zugelassen, nicht jedoch für das kolorektale Karzinom [35, 38, 40-43].

In der Zusammenschau zeigt sich, dass RAS und BRAF als therapierbare Biomarker beim kolorektalen Karzinom zwar etabliert, aber für eine effektive Therapie nicht ausreichend sind.

### 1.3.3 ERCC1

Das Protein ERCC1 (excision repair cross-complementing group 1) findet sich im „NER (nukleotid excision repair) - Pathway“. Dieser Komplex ist für die Reparatur von DNA-Läsionen, wie Schäden durch UV-Licht und Chemikalien, Strangbrüche und Crosslinks zwischen den DNA-Strängen, zuständig. Für die Tumorthherapie ist im Besonderen die Fähigkeit des NER-Pathways relevant, auch durch Platin-Chemotherapeutika verursachte DNA-Läsionen reparieren zu können. Sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene führt die Überexpression von ERCC1 zur Resistenz bei platinbasierter Chemotherapie. Die Effektivität,

mit der das Protein ERCC1 die Schäden rückgängig macht, hängt unter anderem von einem Polymorphismus im Codon 118 mit der Aminosäuresequenz `AAC` ab. An der letzten Stelle dieses Codons können, im Sinne eines Polymorphismus, die Basen Cytosin (C) oder Thymin (T) vorliegen. Bei diploiden Zellen ergeben sich somit drei verschiedene Ausprägungen (C/C, T/T, C/T). Dabei führen beide Basen des Polymorphismus zum Einbau der Aminosäure Asparagin. Mit der Anzahl der T-Allele scheint aber der ERCC1-mRNA-Level zu steigen. Andere Studien legen nahe, dass ethnische Unterschiede in der Ausprägung des Polymorphismus sowie in der Metabolisierung bestimmter Chemotherapeutika bestehen. ERCC1 gilt zudem als ein prognostischer Marker beim kolorektalen Karzinomen [44-48].

Das ERCC-1-Gen steht, anderes als die übrigen in diesem Abschnitt beschriebenen Biomarker, weniger im Fokus der vorliegenden Arbeit. Es war vor allem im Rahmen der Etablierung der molekularbiologischen Methoden von zentraler Bedeutung. Neben seiner Relevanz für die individualisierte Tumorthherapie war entscheidend, dass ERCC1 mit allen in dieser Arbeit zum Tragen kommenden Methoden untersucht werden kann. Damit ist das Standardverfahren mittels PCR und Gelelektrophorese, die Pyrosequenzierung als alternativer Ansatz und als drittes Verfahren die immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten gemeint. Details zur Etablierungsphase sind im Material und Methoden – Teil erläutert.

#### 1.3.4 CD44v6

Das Molekül CD44 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches an vielen Zell-Zell-Interaktionen, an der Zelladhäsion und am Zellwachstum beteiligt ist. Es spielt bei diversen physiologischen Vorgängen, wie beispielsweise der Regulation des Immunsystems und der Lymphozytenfunktion, eine wichtige Rolle. Bekannt ist eine breite Heterogenität, die durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikation entsteht. Die verschiedenen Isoformen teilen sich die gleiche Transmembranregion und den N-Terminalen Teil des Proteins. Neben der sogenannten kleineren Standardform CD44s, die von einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimiert wird, existiert eine große Anzahl an Isoformen mit variablen extrazellulären Domänen: CD44v. Unter den CD44v-Isoformen spielt vor allem CD44v6 eine wichtige Rolle in der Tumorprogression, die durch seine Interaktion mit dem HGF-Rezeptor (hepatocyte growth factor) noch verstärkt wird. Wichtige Funktionen wie Zellmigration und Invasion werden durch HGFR potenziert, da CD44v6 und HGFR sich wechselseitig als

Cofaktoren dienen. Auch der Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR-2 wird von CD44v6 reguliert, sodass auch ein Einfluss auf die Angiogenese besteht. Ein CD44v6-Inhibitor der Firma Amcure befindet sich zur Zeit in der klinischen Testphase. CD44v6 kann daher als Biomarker und gleichzeitig als Zielmolekül für die individualisierte Tumorthherapie dienen [49-53].

#### 1.3.5 MUC1 (Mucin-1)

MUC1 ist ein membrangebundenes Protein aus der Mucin-Familie. Mucine verfügen über große O-glycosylierte extrazelluläre Domänen, die eine schützende Schicht im Sinne einer physikalischen Barriere auf epithelialen Oberflächen bilden. Zudem sind sie an der intrazellulären Signalkaskade beteiligt. Das MUC1-Protein findet sich auf verschiedenen Epithelien, wie beispielsweise der Lunge, dem Gastrointestinaltrakt und dem Pankreas. In Karzinomen fällt MUC1 häufig mit Überexpression, fehlerhafter intrazellulärer Lokalisation und durch Veränderungen in der Glykosylierung auf. Dabei kommt es auch zu einem Verlust der Polarität der Zelle und einer MUC1-Ausbreitung über die gesamte Zelloberfläche. Im Tumor besteht bei MUC1-Überexpression, neben einer Assoziation mit erhöhter Aktivität von Wachstumsfaktoren, eine Interaktion der intrazellulären Domäne mit p53 und HSP90 (siehe 1.3.8), wodurch verschiedene Mechanismen der Apoptose inhibiert werden. Durch vermehrte Bildung von Beta-Catenin, im Rahmen der Zunahme der MUC1-Expression, wird die Tumorzellinvasion und damit die Metastasierung gefördert. Die Überexpression von MUC1 ist mit einer schlechten Prognose assoziiert, bietet aber auch ein wichtiges Ziel für neue Therapeutika. Vielversprechende Therapieansätze auf Basis von Vakzinen, monoklonalen Antikörpern und Inhibitoren sind Gegenstand aktueller Forschung [54-57].

#### 1.3.6 HGF-Rezeptor

Das Protein HGFR (hepatocyte growth factor receptor) ist ein transmembraner Wachstumsfaktorrezeptor aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Er schützt die Zelle vor Apoptose und fördert die Proliferation, was für die embryonale Entwicklung, die Organogenese und die Wundheilung essentiell ist. HGFR kommt in der Regel nur in Stammzellen und Progenitorzellen vor und ist bei diversen malignen Tumorerkrankungen dereguliert. Dies führt zu überschießender Aktivität des Rezeptors, welche wiederum das

Tumorstadium, die Angiogenese und die Metastasierung fördert. Dabei spielt nicht nur die unkontrollierte Aktivität von HGFR eine Rolle, sondern auch die in der gesunden Zelle gegenregulierende Phosphatase PTEN. Weiteren Einfluss auf die Funktionsweise von HGFR nimmt der, oben bereits beschriebene, verstärkende Effekt durch den Cofaktor CD44v6. Die nachgeschalteten Signalwege beinhalten eine Reihe weiterer tumorrelevanter Proteine wie den KRAS/BRAF/MAPK- und den PTEN/PI3K/Akt-Signalweg. Durch die zentrale Rolle von HGFR in der Tumorbilogie wird intensiv nach therapeutischen Ansatzpunkten gesucht. Es wurden bereits verschiedene HGFR-Antagonisten wie beispielsweise Crizotinib und Tivantinib entwickelt, die sich zurzeit in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden [35, 52, 58, 59]. C-MET, das Gen des HGF-Rezeptors, ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung und in vielen Publikationen zu finden.

#### 1.3.7 IGF1-Rezeptor

Dieser Rezeptor bindet IGF1 (insulin-like growth factor 1) und verfügt ebenso wie die anderen Wachstumsfaktorrezeptoren über Tyrosinkinaseaktivität. IGF2 und Insulin werden mit niedriger Affinität ebenfalls an den Rezeptor gebunden. IGF1R spielt eine entscheidende Rolle in Transformationsprozessen, ist am Zellwachstum und an der Regulation des Überlebens der Zellen beteiligt. In malignen Zellen ist der IGF1Rezeptor häufig überexprimiert, wodurch sich das Überleben der Zellen verlängert. Auch hier sind die nachgeschalteten Signalwege mit der Zellproliferation beziehungsweise der Hemmung der Apoptose assoziiert. Diese Signalwege werden zum Teil auch über EGFR aktiviert, sodass der Einfluss von IGF1R auf die gemeinsame Endstrecke im Rahmen der intrazellulären Signaltransduktion ein weiterer Grund für ein Therapieversagen der EGFR-Inhibition durch Cetuximab sein kann. IGF1R-Überexpression geht mit einer schlechteren Prognose einher und scheint die Tumorgöße direkt zu beeinflussen. Die Suche nach selektiven Inhibitoren für die Therapie ist aufgrund der Ähnlichkeit des IGF1R zum Insulinrezeptor schwierig und Gegenstand aktueller Forschung. Dabei zeigte eine Übersichtsarbeit von 2017, dass die bisher verfügbaren Inhibitoren Ganitumab, Dalotuzumab, Cixutumumab, Teprotumumab and Figitumumab keine Verbesserung der Prognose erzielten [35, 60-66].

### 1.3.8 HSP90

Das Protein HSP90 (ca. 90kDa) gehört zur Gruppe der Hitzeschockproteine. Als Chaperon spielt es für die korrekte Faltung von neusynthetisierten Proteinen eine entscheidende Rolle. Es stabilisiert und transportiert seine Substratproteine und ist, je nach Anforderung, auch an deren Degradierung beteiligt. Wie die anderen Biomarker übernimmt HSP90 zudem Funktionen im Bereich der Signaltransduktion. HSP90 liegt sowohl im Cytosol als auch im Endoplasmatischen Retikulum vor. Zusammen mit HSP70 und HOP (HSP organizing protein) ist es durch Dysregulation in Tumorzellen an multiplen Überlebensprozessen im Rahmen der Stabilisierung oder Degradierung tumorrelevanter Rezeptoren und Signalmoleküle sowohl im Sinne eines Promotors für die Zellproliferation und Metastasierung als auch als Suppressor an der Hemmung der Apoptose beteiligt. Für die Tumorthherapie ist HSP90 somit ein weiteres interessantes Zielmolekül. Aktuell werden Inhibitoren entwickelt, von denen nicht nur ein direkter Effekt auf den Tumor erwartet wird, sondern es besteht zudem die Annahme, dass Chemotherapeutika wie Oxaliplatin unter HSP90-Inhibition wie Ganetespib besser wirken [67-71].

### 1.3.9 rpS6-Kinase

Die rpS6-K wird in der gängigen Nomenklatur auch als RPS6KB1 (Ribosomal Protein S6 Kinase B1) bezeichnet. Sie gehört zur Familie der ribosomalen S6- (Serin/Threonin-) Kinasen. Ihr wichtigstes Zielmolekül ist das ribosomale S6-Protein, eine Komponente der 40S-Untereinheit des Ribosoms. Die Kinase ist zudem im mTOR/PI3K-Signalweg zu finden und fördert die Proteinsynthese, das Zellwachstum und die Zellproliferation. Es wird vermutet, dass die S6-Kinase auch eine zentrale Rolle in der Energiehomöostase und bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms spielt.

Bei Tumorerkrankungen ist eine Deregulation des mTOR/S6K-Signalwegs möglich. Dies führt nicht nur zu Veränderungen in der Signalkaskade mit Stimulation des Zellwachstums und Hemmung der Tumorsuppressoren, sondern es gibt zudem Hinweise auf Resistenzen gegen Rapamycin (Sirolimus) durch eine mTOR-Untereinheit. Neben Rapamycin, dessen Zielmolekül das der S6-Kinase vorgeschaltete mTOR ist, befinden sich auch Inhibitoren gegen die S6-Kinase

in der Entwicklung. Diese zeigten sich bisher allerdings, bis auf wenige Ausnahmen wie den spezifischen S6K1-Inhibitor PF-4708671, nur in geringem Maße effektiv [72-75].

#### 1.4 Zusammenhänge zwischen den Biomarkern

Wie aus der einleitenden Charakterisierung der einzelnen Biomarker in Kapitel 1.3 hervorgeht, sind die tumorbiologisch veränderten Proteine auf vielfältige Weise an den intrazellulären Signalwegen beteiligt und interagieren mit ihnen auf allen Ebenen der Signaltransduktion. Bei der Betrachtung dieses komplexen Systems ergibt sich die Frage, wie die Tumorbiologie durch das gleichzeitige Auftreten von Überexpression beziehungsweise unkontrollierter Aktivität parallel bei mehreren Biomarkern im selben Tumor beeinflusst wird. Um dieses System der Signalkaskaden mit aktivierenden und hemmenden Komponenten besser verstehen zu können, erscheint es naheliegend, den Einfluss zweier Faktoren zusammenzufassen und die daraus resultierenden Erkenntnisse in das Bild der „drugable targets“, also der therapielevanten Zielmoleküle, zu integrieren. Zudem ist die bereits angesprochene Möglichkeit einer Doppelhemmungsstrategie ein vielversprechendes Werkzeug, um die Tumorthherapie weiterzuentwickeln und bisher unerkannte synergistische und additive Effekte zu nutzen.

Wenn nun einer der untersuchten Biomarker mit Überexpression, also „positiv“-getestet vorliegt, welchen Einfluss hätte in diesem Fall ein zweiter positiver Marker im gleichen Tumor? Besteht bei einem dementsprechend zweifach positiven Tumor eine schlechtere Prognose? Welche Konsequenz hat dieser Umstand für die Therapie?

Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand November 2018) keine Publikationen zu klinischen Studien vorliegen, die solche Zusammenhänge für die Tumorbiologie, Prognose und Prädiktivität untersucht haben, stellt diese Betrachtung einen zentralen Teil der vorliegenden Arbeit dar. Nach der Analyse der einzelnen Faktoren wurden diese in Abhängigkeit von einander und in Bezug auf die klinisch-pathologischen Daten untersucht.

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Verbesserung, Neu- und Weiterentwicklung biomarker-basierter Therapieoptionen beim kolorektalen Karzinom. Dabei besteht sowohl der Bedarf die Biomarker besser zu charakterisieren und bereits vorhandene, bei anderen Tumorentitäten wirksame, Therapeutika beim kolorektalen Karzinom einzusetzen als auch mögliche Zusammenhänge der Zielmoleküle untereinander zu verstehen und entsprechende Konsequenzen für die Tumorbiologie und die Therapiestrategie abzuleiten. Schließlich soll auch auf die im vorausgegangenen Kapitel gestellten Fragen in Bezug auf die gleichzeitige Überexpression mehrerer Biomarker eingegangen werden.

Daraus ergeben sich folgende Ziele:

1. Etablierung von immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren zur Biomarkeranalyse aus frischem Tumorresektat.
2. Auswahl therapierelevanter Biomarker und Analyse deren genotypischer und phänotypischer Expressionsprofile.
3. Gewinn neuer Erkenntnisse über die Zusammenhänge der Biomarker untereinander.
4. Identifikation von Patienten mit hohem Bedarf an neuen Therapiestrategien.
5. Entwicklung entsprechender neuer Therapiestrategien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurde das Gewebe von insgesamt n=144 Patienten untersucht, die während eines Zeitraumes von acht Jahren (2003 bis 2011) eingeschlossen wurden. Davon entfielen n=89 Proben auf kolorektale Karzinome und n=59 auf Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Bei vier Patienten wurden präoperativ synchrone Lebermetastasen nachgewiesen, sodass in diesen Fällen das Gewebe beider Tumorlokalisationen gewonnen und untersucht werden konnte. Zusammengenommen ergaben sich daraus n=148 Tumorproben. Zu jeder Gewebeprobe der Primärtumoren wurde vom gleichen Patienten autologe, benigne Kolonmukosa gewonnen und vergleichend untersucht (n=89). Bei den metachronen Lebermetastasen wurden die relevanten Daten bezüglich des Primärtumors aus den Akten übernommen.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Patientendaten wurden, nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung durch die Patienten, den Akten entnommen und in einer Stammdatenbank unter einer dem Gewebe zugeordneten, fortlaufend vergebenen Nummer abgelegt. Unter dieser Nummer wurden sämtliche Laboruntersuchungen durchgeführt und in der Datenbank abgelegt.

Die Charakteristika des Patientenkollektivs sind in den Übersichtstabellen (*Tabelle 11 und 12*) in Kapitel 3.1 dargestellt. Im Vergleich mit mehreren großen Studien an primären und metastasierten kolorektalen Karzinomen mit insgesamt n= 38424 Patienten [76-83] zeigte sich, dass das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kollektiv, in Bezug auf Epidemiologie und klinisch-pathologische Faktoren, vergleichbar ist.

Die klinisch-pathologischen Daten wurden nach der Aktenlage unter Einbeziehung des pathologischen Berichts erhoben. Es wurden Karzinome mit Lokalisation im gesamten Kolon sowie im Bereich des proximalen Rektumdrittels, entsprechend der Definition nach der S3-Leitlinie [9, 10] oberhalb von 16 cm ab ano, eingeschlossen. Da fünf pathologische Institute mit unterschiedlichen internen Standards für die Begutachtung der Gewebeproben beteiligt waren, lag nicht für alle Gewebeproben die gleiche Vielzahl an Daten vor. Dies betraf hauptsächlich den L-, V- und Pn-Status (Lymphangiosis carcinomatosa, Veneninvasion und Perineuralscheideninvasion) des Tumors. Bei den Primärtumoren reduzierte sich so die Anzahl

der Patienten mit vollständigem Datensatz, das heißt inklusive des L- und V-Status, von n=89 auf n=55 Patienten. Mit dem zusätzlichen Kriterium 'Pn-Status' blieben n=20 Patienten übrig. Aufgrund dieser teilweise sehr geringen Fallzahlen wurden die letztgenannten Parameter nicht in allen statistischen Auswertungsverfahren berücksichtigt.

Ausschlusskriterien waren definiert als:

- Postoperatives Versterben innerhalb von 30 Tagen nach dem Eingriff
- Tumore im Zusammenhang mit hereditären Darmerkrankungen (HNPCC, FAP)
- Zweitmalignome in der Anamnese
- Rektumkarzinome im mittleren oder distalen Rektum Drittel

In der vorliegenden Arbeit wurde primär mit der 7ten Edition des Cancer Staging Manuals von 2010 gearbeitet [84]. Die mit jeder Neuauflage zunehmende Komplexität der einzelnen Tumorstadien ließ sich dabei nicht immer vollständig wiedergeben, da ein Teil des untersuchten Tumorgewebes bereits vor dem Erscheinen der 7ten Auflage reseziert, pathologisch begutachtet und somit nach der 6ten Edition des Tumormanuals [85] klassifiziert worden war. Zum anderen war die Gesamtzahl der untersuchten Patienten nicht groß genug, um ausreichend große Patientengruppen in allen Stadien zu etablieren. Es wurden somit beide Fassungen des Cancer Staging Manuals unter Berücksichtigung der jeweiligen Schwerpunkte und der Vergleichbarkeit berücksichtigt und auf einander abgestimmt. Die Unterschiede der beiden Versionen sind im Anhang in den *Tabelle 50* *Tabelle 51* dargestellt.

Im Rahmen der statistischen Auswertung und Tumornachsorge wurden klinische und tumorassoziierte pathologische Parameter entsprechend der Aktenlage in anonymisierter Form zur Verfügung gestellt, ausgewertet und mit den Daten aus den Untersuchungen verknüpft.

## 2.2 Gewebegewinnung

Die untersuchten Gewebeproben stammten aus vier zertifizierten Darmzentren im Großraum München sowie aus der Chirurgischen Uniklinik Großhadern. Repräsentative Gewebestücke der kolorektalen Karzinome beziehungsweise der Lebermetastasen wurden durch den diensthabenden Pathologen des jeweiligen Zentrums direkt aus dem chirurgischen Resektat präpariert und auf Eis gelagert. Handelte es sich um ein Kolonresektat, wurde ebenfalls tumorferne gesunde Kolonmukosa präpariert und mitgegeben. Nach der Aufarbeitung und Validierung durch den Pathologen, erfolgte der umgehende Transport unter kontinuierlicher Kühlung des Präparats mit einem Kurierdienst in das Labor. Bei Ankunft im Labor wurde das Gewebe direkt, entsprechend der laborinternen SOP, präpariert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren (siehe auch Kapitel 2.5). Die Ischämiezeiten der Gewebeproben wurden mittels eines Begleitscheines dokumentiert und lagen zwischen 15 und 45 Minuten [86]. Alle Gewebeproben wurden in der Gewebebank bei konstanten Temperaturen von  $-80^{\circ}\text{C}$ , entsprechend üblicher Verfahren [86, 87], konserviert.

Zelllinie	Bezug	Tumorentität	Zelltyp	ATCC®- Nummer
HT29	LGC Standards, London, UK	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	HTB-38
DLD-1	LGC Standards, London, UK	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	CCL-221
GEO	Mit freundlicher Unterstützung von Prof. Tortora, Universitätsklinik Neapel	Kolonkarzinom	Epithelial	--
HCT116	LGC Standards, London, UK	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	CCL-247
RKO	Interdisz. Labor, Frankfurt	Kolonkarzinom	Epithelial	CRL-2577
SW480	Interdisz. Labor, Frankfurt	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	CCL-228
CaCo-2	LGC Standards, London, UK	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	HTB-37
Colo205	LGC Standards, London, UK	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelial	CCL-222
HS746T	LGC Standards, London, UK	Magenkarzinom	Epithelial, mesenchymal	HTB-135
N87	LGC Standards, London, UK	Lebermetastase aus Magenkarzinom	Epithelial	CRL-5822
HL60	LGC Standards, London, UK	Promyelozytenleukämie	Promyelozyt	59171

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

## 2.3 Zelllinien

Zur kontinuierlichen Qualitätskontrolle bei den Färbedurchläufen und bei der DNA-Sequenzierung wurden Präparate benötigt, die ein bekanntes und reproduzierbares Ergebnis aufwiesen. Dafür wurden Tumorzelllinien mit verschiedenen tumorpathologischen Ausprägungsmustern verwendet. Die Zelllinien wurden primär von Mitarbeitern im Bereich Zellkultur gepflegt und freundlicherweise für die in dieser Arbeit erforderlichen Kontrollen zur Verfügung gestellt. *Tabelle 1* zeigt eine Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Für die Kontrollen der immunhistochemischen Färbung wurden aus den Zellkulturen Zytopspin-Präparate angefertigt, während für die molekularbiologischen Verfahren die Zelllinien-DNA isoliert und aufbereitet wurde. Beide Verfahren sind im Einzelnen in den folgenden Kapiteln unter 2.5 beschrieben.

### 2.3.1 Zelllinien in der Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurden Objektträger mit Zytopspin-Präparaten (Herstellung siehe Kapitel 2.5) verwendet. Die Zelllinien wurden für den jeweiligen Biomarker als positiv gewertet, wenn mehr als 50% der Zellen gefärbt waren und eine Intensität (definierte Spanne 0-3) von mindestens 2 vorlag.

Bei jeder durchgeführten Färbung wurde ein Zytopspin-Präparat mit den gleichen Reagenzien inkubiert und gefärbt, wie die zu untersuchenden Patientenproben. Ein Fehler im Färbeablauf würde durch das gemeinsame Färben der Zytopspin-Positivkontrolle mit dem Patientengewebe

Antigen	Anti-körper	Zelllinie	Prozent-anteil positiver Zellen	Expressionsprofil			Färbeintensität (±, +, ++)
				Membranständig	Zytoplasmatisch	Nukleär	
Zytokeratin	KL1	HT29	100		•		++
Ki67	MIB-1	HT29	40			•	+ / ++
HLA-DR	DK22	HL60	50	•			+
EpCAM	BerEP4	HT29	100	•			+ / ++
EGFR	H11	HT29	100	•	•		± / +

*Tabelle 2: Zytopspin-Präparate von bekannten Tumorzelllinien als Positivkontrolle. Prozentanteil positiver Zellen im Zytopspin-Präparat. Färbeintensität in ± (schwach), + (mäßig) und ++ (stark) quantifiziert.*

auch die Kontrollen betreffen und somit erkannt werden. Welche Zelllinie als Positivkontrolle für welchen Antikörper benutzt wurde und welche Färbeeigenschaften dieser aufweist, ist in *Tabelle 2* dargestellt. Als Positivkontrolle für den Leukozytenmarker CD45 dienten Leukozyteninfiltrate und Lymphfollikel im Gewebe.

### 2.3.2 Zelllinien in der Molekularbiologie

Zur Analyse der Punktmutationen im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen wurden ebenfalls Zelllinien (*Tabelle 3*) als Validitäts- und Positivkontrollen verwendet. Die jeweilige Mutation der Zelllinie musste bekannt und das Ergebnis reproduzierbar sein. Nach der Auswahl der Zelllinien, entsprechend der jeweils bekannten Mutation, wurden sie aus der zur Verfügung gestellten Kultur entnommen und mit den unten beschriebenen Verfahren, analog zu den Gewebeproben, aufbereitet.

Bei jeder molekularbiologischen Analyse der Patientenproben, nach den in Kapitel 2.5 beschriebenen Schritten, wurde eine, für die zu untersuchende Mutation positive, Zelllinie gemeinsam mit dem Tumorgewebe untersucht. Somit konnte die Zelllinien-DNA den Prozessablauf und die korrekte Darstellung der Ergebnisse als Positivkontrolle für die Patientenproben verifizieren. Eine fehlerhafte Darstellung der Sequenz der Positivkontrolle wurde als ein Indiz für einen Fehler im Verfahrensablauf gewertet und führte automatisch zu einer Wiederholung der gesamten Testreihe.

Zelllinie	BRAF 15	KRAS Ogino	KRAS Pöhlmann
DLD-1	Wt	G13D	G13D
HT29	V600E	Wt	Wt
GEO	Wt	G12A	G12A
HCT116	Wt	G13D	G13D
RKO	V600E	Wt	Wt
SW480	Wt	G12V	G12V

*Tabelle 3: Kolontumorzelllinien mit Herkunft und Mutationsprofil. Wt = Wildtyp = keine Mutation*

## 2.4 Materialien für die immunhistochemische Färbung und Pyrosequenzierung

### 2.4.1 Antikörper

Ergänzend zu den bereits in der Einleitung beschriebenen, maßgeblich in dieser Arbeit untersuchten, Biomarkern wurden im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen weitere Moleküle mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen, die für die Auswertung oder als tumorbiologische Faktoren relevant waren. Diese Antikörper und ihre Verwendung werden im Folgenden erläutert.

Als Nachweis und zur Orientierung bei epithelialen Zellen auf dem Gewebeschnitt diente der anti-humane Zytokeratin-Breitspektrum-Antikörper KL1 (Zytokeratine 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17, 18). Da er ein spezifischer und sehr zuverlässiger Marker ist, wurde er als Positivkontrolle eingesetzt. Neben KL1, diente EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) als Oberflächenmolekül zur Zelltypisierung sowie als Referenzmarker für kurze Ischämiezeiten und die Qualität des Präparates [88, 89].

Antigen	Antikörper	Spezies	Isotyp	Arbeitskonz. µg/ml	Kit	Hersteller	Bestellnummer	Positive Zelllinie
Zytokeratin	KL1	m	IgG1	0,32	-	Beckmann Coulter	IM1918	HCT-116
Ki67	MIB-1	m	IgG1	1,14	-	Dako	M7240	CaCo-2
CD45	2B11/PD7	m	IgG1	4,5	-	Dako	M0701	HL-60
HLA-DR	L243	m	IgG2a	1,0	-	BD Bioscience	347360	Hs746T
EpCAM	BerEp4	m	IgG1	2,5	-	Dako	M0804	HCT-116
EGFR	H11	m	IgG1	2,94	-	Dako	M3563	DLD-1
IGF1R	24-31	m	IgG1	4,0	+	Thermo Fisher	AHR0321	RKO
HGFR	SP44	r	IgG1	2,12	-	Biomol	SPD-M344	HCT-116
MUC1	Ma55.2	m	IgG1	0,5	-	Novacastra	NCL-MUC-1 core	RKO
CD44v6	VFF-18	m	IgG1	1,0	-	eBioscience	BMS125	HCT-116
HSP90	AC88	m	IgG1	10	+	Abcam	Ab13492	HCT-116
Phospho-S6 ribosamales Protein	rpS poly	r	polyklonal	0,24	-	Cell Signaling	2211	RKO

Tabelle 4: Zelltypische Antikörper. Arbeitskonz. bezeichnet die Konzentration in der der Antikörper auf das Gewebe aufgetragen wurde. m = Maus; r = Rabbit; Kit = Verwendung eines Verstärkerkits.

Des Weiteren wurde der Antikörper Ki67 als Proliferationsmarker [90, 91] eingesetzt. Mit ihm konnten Regionen mit hoher Proliferationsaktivität identifiziert und analysiert werden.

Als Nachweis für die Leukozyteninfiltration diente der Panleukozytenmarker CD45 [92]. Mit ihm wurden Leukozyten membranständig markiert. In diesem Zusammenhang wurde auch das Expressionsprofil von HLA-DR (human leukocyte antigen - D related), einem MHC (major histocompatibility complex) - Klasse II Zelloberflächenrezeptor, auf Epithelzellen untersucht [93, 94]. Im Falle einer Immunantwort wird er hochreguliert und kann somit als Aktivierungsmarker genutzt werden. Der Antikörperklon DK22 bindet spezifisch an die alpha-Kette des HLA-DR.

Der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR, auch als HER1 bekannt) ist ein Mitglied der ErbB-Unterfamilie von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Er wird in malignen Zellen hochreguliert und fördert dadurch das unkontrollierte Wachstum. Eine Überexpression ist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Metastasierung sowie mit einer schlechten Prognose verbunden [95-97]. Durch die spezifische und effektive Antikörpertherapie mit Cetuximab und Panitumumab hat EGFR als zentrales Molekül in den Signalwegen an Bedeutung gewonnen. Allerdings korreliert die immunhistochemisch nachgewiesene EGFR-Expression nicht mit einem Ansprechen auf die Antikörpertherapie [98-100].

*Tabelle 4* stellt alle benutzten Antikörper mit Verwendungs- und Herstellerangaben dar.

#### 2.4.2 Negativkontrollen

Die Antikörper und Seren der Negativkontrollen sind in *Tabelle 5* aufgeführt. Sie dienen bei der Auswertung zur Erkennung und Einschätzung der unspezifischen Hintergrundfärbung. Zu diesen Antikörpern zählt MOPC-21, ein monoklonales Immunglobulin der Maus mit

Antikörper und Seren	Isotyp	Stammkonz. mg/ml	Arbeitskonz. µg/ml	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
MOPC-21	IgG1	1	4,5	1:222	Sigma Aldrich	M9269
UPC-10	IgG2a	1	0,667	1:1500	Sigma Aldrich	M9144
Hasenserum		15*	1,5	1:10000	Dako	X0936

*Tabelle 5: Antikörper für die Negativkontrollen. Stammkonz. bezeichnet die Konzentration in dem der Antikörper vom Hersteller geliefert wurde. \*Proteinkonzentration des Serums. Arbeitskonz. bezeichnet die Konzentration in der der Antikörper auf das Gewebe aufgetragen wurde. Verdünnung ist die daraus resultierende Verdünnung.*

unbekannter Spezifität. Es diente als IgG1-Isotypkontrolle. Als IgG2a-Isotypkontrolle wurde UPC-10, ein nicht reaktives Immunglobulin der Maus, verwendet. Negativkontrollen des 4B5-Antikörpers wurden mit Hasenserum in höchster Antikörperkonzentration (1,5 µg/ml) inkubiert.

### 2.4.3 Reagenzien und Chemikalien

*Tabelle 6* zeigt alle benötigten Reagenzien, Lösungen und Chemikalien für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung und der Pyrosequenzierung sowie der jeweils vorgeschalteten Arbeitsschritte.

Die genaue Zusammensetzung und Herstellung von Lösungen für den Färbeprozess sowie die Auswahl der PCR- und Sequenzierungsprimer werden in Abschnitt 2.4.4 beschrieben.

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
<b>Für die Färbung und Immunhistochemie:</b>	
AB-Serum	Bio-Rad Medical Diagnostics, Dreieich
Aceton	Roth, Karlsruhe
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma Aldrich
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka/ Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Fluka/ Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Fluka/ Sigma Aldrich
N,N-Dimethylformamid	Fluka/ Sigma Aldrich
Mayer's Hämalan	Merck, Darmstadt
35%iges Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Eosin Y disodium salt	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ethanol 96%, 80%, 70% vergällt mit MEK	Apotheke Klinikum Großhadern
<b>Für die DNA-Isolation:</b>	
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
QiAmp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
- QiAmp MinElute Columns	
- Puffer ATL	
- Puffer AL *	
- Puffer AW1 (Konzentrat)*	
- Puffer AW2 (Konzentrat)**	

- Puffer AE	
- Carrier RNA	
- Proteinkinase K	
TriFast™	VWR International GmbH, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma Aldrich
<b>Für Orange G Lade-Puffer:</b>	
0,1% Orange G (M= 452,37 g/mol)	Roth, Karlsruhe
50% Saccharose, DNase/RNase frei	Roth, Karlsruhe
50x TAE-Puffer	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Für die PCR:</b>	
Wasser für Molekularbiologie, DEPC-behandelt	Roth, Karlsruhe
HotStarTaqDNS Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
Primer (siehe 2.4.4.2)	Metabion AG, Martinsried
10x PCR-Puffer incl. 15mM Mg2+	Qiagen GmbH, Hilden
Roti-Mix PCR1 (dNTPs 2mM)	Roth, Karlsruhe
Humane männliche DNA (100ng/µl)	Promega, Madison, USA
<b>Für die Gelelektrophorese:</b>	
Ethidiumbromid Lösung. 10mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PeqGold Universal Agarose	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
50 x TAE –Puffer	Eppendorf AG, Hamburg
H2O destilliert	Eppendorf AG, Hamburg
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
GeneRuler ultra low range DNA ladder 10-300Bp	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
<b>Für die Pyrosequenzierung:</b>	
PyroMark Gold Q24 Reagents	Qiagen GmbH, Hilden
- Enzyme Mixture***	
- Substart Mixture****	
- dATP	
- dGTP	
- dCTP	
- dTTP	
Sequenzierungsprimer (siehe 2.4.4.2)	Metabion AG, Martinsried
PyroMark Binding Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Wash Buffer	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMark Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden
Streptavidin-coated Sepharose™ beads	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Molekularbiologisches Wasser	Roth, Karlsruhe
70% Ethanol	Apotheke Klinikum Großhadern

Table 6: Aufstellung der Verwendeten Chemikalien, gelistet nach Methode.

Zusammensetzung des DNA Mikro Kits; \*) Enthält ein Guanidin - Salz. Nicht kompatibel mit Bleichmittel enthaltenden Desinfektionsmitteln. \*\*) Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. \*\*\*) Enthält Dithiothreitol, DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferin, Apyrase, SSB, \*\*\*\*) Enthält Dithiothreitol, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Adenosin-5'-Phosphosulfat

## 2.4.4 Lösungen

### 2.4.4.1 Für die Immunhistochemie

#### PBS

Als Grundlage für die Waschschritte und die Herstellung des Suspensionsmediums für Antikörper wurde die physiologische und isotonische phosphatgepufferte Salzlösung PBS (phosphate buffered saline) verwendet. Diese setzt sich aus folgenden Chemikalien zusammen:

- 8,0g Natriumchlorid (NaCl)
- 0,2g Kaliumchlorid (KCl)
- 1,42g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- 0,27g Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Die hier genannten Komponenten wurden in einem Liter destillierten Wassers aufgelöst. Nach jedem Herstellungsvorgang erfolgte eine pH-Kontrolle, bei der ein Ziel-pH-Wert von 7,4 angestrebt wurde. Seltene Abweichungen wurden je nach pH-Wert mit Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) korrigiert.

#### Antikörper

Für die Antikörpertitration wurde 10%-AB-Serum-PBS als Verdünnungsmedium genutzt. AB-Serum ist ein antikörperfreies, humanes Serum der Blutgruppe AB und eignet sich damit als physiologisches Suspensionsmedium. 10%-AB-Serum-PBS wurde aus 1ml AB-Serum in 9ml PBS hergestellt.

Die Antikörper wurden in der jeweils zuvor etablierten, optimalen Konzentration (siehe *Tabelle 4*) für jeden Färbeprozess neu mit 10%-AB-Serum-PBS angesetzt.

#### AEC-Peroxidase-Färbelösung

Zur Herstellung der AEC-Peroxidase-Färbelösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol) wurde zunächst 100xNatriumacetat-Stammlösung benötigt. Die Herstellung der Stammlösung erfolgte, indem zunächst 28,7g Natriumacetat in 50ml destilliertem Wasser langsam unter Rühren gelöst wurden. Unter dem Abzug wurden dann 9,4ml Essigsäure hinzugefügt und die Lösung anschließend mit destilliertem Wasser auf 100ml aufgefüllt. Darauf folgte eine pH-Kontrolle,

bei der ein optimaler pH-Wert von 4,9 angestrebt und bei Bedarf mit Essigsäure eingestellt wurde.

Mit den folgenden Schritten wurde daraufhin die AEC-Peroxidase-Färbelösung hergestellt:

1. 2ml 100xNatriumacetat-Stammlösung in 200ml destilliertes Wasser geben.
2. 50mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 5ml N,N-Dimethylformamide lösen.
3. Produkt aus 2. in Produkt aus 1. geben.
4. 100µl 35%iges Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzufügen.

Da AEC als kanzerogen gilt, war ein besonders sorgfältiges Arbeiten unter dem Abzug erforderlich. Durch das beschriebene Vorgehen entstanden etwa 200ml Lösung, die komplett für eine Färbeküvette gebraucht wurde. Die Lösung wurde stets frisch angesetzt und für jede Färbung neu hergestellt.

#### 2.4.4.2 Für die Pyrosequenzierung

##### TAE – Puffer

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

##### Primer

Um die DNA im Bereich der prognose- und therapielevanten Gensequenzen BRAF und KRAS auf Mutationen zu untersuchen, kamen PCR- und Sequenzierungsprimer zum Einsatz, welche sich bereits in renommierten und wegweisenden Publikationen als zuverlässig erwiesen hatten [101-103]. Im Rahmen einer zusätzlichen Qualitätskontrolle wurde das KRAS-Gen doppelt untersucht. Dafür wurden beide DNA-Stränge, sowohl der Vorwärtsstrang (Ogino [102]) als auch der Rückwärtsstrang (Poehlmann [103]) analysiert.

Für das ERCC1-Gen war bereits ein breites Spektrum an Primern aus der Literatur bekannt [44, 104-106]. Es wurden aber auch Primer beschrieben, die, am ehesten aufgrund der relativen Länge des resultierenden PCR-Produktes, keine verwendbaren Ergebnisse erbrachten [45]. Um eine gut zu identifizierende Größe der PCR-Produkt für die Gelelektrophorese und den Restriktionsverdau zu erhalten, wurden für diese Arbeit eigene Primer entworfen und

getestet. Als Grundlage dienten die DNA-Sequenz des ERCC1-Gens sowie die bekannten Primer aus der Literatur und die Kenntnis über die Bindestelle des BsrDi-Restriktionsenzym (siehe 2.5.4.7). In einem ersten Schritt wurden die entworfenen Primer zunächst digital, mittels der Analysesoftware BLAST [107] des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), auf ihre individuelle Bindungsstelle und mögliche Fehler getestet. Diese Entwicklungsschritte wurden sowohl für die PCR-Primer als auch für die Sequenzierungsprimer durchgeführt.

a. Für die PCR:

Die bei Lieferung lyophilisierten Primer wurden unter sterilen Bedingungen, gemäß den Herstellerangaben, mit Wasser für die Molekularbiologie gelöst und auf 100pM/μl verdünnt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 Sekunden durchmischt. Dann wurden 20μM Aliquots (500μl als Mix aus Forward- und Reverse-Primer) hergestellt und eine Test-PCR durchgeführt, um die vollständige Lösung und die Verwendbarkeit der Primer sicherzustellen.

Jeweils ein Primer (entweder Vorwärts- oder Rückwärtsstrang) eines jeden untersuchten Gens war von der Herstellerfirma mit einem Biotin-Molekül versehen worden, welches für die später durchgeführte Pyrosequenzierung benötigt wurde.

Gen	Produktgröße	Primersequenz
BRAF Exon 15	91 Bp	Forward: 5'-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG-3' Reverse: 5'-Bio-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT-3'
KRAS Exon 2 (Ogino)	82 Bp	Forward: 5'-NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' Reverse: 5'-Bio-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'
KRAS Exon 2 (Poehlmann)	82 Bp	Forward: 5'-Bio-TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG-3' Reverse: 5'-TCGTCCACAAAATGATTCTGA-3'
ERCC1 Codon 118	219 Bp	Forward: 5'-TCCCTATTGATGGCTTCTGC-3' Reverse: 5'-TCATGTCCCAGTGTTCTGGA-3'

Tabella 7: Primer für die PCR

b. Für die Pyrosequenzierung

Die Primer für die Pyrosequenzierung wurden ebenfalls lyophilisiert geliefert und nach den Herstellerangaben mit Wasser für die Molekularbiologie auf eine Konzentration von 100pM/μl gebracht. Anschließend wurden unter der Verwendung von PyroMark Annealing Buffer 3μM Aliquots hergestellt. Diese Lösung wurde danach zehnfach verdünnt, um eine Endkonzentration der Primer von 0,3μM in den Aliquots zu erreichen.

Gen	Primersequenz
BRAF Exon 15	5'-GTAAAAATAGGTGATTTTGG-3'
KRAS Exon 2 (Ogino)	5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3'
KRAS Exon 2 (Poehlmann)	5'-GCACTCTGCCTACG-3'
ERCC1 Codon 118	5'-GTAAGAAGTTCGTGC-3'

Tabella 8: Primer für die Pyrosequenzierung

Orange-G Ladepuffer für die Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Orange-G Ladepuffers wurden in einem Reaktionsgefäß 0,01g Orange-G und 5g Saccharose/Sucrose (DNase/RNase frei) eingewogen und in 10ml 1xTAE-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde in 1ml-Einheiten aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Der Farbstoff Orange-G verhält sich in der Gelelektrophorese, dem Spannungsgefälle folgend, etwa wie ein 10Bp Fragment doppelsträngiger DNA (z.B. PCR-Produkt) und dient in diesem Rahmen zur Kontrolle der Lauffront in der Elektrophorese. Die hohe Viskosität der Lösung erlaubt eine einfache Anwendung, da auch versehentlich pipettierte Luftblasen die DNA-Probe nicht aus der Geltasche schwemmen. Der hinzugefügte Puffer diente lediglich zur Erleichterung beim Auftragen der DNA-Proben.

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Grundlagen

#### 2.5.1.1 Einfrieren von Gewebe

Das Einfrieren der Gewebeproben erfolgte auf Grundlage eines laborinternen, standardisierten Verfahrens, einer SOP. Nach dem Wiegen, Freipräparieren und Teilen der Gewebestücke (Mukosa in ca. 2cm lange Stücke, Tumore und Metastasen in ca. 0,5 bis 1cm Blöcke) wurden diese, um das Gewebe zu schonen, zunächst nur im Stickstoffdampf und anschließend in flüssigem Stickstoff gehalten und schockgefroren. Die Archivierung erfolgte danach portionsweise in beschrifteter Aluminiumfolie bei konstanter Temperatur von -80°C.

#### 2.5.1.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Sowohl für die immunhistochemische Färbung, als auch für die Pyrosequenzierung wurden feine Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Für diesen Arbeitsschritt kam das Gefriermikrotom der Firma Leica (Jung Frigocut 2800E) zum Einsatz. Anders als bei der Paraffinhistologie, bei der das Gewebe zuerst aufwendig in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten wird, werden Gefrierschnitte ohne diesen relativ aggressiven und teilweise gewebeschädigenden Konservierungsprozess gefertigt. Entscheidend bei der Kryokonservierung ist die konstante Aufrechterhaltung der Temperatur. Das Gefriermikrotom gewährleistete für diese Anforderung eine stabile Temperatur bei -23°C.

Im Mikrotom wurde das zu untersuchende Gewebe zunächst mit dem makroskopisch vermuteten Tumoreal nach oben im Einbettmedium (Tissue-Tek® Compound, Art.-Nr. 4583) auf einem Korkplättchen fixiert und anschließend in 5µm dünne Scheiben geschnitten. Diese hauchdünnen Gewebeschnitte wurden anschließend durch Adhäsionskraft, welche durch die positive Ladung der Objektträger (Poly-Prep Slides®, Sigma-Aldrich) entstand, vom Schneidemesser auf das Glas aufgebracht.

Zunächst wurden so einige Probeschnitte angefertigt und nach Färbung mit Mayer's Hämalaun unter dem Mikroskop kontrolliert. Ein qualitativ guter Gewebeschnitt sollte möglichst komplette Mukosakrypten beziehungsweise ausreichend große Tumoranteile enthalten. War dies nicht der Fall, wurde die Ausrichtung des Gewebeblocks im Mikrotom angepasst. Die Tumordinvasionsfront der kolorektalen Karzinome war nur selten aufzufinden.

Lebermetastasen hingegen wiesen in der Regel immer die Grenze, also die Tumorinvasionsfront, zum gesunden Lebergewebe auf. Nach der Optimierung der Schnittebene wurden die endgültigen Gewebeproben auf die Objektträger aufgezogen. Hierbei kam es auf sorgfältiges Arbeiten an, um eine etwaige Furchen- oder Faltenbildung zu vermeiden. Solche Unregelmäßigkeiten können bei der Färbung Artefakte verursachen, welche zu einer Fehlinterpretation führen oder die Auswertung unmöglich machen. Wichtig war zudem eine serienmäßige Produktion der Gewebeschnitte ohne größere Verluste dazwischen, um möglichst benachbarte Gewebeschnitte, und somit wiedererkennbare und vor allem vergleichbare Areale aus dem Gewebeblock zu erhalten. Jeder Objektträger wurde mit der Gewebenummer, Seriennummer sowie dem Schneidedatum versehen.

Anschließend erfolgte, für die zur Färbung bestimmten Schnitte, das Trocknen bei Raumtemperatur in einem staubfreien Umfeld. Die Gewebeschnitte für die DNA-Analyse konnten nun direkt weiterbearbeitet oder in 70% Ethanol bei +4°C gelagert werden.

#### 2.5.1.3 Anfertigen von Zytospinpräparaten

Zur Qualitäts- und Erfolgskontrolle jeder Färbung liefen, parallel zu den Gewebeproben, die Zytospin-Präparate aus der Zellkultur mit dem jeweils geeigneten Expressionsmuster im Färbeprozess mit. Von großer Wichtigkeit waren eine hohe Zellvitalität und eine angemessene Zelldichte, um zuverlässige Positivkontrollen zu generieren.

Die im Kulturmedium befindlichen Zellen wurden zunächst ausgezählt und anschließend im Medium verdünnt, um eine geeignete Zellzahl auf dem Objektträger zu gewährleisten. Mit einer Zytospinzentrifuge der Firma Shandon (Cytospin 2) wurden die Zellspots auf Objektträgern, gemäß den Herstellerangaben, angefertigt und wie die Gewebeschnitte in staubfreiem Umfeld bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung der Präparate erfolgte anschließend in der Gewebebank bei einer konstanten Temperatur von -80°C.

#### 2.5.2 Etablierung der verschiedenen Methoden anhand des ERCC1-Genanalyse

Das ERCC-1-Gen war vor allem im Rahmen der Etablierung der molekularbiologischen Methoden von zentraler Bedeutung, da es mit allen in dieser Arbeit zum Tragen kommenden Methoden untersucht werden kann. Im Speziellen handelt es sich hierbei um die PCR mit

anschließender Gelelektrophorese, die Pyrosequenzierung als alternativer Ansatz und als drittes Verfahren die immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten.

Während der ersten Analyseversuche mittels der etablierten und in der Literatur häufig verwendeten Gelelektrophorese [104, 108] zeigte sich, dass die Gele sowohl aufgrund von Artefakten als auch im Rahmen der semiquantitativen Bestimmung der Banden häufig nicht eindeutig ausgewertet werden konnten. Um die Auswertung zu verbessern, wurde im Rahmen der Etablierungsphase ein Verfahren entwickelt, mit dem die Sequenz des ERCC1-Gens in der Pyrosequenzierung bestimmt werden kann. Details zum Vergleich der Gelelektrophorese mit der Pyrosequenzierung finden sich in *Kapitel 2.5.5*.

Versuche den ERCC1-Nachweis über die immunhistochemische Färbung zu etablieren bleiben trotz verschiedener Ansätze und diverser Versuchsreihen frustan. Während sich die anderen Biomarker mittels der immunhistochemischen Färbung nach einigen Versuchen größtenteils problemlos nachweisen ließen, war der Nachweis des ERCC1-Moleküls auch nach dem Austausch der Reagenzien beziehungsweise dem Erwerb einer neuen Charge der erforderlichen Antikörper nicht möglich. Da sich die Färbemethode mit den übrigen zu untersuchenden Biomarkern zuverlässig etablieren ließ, wurde letztendlich auf den ERCC1-Nachweis mittels immunhistochemischer Färbung verzichtet.

Die genaue Beschreibung der ERCC1-Analyse mittels Gelelektrophorese und Pyrosequenzierung sowie die Ergebnisse und der Vergleich der beiden Methoden finden sich jeweils ergänzend in den entsprechenden Kapiteln dieser Arbeit.

### 2.5.3 Kryoimmunhistochemie

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der immunhistochemischen Färbung beruhte auf dem Prinzip der Labelled Streptavidin-Biotin-Methode, kurz LSAB [109]. Dieses standardisierte, im Labor seit langem etablierte Verfahren [110] beinhaltet einen komplexen und langen Färbeablauf, in dem ein Antikörpergerüst, basierend auf dem nachzuweisenden Antigen, in mehreren Schritten aufgebaut wird. Die Endstrecke dieses Gerüsts wird dann in einer Farbreaktion (Peroxidasereaktion) sichtbar gemacht (Abbildung 1).

Die vorbereiteten Gefrierschnitte sowie die aufgetauten Zytospin-Präparate aus den oben genannten Arbeitsschritten wurden zur Gewebe- und Zellfixierung auf den Objektträgern zunächst für acht Minuten in reinem Azeton gebadet und für weitere acht Minuten staubfrei

bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Präparate 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 10-prozentigen AB-Serum-PBS-Lösung rehydriert. Gleichzeitig musste in diesem Schritt die endogene Gewebeperoxidase blockiert werden, da diese sonst bei der späteren Peroxidasereaktion eine unspezifische Färbung hervorrufen würde. Endogenes Biotin wurde dann in zwei 15-minütigen Inkubationsschritten mittels dem Avidin-Biotin Blocking-Kit (Vector Laboratories) gebunden. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur und daraufhin die Inkubation mit dem spezifischen biotinylierten Sekundärantikörper für weitere 30 Minuten. Schließlich wurde das Horseradish-Peroxidase-Streptavidin (HRP-Streptavidin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger vorsichtig drei Mal für insgesamt etwa zehn Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion nach acht Minuten in der AEC-Peroxidase-Lösung in Dunkelheit und unter Raumtemperatur sichtbar gemacht. Die Präparate wurden schließlich mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt und unter fließendem Wasser für mindestens 20 Minuten gebläut. Zuletzt wurden die Objektträger nach Antrocknen mit Kaiser's Glycerinergelatine eingedeckt und versiegelt. Die Negativkontrollen wurden parallel in den gleichen Arbeitsschritten mit den entsprechenden Antikörpern (siehe *Tabelle 5*) inkubiert, um die unspezifische Hintergrundfärbung berücksichtigen zu können.

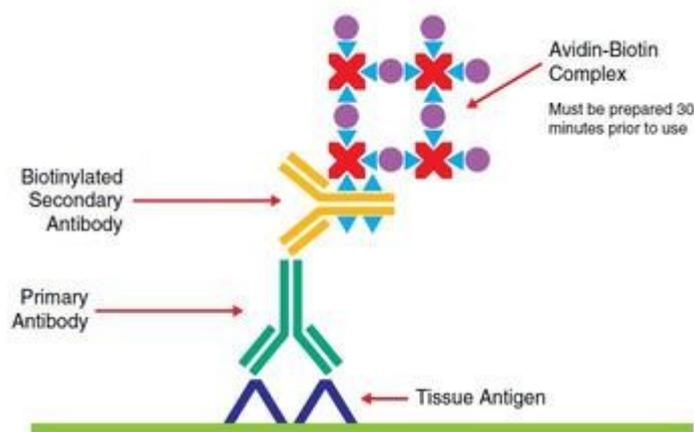


Abbildung 1: Avidin-Biotin-Komplex (ABC) [111]

### 2.5.3.1 Auswertung

Innerhalb von zwei Tagen nach der Färbung folgte die semiquantitative Auswertung der Präparate unter dem Lichtmikroskop der Firma Olympus (Phasenkontrastmikroskop BX40). Zunächst wurden die Positivkontrollen systematisch ausgewertet und die Qualität des Färbeprozesses für jeden Antikörper geprüft. Dabei wurde die zu erwartende spezifische Anfärbung in Prozent aller Zellen sowie die Färbeintensität überprüft (siehe *Tabelle 2*) und mit den bekannten Befunden verglichen. Areale mit Färbeartefakten wurden ausgeblendet. Bei fehlendem oder unspezifischem Ergebnis wurde der korrekte Ablauf des Färbungsprozesses in Frage gestellt, die Ergebnisse für den jeweiligen Antikörper verworfen und die Färbung wiederholt.

Anschließend wurden die Negativkontrollen untersucht und somit unspezifische Färbungen ermittelt. Sollte es dabei zu einer leichten Reaktion gekommen sein, erfolgte die tatsächliche Auswertung der Gewebeproben stets im direkten Vergleich und unter Berücksichtigung dieser Färbung. Bei stärker ausgeprägter Färbung der Negativkontrollen wurde das Ergebnis verworfen und die Färbung wiederholt.

Die tatsächliche Auswertung der Antigenfärbung erfolgte anschließend semiquantitativ. Zunächst wurden die prozentualen Anteile der spezifisch angefärbten Mukosa- oder Tumorzellen auf dem Präparat geschätzt. Ebenso wurde die Färbeintensität semiquantitativ nach dem Schema leicht (1), mäßig (2) oder stark (3) geschätzt. Heterogenität der Färbung im Gewebe wurde gesondert dokumentiert und die stärkste aufgetretene Färbeintensität als geltend ausgewählt. Als Referenz für die Areale, die Epithel beziehungsweise Tumorepithel zeigten, diente während der gesamten Auswertungsphase der Zytokeratin-Nachweis (KL1) auf einem gesonderten Objektträger. Die Auswertung erfolgte, wie oben beschrieben, immer in der Zusammenschau mit den Negativ- und Positivkontrollen.

Die Zellproliferation wurde mit dem Ki67-Labeling-Index [112] quantifiziert. Dieser stellt den Anteil an Ki67 positiven Tumorzellen in einem ausgewählten Areal des Präparates mit hoher Zellfärberate (sogenannte Hot-Spot-Region) dar. Zur Berechnung wird das Verhältnis von gefärbten zu negativen Zellen in drei verschiedenen Blickfeldern von 250 x 250µm bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert in Prozent wiedergegeben. Bei der Auswertung der Mukosa wurde das Blickfeld auf eine komplette Krypte angepasst und betrug somit im Mittel die Maße 300 x 400µm.

Ergänzend wurden neben den Epithelzellen auch die anderen vorkommenden Zelltypen berücksichtigt und mitausgewertet. So wurde das Färbeverhalten von Leukozyten und deren Lokalisation im Gewebe, von Fibroblasten im Bindegewebe sowie von Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae ebenfalls dokumentiert. Gelegentlich war auch eine Aussage über Endothelzellen aus Gefäßanschnitten möglich. Die Färbereigenschaften von Muzin, zum Beispiel in den Mukosakrypten oder Schleimseen bei muzinösen Adenokarzinomen, wurden ebenso dokumentiert wie die Nekroseareale und ihre Umgebung, wenn diese im Präparat vorhanden waren. Besonderes Augenmerk galt zudem der Tumordinvasionsfront. Hier wurde auf eventuell vorhandene tumornahe, gesunde Mukosa- beziehungsweise Leberzellen geachtet.

Bei der Auswertung der tumorfernen Mukosa wurde zusätzlich die Lokalisation der positiven Epithelzellen in der Krypte dokumentiert. Hierfür wurde die Krypte in Oberfläche, Hals und Basis unterteilt.

Alle Ergebnisse wurden standardisiert für alle Antikörper auf einem eigens entwickelten Auswertungsbogen dokumentiert (siehe Anhang).

#### 2.5.4 Molekularbiologische Verfahren

Das Tumorgewebe wurde nicht nur mittels der oben erläuterten Färbungen untersucht, sondern auch molekularbiologisch aufgearbeitet, um therapie- beziehungsweise prognoserelevante Gene im Rahmen einer Mutationsanalyse zu sequenzieren. Dafür wurden die gleichen, nach Eingang im Labor kryokonservierten, Gewebeprobe verwendet. Auch für die Sequenzierung wurden Gewebeschnitte nach dem oben genannten Verfahren im Mikrotom angefertigt. Es war dabei wichtig eine möglichst ununterbrochene Serie von Schnitten der Reihenfolge nach auf mehrere fortlaufend nummerierte Objektträger zu verteilen, damit nach der HE-Färbung eines jeden zweiten Objektträgers das Tumorgewebe auf den dazwischenliegenden Nativschnitten durch den direkten Vergleich möglichst problemlos identifiziert werden konnte.

Nach dem Anfertigen der 5µm dicken Gewebeschnitte konnten diese entweder direkt weiterverwendet oder bei +4°C in 70% Ethanol gelagert werden.

#### 2.5.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist eine weit verbreitete Routinefärbemethode, die zur Darstellung von Tumorzellen verwendet wird. Es wurde, entsprechend der alternierenden Abfolge der Kryoschnitte, jeder zweite Schnitt gefärbt, sodass eine gute Vergleichbarkeit zu den Nativ-Präparaten bestand.

Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte zuerst für 30 Sekunden in Meyer's Hämalaun getaucht und anschließend mindestens zehn Minuten unter laufendem Leitungswasser gebläut. Im nächsten Schritt folgte die Färbung in 2% Eosin – Lösung für 90 Sekunden, gefolgt von einer Ethanolreihe, beginnend mit 80% Ethanol. Zur vollständigen Entwässerung wurden die Schnitte zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol getaucht. Abschließend wurden die Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckt.

#### 2.5.4.2 Mikrodissektion

Um von den nativen Kryoschnitten eine ausreichende und repräsentative Menge an Tumorzellen zur molekularbiologischen Untersuchung zu gewinnen, wurde die Mikrodissektion verwendet. Die Menge der gewonnenen Zellen wurde anhand der abgetragenen Fläche bestimmt. Dies war erforderlich, da die erhaltene Konzentration pro Volumen, im Rahmen der darauffolgenden DNA-Isolation, nicht photometrisch quantifiziert werden konnte.

Damit eine einfach zu bestimmende, standardisierte Fläche auf den Gewebeschnitten definiert werden konnte, wurde ein Gitternetzokular für das Zeiss Axiovert 40 CFL eingesetzt. Bei 200-facher Vergrößerung wurde dann eine Fläche von 32 Gitternetzflächen mikrodisseziert, was einer Größe von  $2\text{mm}^2$  entspricht. In der Etablierungsphase hatte sich diese Größe, bei einer Versuchsreihe mit 1, 4, 8, 16, 32 und 64 Gitternetzflächen, als die mit dem qualitativ und quantitativ besten Ergebnis in der Gelelektrophorese gezeigt.

Für die Mukosaproben wurde die optimale Gewebemenge anhand der Anzahl der zu verwendenden Krypten, in einem analogen Verfahren, auf fünf Mukosakrypten festgelegt.

Nun wurden die relevanten Bereiche, mit ausreichend großem Tumorareal beziehungsweise mit mindestens fünf Krypten im Längsschnitt, auf den Nativschnitten identifiziert. Als Orientierung dienten die zuvor gefärbten HE-Schnitte im Vergleich. Mit einem spitzen Skalpell (Feather® No. 11) wurden die Zellen unter Sicht präzise, das heißt ohne Bindegewebe und mit

ruhiger Hand zu Zellhaufen aufgeschoben, anschließend mit der Skalpellspitze aufgenommen und in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß mit 15µl ATL-Puffer (siehe Material zur DNA-Isolation *Tabelle 6*) überführt. Das gewonnene Material konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

#### 2.5.4.3 DNA-Isolation aus mikrodissiziertem Gewebe

Für die Isolation der DNA aus den per Mikrodissektion gewonnenen Zellen wurde das QIAmp-DNA-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte waren in den Herstellerangaben [113] präzise vorgegeben. Da die Menge des gewonnenen Materials quantitativ deutlich unter der angegebenen, maximalen Gewebemenge lag, wurden die empfohlenen Puffermengen reduziert. Für diesen und alle folgenden Arbeitsschritte wurden nur separat gelagerte DNase- und RNase-freie Pipettenspitzen verwendet.

Das Pipettierschema bestand aus folgender Sequenz:

1. 15µl ATL-Puffer zu dem bereits in ATL-Puffer gelösten Gewebe hinzufügen.
2. 10µl Proteinkinase K dazugeben und durchmischen.
3. 3 Stunden im Thermomixer bei 56°C inkubieren.
4. 25µl ATL-Puffer und 50µl AL-Puffer hinzufügen, durchmischen und zentrifugieren.
5. Zugabe von 50µl Ethanol, durchmischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Lysat in „QIAmp MinElute - Column“ übertragen und zentrifugieren.
7. Die „MinElute Column“ in ein sauberes Eppendorfgefäß stellen und 500µl AW1-Puffer hinzugeben und erneut zentrifugieren.
8. Schritt 7 mit 500µl AW2-Puffer durchführen.
9. Die „MinElute Column“ in ein sauberes Eppendorfgefäß stellen und erneut zentrifugieren.
10. Die „MinElute Column“ in ein neues sauberes Eppendorfgefäß stellen, 30µl AE-Puffer hinzufügen und eine Minute inkubieren lassen.
11. Zentrifugieren, um die DNA, gelöst in AE-Puffer, aus der „MinElute Column“ in das Eppendorfgefäß zu transferieren.

Die isolierte DNA konnte nun bis zum nächsten Arbeitsschritt bei -20°C gelagert werden.

#### 2.5.4.4 DNA-Isolation aus Zellpellets

Die in *Kapitel 2.3.2* genannten Zelllinien dienten als Positivkontrollen für die Gelelektrophorese und die Pyrosequenzierung. Zur Vorbereitung wurden die zu diesem Zweck in Kultur genommenen Tumorzelllinien zu Zellpellets abzentrifugiert. Für die Phasentrennung wurde das Zellpellet zunächst mit 1ml TriFast (enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat) in einem Eppendorfgefäß für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sekunden geschwenkt und erneut für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Probe für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere, vorwiegend aus RNS bestehende, farblose Phase wurde entfernt. Im nächsten Schritt wurden 0,3ml 100% Ethanol zur Probe hinzugefügt und gut gemischt. Daraufhin erfolgte die erneute Inkubation und Zentrifugation, um die präzipitierte DNA zu sammeln. Die DNA wurde dann mehrfach mit Ethanol gewaschen und in 500µl 8mM NaOH gelöst. Nach dem Lösen der DNA musste der pH-Wert mit 50µl 0.1M HEPES auf einen pH = 8.0 eingestellt werden [114, 115].

#### 2.5.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR)

Mit der PCR können die relevanten, zu untersuchenden DNA-Segmente selektiv amplifiziert werden. Diese Amplifikation wird benötigt, um in den anschließend durchgeführten Verfahren (z.B. Sequenzierung) mit einer ausreichenden Menge an DNA-Segmenten arbeiten zu können. Wie im vorausgegangenen Arbeitsschritt, wurde auch bei der PCR mit DNase- und RNase-freien Pipettenspitzen sowie PCR-geeigneten Eppendorfgefäßen auf einer speziell gereinigten Werkbank gearbeitet.

Bei jeder durchgeführten PCR wurde, außer den Gewebeproben, eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle zur Validierung des Verfahrens untersucht. Als Positivkontrolle wurde jeweils die DNA einer Kolontumorzelllinie (*Tabelle 3*) mit bereits bekannter Sequenz verwendet. Im Reaktionsgefäß für die Negativkontrolle wurde die isolierte DNA durch das äquivalente Volumen reinen Wassers (H<sub>2</sub>O für die Mikrobiologie) ersetzt, damit alle Reaktionsgefäße das gleiche Volumen enthalten. Insgesamt beinhaltete jeder PCR-Ansatz 40µl, woraus sich für die weitere Verwendung 8µl PCR-Produkt für die Gelelektrophorese und zweimal 15µl (einmal als Reserve) für die Pyrosequenzierung ergaben.

Die optimale Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die besten Bedingungen für die PCR waren im Labor bereits über Jahre in diversen Versuchsreihen etabliert und in einer SOP zusammengefasst worden. Es galten folgende Voraussetzungen:

- Optimale  $Mg^{2+}$  – Konzentration: 1,5mM
- Optimale einzusetzende DNA–Menge:
  - Für Positivkontrollen: 10ng
  - für Patientenproben: Mikrodissektion von 32 Feldern im Gitternetz bei 200facher Vergrößerung.
- Optimale Temperatur: siehe PCR-Programm (*Abbildung 3*)
- Optimale Anzahl der PCR – Zyklen: 50 Zyklen
- Optimale Primerkonzentration: 0,4 $\mu$ m
- Optimale Konzentration der dNTPs: 0,2mM
- Optimale Konzentration der HotStarTaqDNA Polymerase: 1,0 U/ $\mu$ l

Der sogenannte Mastermix bildete die Grundlage für die PCR, da alle zum Ablauf der Reaktion benötigten Komponenten enthalten waren. Unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen, konnten mit der in *Abbildung 2* dargestellten Berechnungsmatrix die benötigten Mengen der einzelnen Bestandteile des Mastermix (MM), entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben, berechnet werden.

Um beispielsweise die Gensequenz von KRAS von einer beliebigen DNA-Probe zu amplifizieren, wurde der Primer-Mix (in diesem Beispiel für KRAS) und die, in den oben

KRAS Ex2	2	Ansätze				
	stock		f.c.		1x	<b>MM</b>
H2O					29,00	<b>58,00</b>
10xbuffer	10	x	1,0	x	4,00	<b>8,00</b> incl.15mM
MgCl2	25	mM	1,5	mM		<b>0,00</b> MgCl2
dNTP	2	mM	0,2	mM	4,00	<b>8,00</b>
Primer-Mix	20	$\mu$ M	0,4	$\mu$ M	0,80	<b>1,60</b>
Taq-Pol	5	U/ $\mu$ l	1,0	U	0,2	<b>0,40</b>
QIAGEN Taq					<b>40</b>	
DNA					<b>2,0</b>	

Abbildung 2: Berechnungsmatrix für die Mengenverhältnisse der PCR-Reagenzien. Dargestellt ist die Berechnung für 2 Ansätze. MM= Mastermix, 10xbuffer beinhaltet bereits 15mM  $Mg^{2+}$

genannten Schritten, isolierte DNA zum vorbereiteten Mastermix hinzupipettiert. Dieser fertige PCR-Ansatz wurde anschließend im PCR-Cycler (Mastercycler gradient, Eppendorf), nach dem in *Abbildung 3* dargestellten Protokoll, über 50 Zyklen auf die jeweils programmierten Temperaturen erhitzt. Bei der gleichzeitigen Amplifizierung verschiedener Gensequenzen wurde für jedes Gen ein sequenzspezifischer Mastermix mit dem zugehörigen Primer-Mix hergestellt.

Wie bereits an Hand der Berechnungsmatrix abzulesen ist, ergaben sich folgende Mengenverhältnisse für einen einzelnen Ansatz:

- 29µl H<sub>2</sub>O für die Molekularbiologie
  - 4µl 10xPCR-Puffer (incl. 15mM Mg<sup>2+</sup>)
  - 4µl Roti-Mix PCR1 dNTPs als Substrat für die Amplifikation
  - 0,8µl Primer-Mix: die für jeden Genabschnitt spezifischen Forward- und Reverse-Primer
  - 0,2µl HotStarTaqDNA-Polymerase als verwendetes Enzym
  - 2,0µl DNA (Patient/Zelllinie) oder H<sub>2</sub>O für die Molekularbiologie (Negativkontrolle)
- (Übersicht der Reagenzien siehe *Tabelle 6*)

lid	104°C	
nowait	auto	
1	95°C	15min
2	95°C	30sec
3	60°C	30sec
4	72°C	30min
5	GOTO: 2	REPEAT: 49
6	72°C	2min
7	HOLD	4°C

*Abbildung 3: Programmierung/Arbeitsschritte des Eppendorf Mastercycler gradient*

Die Programmierung des Mastercycler gradient (Abbildung 3) sah im ersten Schritt die Erhitzung des Gerätedeckels auf 104°C vor, um die Kondensation des Untersuchungsmaterials am Deckel der Reaktionsgefäße zu verhindern. Die PCR-Produkte wurden nach dem Durchlauf des letzten Zyklus automatisch auf +4°C gekühlt, bis sie aus dem Gerät genommen wurden. Dann konnten die Proben direkt für den nächsten Arbeitsschritt verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

#### 2.5.4.6 Gelelektrophorese und Restriktionsverdau

Die Gelelektrophorese diente einerseits als Kontrollverfahren in der Etablierungsphase, um die korrekte Amplifikation und das Vorliegen von DNA-Segmenten in der erwarteten Größe nachzuweisen, bevor die Pyrosequenzierung durchgeführt wurde. Zum anderen stellte sie mit dem enzymatischem Restriktionsverdau das Standardverfahren für den Nachweis des ERCC1-Polymorphismus (siehe 2.5.4.7) dar.

Für die Herstellung eines Elektrophorese-Gels wurden 3g Agarose in 100ml TAE-Puffer aufgekocht und mit 3µl Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid verändert sein Absorptionsspektrum durch Interkalierung mit der DNA und macht diese unter UV-Licht sichtbar. Diese Lösung wurde nun in eine entsprechend präparierte Elektrophoresekammer gegossen und härtete darin 20 Minuten aus. Nach dem Aushärten wurde die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die sogenannten Taschen des Gels, welche durch die Gussform entstanden, wurden mit jeweils 20µl PCR-Produkt plus 2µl 10fach Orange G-Ladepuffer befüllt. Um eine Skalierung auf dem Gel sichtbar zu machen, wurde die Tasche am linken Rand mit einem Mix aus 1µl DNA-Ladder, 7µl destilliertem Wasser und 2µl 10fach Orange G-Ladepuffer befüllt. Die elektrische Spannung am Gel wurde nach den folgenden Parametern eingestellt und für 75 Minuten appliziert: 100V, 300mA, 14W. Die Auswertung erfolgte im Anschluss durch Fotodokumentation unter UV-Licht (siehe *Abbildung 4*).

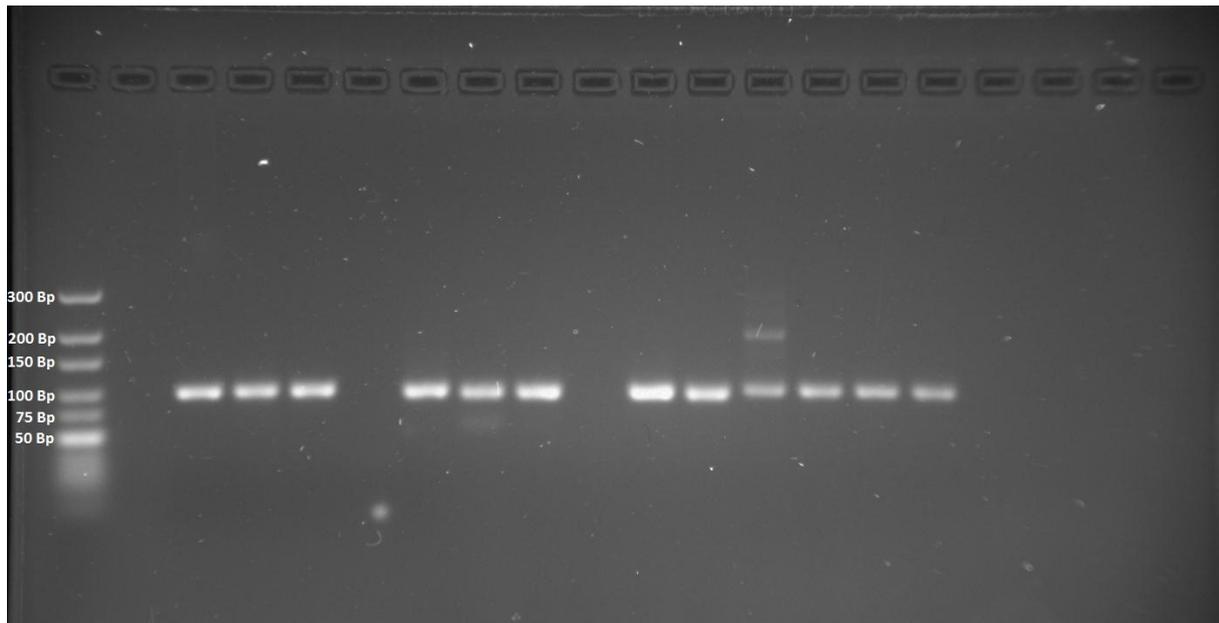


Abbildung 4: Gelelektrophorese zum DNA-Nachweis von BRAF15 mit 91Bp nach erfolgter PCR. Verwendet wurden die Taschen 1-16 von links. Von Links gezählt enthält Tasche 1 die DNA-Ladder, Tasche 2 blieb zur besseren Ablesbarkeit stets frei, dann folgte das PCR-Produkt aus den verschiedenen PCR-Ansätzen. Tasche 6 und 10 enthält keine darstellbare DNA. Die anderen Taschen zeigen bis auf kleinere Verunreinigungen die korrekte Amplifizierung der DNA mit 91Bp.

#### 2.5.4.7 ERCC1-Nachweis durch Restriktionsverdau

Um den ERCC1-Polymorphismus mittels Gelelektrophorese nachweisen zu können, wurde das zu untersuchende PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym „BsrDI“ inkubiert [108, 116, 117]. Das Enzym BsrDI (*Bacillus stearothermophilus* D70) bindet bei Vorliegen der Base Thymin, mit der daraus folgenden Gen-Sequenz ...CAATG..., spezifisch an die DNA und schneidet diese an einer definierten Stelle. Liegt die alternative Gen-Variante ...CAACG... vor, findet keine Bindung und somit auch kein Restriktionsverdau statt. Das PCR-Produkt bleibt in diesem Fall unverändert. Durch den Restriktionsverdau mit BsrDI entstehen bei der erstgenannten, Thymin (T) enthaltenden Ausprägungsvariante aus dem PCR-Produkt mit initial 219 Basenpaaren zwei einzelne DNA-Segmente mit 73 und 146 Basenpaaren, während die andere Gen-Variante mit Cytosin (C) das originale, einzelne Segment mit 219 Basenpaaren bleibt. Somit kann die Ausprägungsvariante der untersuchten DNA-Probe, nach dem Restriktionsverdau, anhand der unterschiedlichen Größe der DNA-Segmente in der Gelelektrophorese bestimmt werden.

Reagenzien für den Restriktionsverdau:

- 7,5µl PCR-Produkt aus der ERCC1-PCR
- 2µl 10fach Puffer<sup>2</sup>
- 0,5µl BsrDI (10U)
- 10µl H<sub>2</sub>O für die Molekularbiologie

Der Ansatz wurde nach dem Durchmischen für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Gelelektrophorese nach dem oben beschriebenen Verfahren. Dabei wurde im Gel immer zuerst das reine PCR-Produkt ohne Inkubation mit BsrDI auf der linken Seite und rechts daneben das PCR-Produkt nach Restriktionsverdau aufgetragen.

Für die Auswertung ist zu bedenken, dass auch heterozygote Zellen vorkommen, die beide Ausprägungsvarianten enthalten. In diesem Fall erscheinen drei Banden in der Gelelektrophorese, weil sowohl die unverdaute Variante mit 219 Bp (...CAACG...) als auch die durch BsrDI geschnittene Variante mit 73 und 146 Bp (...CAATG...) vorliegt.

Folgende Ergebnisse sind also möglich:

- 1 Bande mit 219 Bp = Ausprägung C/C
- 2 Banden mit 73 und 146 Bp = Ausprägung T/T
- 3 Banden mit 73, 146 und 219 Bp = Ausprägung C/T

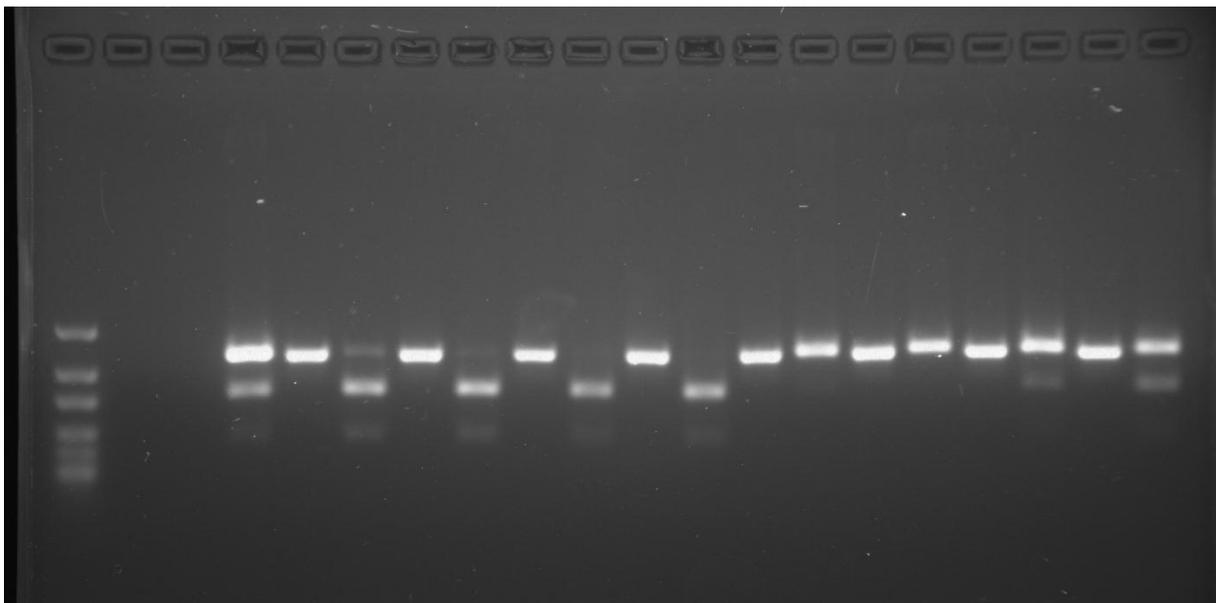


Abbildung 5: Beispiel für eine Gelelektrophorese zum Nachweis von ERCC1 mittels BsrDI-Restriktionsverdau. Tasche 1 enthält die DNA-Ladder, Tasche 2 blieb frei. Im Anschluss wurde stets das reine PCR-Produkt mit 219 Bp auf der linken Seite (ab Taschen 3) platziert und rechts davon eine Probe vom gleichen Gewebe nach erfolgtem Restriktionsverdau. Tasche 3 wurde in diesem Fall nicht korrekt befüllt.

## 2.5.4.8 Pyrosequenzierung

### Grundlagen

Mittels Pyrosequenzierung [118-120] konnte die Sequenz einer beliebigen DNA-Probe in einem relativ unkomplizierten Verfahren analysiert werden. Für ein valides und aussagekräftiges Ergebnis sollte die DNA zuvor, im Rahmen der oben erläuterten PCR, amplifiziert werden. In diesem Schritt musste der Probe zudem ein Biotin-Molekül durch einen speziellen PCR-Primer am 5'-Ende des Vorwärts- oder Rückwärtsstrangs angefügt werden.

Dieser Biotin-Einzelstrang bildete die Basis der Pyrosequenzierung, da er im Laufe des Verfahrens, mit Hilfe der Bindung des Biotins an Streptavidin-Kügelchen, auf der Arbeitsstation des Analyse-Systems bewegt wurde. Auf der Arbeitsstation wurden die Denaturierungs- und Waschschrte entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt [121]. Im letzten Vorbereitungsschritt folgte die Bindung des Pyrosequenzierungs-Primers an die Einzelstrang-DNA.

Die Reaktion (siehe *Abbildung 6* [121]) lief dann im Analyse-System Pyromark der Firma Qiagen ab. Die Zugabe der einzelnen Reagenzien und Nukleotide (u.a. DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferin) wurde durch ein individuell, auf die jeweilige Gensequenz, anpassbares Programm festgelegt. Dieses Programm war im Rahmen der Etablierung für jede Analyse validiert und getestet worden.

### Die Reaktion

Das am Computer angepasste Analyse-Programm steuerte die Zugabe der einzelnen Nukleotide (dNTP= dATP $\alpha$ S, dCTP, dGTP, dTTP) zu der vorbereiteten Reaktionslösung, welche bereits die Einzelstrang-DNA und den passenden Sequenzierungsprimer enthielt. Es wurde jeweils nur ein Nukleotid pro Reaktionsschritt hinzugegeben. Passte dieses Nukleotid an den vorhandenen DNA-Strang, wurde es von der DNA-Polymerase an den Primer

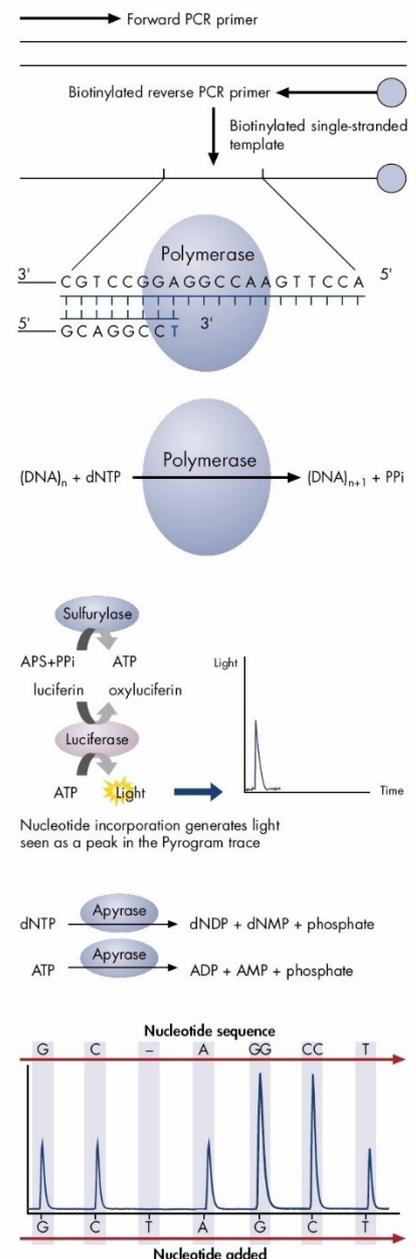
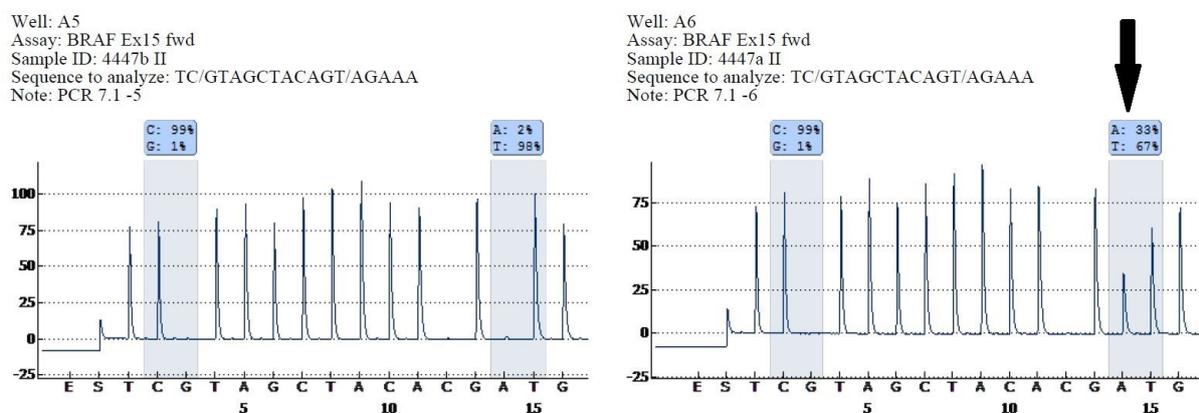


Abbildung 6: Skizze der Reaktionskaskade bei der Pyrosequenzierung

angefügt. Bei diesem Schritt wurde Pyrophosphat frei, welches die ATP-Sulfurylase zu ATP umgewandelt. Das entstandene ATP triggerte wiederum die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin unter gleichzeitiger Lichtemission durch das Enzym Luciferase. Statt dem Nukleotid dATP, welches direkt mit der Luciferase reagiert, wurde das Nukleotid dATP $\alpha$ S (deoxyadenosine 5'( $\alpha$ -thio)triphosphate) verwendet. Das Licht aus der Reaktion mit der Luciferase wurde von einem CCD-Sensor aufgezeichnet und als Ausschlag in einer Kurve vom Analysegerät ausgegeben. Die Reaktion musste äquimolar ablaufen, da die Höhe des aufgezeichneten Peaks proportional zur Menge an umgesetztem dNTP war.

Passte das zugegebene Nukleotid nicht zum vorhandenen DNA-Strang, fand keine Reaktion und somit auch keine Lichtemission statt. Das Nukleotid wurde vom Enzym Apyrase degradiert um seinen Einfluss zu einem späteren Zeitpunkt der Sequenzierung zu verhindern.

Sobald der Vorgang für ein Nukleotid abgeschlossen war, wurde das nächste, im Programm vorgesehene, Nukleotid hinzugegeben, woraufhin die Reaktionskaskade erneut ablief. Diese Reaktionsschritte wurden wiederholt, bis das Ende der zu untersuchenden Sequenz erreicht war. Vom Gerät wurde schließlich eine Kurve ausgegeben, auf deren Zeitachse (x-Achse) die nacheinander zugegebenen Nukleotide aufgetragen waren (siehe *Abbildung 7*). Zeigte sich ein Licht-Peak (Ausschlag), war das an dieser Stelle hinzugegebene Nukleotid an den DNA-Strang angefügt worden, sodass die Reihenfolge der Peaks die tatsächliche Sequenz der analysierten Probe ergab. War kein Peak zu sehen, passte die vorgesehene Base nicht an den DNA-Strang. Ein um das zwei- oder dreifache höherer Peak bedeutete, dass zwei beziehungsweise drei gleiche Basen direkt aufeinander folgten (z.B. AAA).



*Abbildung 7: Pyrosequenzierung: Darstellung der BRAF-Sequenz im Bereich der Punktmutation V600E bei einer Patientenprobe (4447). In der tumorfreien Mukosa (Abbildung links) und im Tumorgewebe (Abbildung rechts). Die Punktmutation tritt in der Analyse an Position 14 T->A auf. In der Mukosa (links) lässt sich die normale DNA-Sequenz ohne Base an Position 14 darstellen. Rechts zeigt sich die Punktmutation durch das neue Adenin an Position 14 und das Reduzierte T an Position 15 (Pfeil). In Prozent ausgedrückt, beträgt der Anteil der Mutierten DNA innerhalb der Probe 33%.*

### 2.5.5 Gelelektrophorese und Vergleich zur Pyrosequenzierung

In der Etablierungsphase dieser Arbeit wurde die Genauigkeit der Pyrosequenzierung im Vergleich zur Gelelektrophorese untersucht. Dafür eignete sich das Gen ERCC1, welches durch verschiedene Methoden untersucht werden kann. ERCC1 spielt im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur insofern eine Rolle, als dass es die Etablierung und das Erlernen der verschiedenen Methoden unterstützte.

Das Gen ERCC1 kann in Codon 118 die Ausprägung AAC und AAT annehmen. Je nach Ausprägung ändert sich die Aktivität der DNA-Reparaturmechanismen, was wiederum das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Platin-Wirkstoffen verändert. [45, 104].

Üblicherweise wird die Ausprägungsvariante von ERCC1 (Codon 118) mit der Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau bestimmt (siehe 2.5.4.7) [108]. Es ist aber auch möglich, den Polymorphismus mittels Pyrosequenzierung zu analysieren. Dies hätte, so die Arbeitshypothese, den Vorteil einer genaueren Bestimmung der Anteile von C und T mit einer exakten Angabe der Anteile in Prozent. In der Gelelektrophorese ist im Vergleich dazu nur eine semiquantitative Bestimmung und damit keine präzise Aussage möglich.

#### 2.5.5.1 Auswahl der Primer und Pyrosequenzierung

Die Auswahl der Sequenzierungsprimer für die Analyse des ERCC1-Polymorphismus erfolgte unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen PCR-Primer. Um den Vorwärtsstrang der DNA mittels Sequenzierung darzustellen, musste der Rückwärts-Primer mit einem Biotin-Molekül versehen werden. Er bildete die Grundlage auf der der Sequenzierungsprimer die Synthese des Vorwärtsstranges beginnen kann.

Um den Sequenzierungsprozess kurz und effizient zu halten, wurde eine Region als Primerbindungsstelle ausgewählt, die nur wenige Basen vor der Stelle des Polymorphismus lag. Dabei war es gleichzeitig sinnvoll sowohl die Darstellung einzelner Basen als auch die Abfolge zweier gleicher Basen, in diesem Fall `AA`, mit in den Sequenzierungsprozess einzubinden, um dadurch eine Kalibrierung der zu messenden Ausschläge (Peaks) zu erreichen. Die Stärke der Lichtemission, und mit ihr der vom Gerät ausgegebene Peak, verdoppelt sich bei der Abfolge zweier gleicher Basen in Reihe aufgrund der zweifach ablaufenden Reaktion. Durch das Einbinden der 3BP-langen Basenfolge direkt vor dem Polymorphismus „...CAA-Polymorphismus-...“, ging sowohl ein einzelner als auch ein

doppelter Ausschlag in die Messung mit ein. Mit der Sequenzierung teils bekannter Genabschnitte gestaltete sich die Auswertung durch die Referenz-Peaks einfacher und sicherer. Der endgültige Sequenzierungsprimer (siehe *Tabelle 8*) mit einer, den Herstellerempfehlungen entsprechenden, Länge von 16 Basen, setzte den obigen Überlegungen folgend im Codon 116 vor dem „C“ an. Auch bei der Entwicklung dieses Primers wurde das Onlinetool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI [122] zur Kontrolle und Validierung der Bindungsstelle verwendet.

Die Pyrosequenzierung wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Das Assay-Setup, also das Sequenzierungsprogramm für diese ERCC1-Analyse (*Abbildung 8*), wurde nach folgendem Schema programmiert:

Zu analysierende Sequenz: CAAT/CGTGCCCTG

Berechnete Basenzugabe: TCGATCGTGCCT

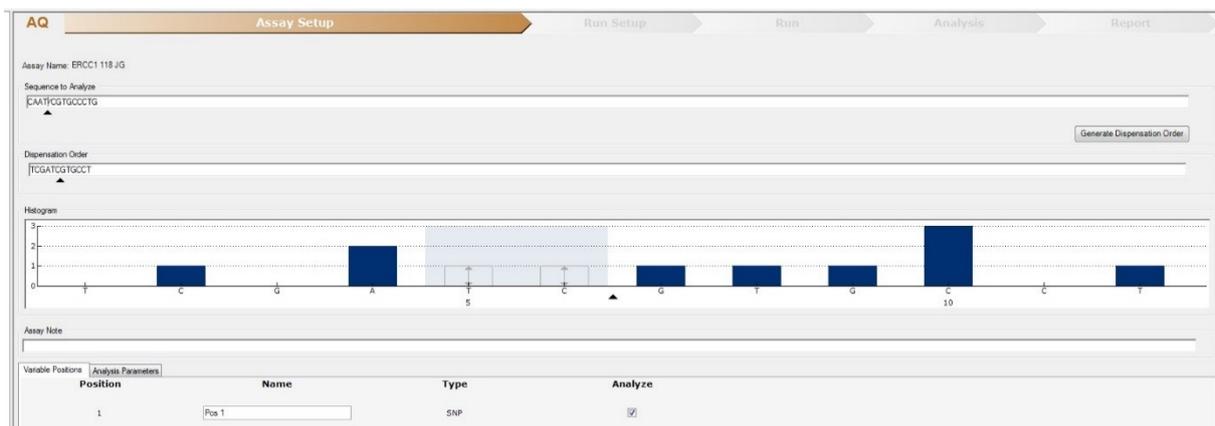


Abbildung 8: Assay Setup: Protokoll für die Sequenzanalyse des ERCC1-Polymorphismus

## 2.6 Statistik

Alle Daten, die mit den erläuterten Verfahren gewonnen wurden, flossen, gemeinsam mit den ergänzenden Informationen aus den Akten, unter der fortlaufend vergebenen Gewebeeingangsnummer in einer Datenbank zusammen. Die Berechnung der Statistik erfolgte anschließend mit der Version 22 und 23 der Statistiksoftware SPSS.

Die Korrelationen der einzelnen Faktoren untereinander wurden mit dem Exakten Test nach Fisher berechnet. Für die Überlebensanalysen wurde der Kaplan-Meier-Schätzer mit dem Log-Rank-Test beziehungsweise dem Wilcoxon-Test und für die Abschätzung des Einflusses unabhängiger Variablen die Cox-Regression verwendet.

### 2.6.1 Bildung von Gruppen

Aufgrund der Fallzahlen war es erforderlich, einige klinisch-pathologischen Parameter, wie zum Beispiel das Grading, in Gruppen von eher gut differenziert (G1 und G2) beziehungsweise schlecht differenziert (G3 und G4) zusammenzufassen.

Für die untersuchten Tumormarker wurden die Grenzwerte für Positivität (=Cutoffs) mittels Boxplots bestimmt. Anhand dieses Cutoff-Wertes konnten die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Färbung für jeden Patienten der Gruppe „positiv“ oder „negativ“ zugeordnet werden. *Tabelle 9* zeigt die Cutoffs der wichtigen Tumormarker.

	Cutoff Primarius		Cutoff Lebermetastase	
	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
CD44v6	≤50%	>50%	≤50%	>50%
HGFR	≤80%	>80%	≤80%	>80%
HSP90	≤50%	>50%	≤50%	>50%
IGF1R	≤80%	>80%	≤80%	>80%
MUC1	0	≥1	0	≥1
rpS6-Kinase	0	≥1	0	≥1

*Tabelle 9: Grenzwerte der Biomarker auf der Grundlage von Boxplots*

Für die Berechnung der Cox-Regression wurde die UICC-Klassifikation, aus Gründen der Redundanz, nicht berücksichtigt. Anstatt dessen wurde die Einzelbetrachtung der unter der UICC-Klassifikation zusammengefassten Faktoren des TNM-Systems gewählt, da sie die

Realität insgesamt präziser darstellen. Würden sowohl die TNM-Faktoren als auch UICC gleichermaßen in die Rechnung eingehen, käme es mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer falschen Gewichtung der Ergebnisse.

## 2.6.2 Zusammenfassen zweier Biomarker

Die Biomarker im Fokus dieser Arbeit wurden unter dem Gesichtspunkt des „drugable targets“, also mit Bezug auf eine mögliche biomarkerspezifische Therapie, ausgewählt. Sie zeichnen sich zudem besonders durch ihre Relevanz als prädiktive Marker aus und entstammen drei verschiedenen Molekülklassen:

- Zelladhäsionsmoleküle (CD44v6 und MUC1)
- Wachstumsfaktorrezeptoren (HGFR und IGF1R)
- Signaltransduktionsmoleküle (HSP90, rpS6-Kinase)

Um ihren Einfluss und ihre Abhängigkeiten besser zu verstehen, wurden diese Biomarker, im Rahmen der statistischen Auswertung, miteinander „kombiniert“ und zu einem Marker zusammengefasst. Das heißt es wurden jeweils zwei Biomarker unter bestimmten Bedingungen zusammengefasst, damit deren gemeinsamer Einfluss wie bei einem einzelnen Biomarker berechnet werden konnte. Die Zusammenführung zweier Marker wurde anhand des Cutoffs vorgenommen: In der Gruppe „Positiv“ wurden alle Patienten gebündelt, bei denen jeweils beide Marker positiv waren, also oberhalb des Cutoffs lagen. Falls nur einer oder beide Marker bei einem Patienten unterhalb des Cutoffs lagen, wurde er der Gruppe „Negativ“ zugeordnet (siehe *Tabelle 10*). Diese Gruppierung wurde nur für die Auswertung der Färbung nach Prozent erstellt. Die Intensität ist hier ausgenommen.

Die so entwickelte Variable wird in dieser Arbeit als Doppelmarker bezeichnet.

	Marker 1 (Bsp: IGF1R in Prozent)	Marker 2 (Bsp: MUC1 in Prozent)	Doppelmarker aus Marker 1 und Marker 2 (IGF1R positiv + MUC1 positiv)
Probe 1	+	+	+
Probe 2	-	+	-
Probe 3	+	-	-
Probe 4	-	-	-

*Tabelle 10: Beispiel für die Kombination zweier Biomarker. Positiv: + / Negativ: -. Das sich aus Marker 1 und Marker 2 ergebende Doppelmarker ist in der rechten Spalte dargestellt. Nur wenn beide Einzelmarker positiv sind gilt der Doppelmarker als positiv.*

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit konnten 144 Patienten mit kolorektalem beziehungsweise metastasiertem kolorektalem Karzinom eingeschlossen werden. Das untersuchte Patientenkollektiv wurde, entsprechend dem vorliegendem Tumorgewebe, in die Gruppen „Primärtumor“ (n=89) und „Lebermetastasen“ des kolorektalen Karzinoms (n=59) unterteilt. Von vier Patienten lagen sowohl das Gewebe des Primärtumors als auch der synchronen Lebermetastasen vor.

Diese beiden Tumorentitäten wurden, trotz des gemeinsamen biologischen Ursprungs, in der folgenden Darstellung der Ergebnisse getrennt aufgeführt und einander gegenübergestellt.

#### 3.1.1 Primärtumor

Von den untersuchten Patienten mit Primärtumor (*Tabelle 11*) waren 43,8% (n=39) weiblich und 56,2% (n=50) männlich. Der Altersdurchschnitt lag bei 68,1 Jahren und wies eine Spanne von 43 bis 90 Jahren auf.

Die Lokalisation des Primärtumors verteilte sich auf die einzelnen Kolonabschnitte wie folgt: Coecum 10,1% (n=9), Kolon ascendens 22,5% (n=20), Kolon transversum 14,6% (n=13), Kolon descendens 5,6% (n=5) sowie 38,2% (n=34) im Kolon sigmoideum und 9,0% (n=8) im Rektum (>10cm ab ano). In linkes und rechtes Kolon (mit hohem Rektum) zusammengefasst und an der üblichen Trennlinie, dem Ligamentum phrenicocolicum, entsprechend der Gefäßversorgung an der linken Kolonflexur unterteilt, ergab sich eine Verteilung von 47,2% (n=42) auf das linke und 52,8% (n=47) auf das rechte Kolon.

Der Tumordurchmesser, gemessen an der Stelle der größten Ausdehnung, lag im Durchschnitt bei 4,7cm, mit einer Spanne von 1,2cm bis 11,5cm. Histologisch zeigte sich in 85,4% (n=76) der Fälle ein Adenokarzinom, während bei 14,6% (n=13) ein muzinöses Adenokarzinom vorlag. Die Klassifikation der Tumorzellendifferenzierung (Grading) ergab im Patientenkollektiv folgende Verteilung: G1 bestand bei 2,2% (n=2), G2 bei 61,8% (n=55), G3 bei 34,8% (n=31) und G4 zeigte sich bei 1,1% (n=1) der Patienten.

Das Tumorstadium nach TNM, entsprechend der Klassifikation der UICC [123], war im Stadium T1 mit 3,4% (n=3) vertreten. Tumoren im Stadium T2 hatten einen Anteil von 14,6% (n=13),

im Stadium T3 von 67,4% (n=60) und im Stadium T4 lag der Anteil bei 14,6% (n=13). Der Lymphknotenstatus war bei 64,0% (n=57) der Patienten negativ, also N0. Die Stadien N1 und N2 waren mit 22,5% (n=20) beziehungsweise 13,5% (n=12) vertreten. Der in der präoperativen Bildgebung erfasste Nachweis von Fernmetastasen (M-Stadium), zeigte den M0-Status (kein Hinweis auf eine Fernmetastase) bei 84,3% (n=75) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1) bei 15,7% (n=14). Daten zur Lymphangiosis carcinomatosa (L-Stadium) sowie zur venösen Gefäßinvasion (V-Stadium) lagen nur für 55 Patienten vor. Davon zeigten 67,3% (n=37) einen L0-Status und 32,7% (n=18) einen L1-Status. V0 lag bei 89,1% (n=49) und V1 bei 10,9% (n=6) der Patienten vor. Die Perineuralscheideninvasion (Pn) wurde nur in einem der fünf Studienzentren und damit nur bei 20 Patienten erhoben. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde das Pn-Stadium bei den statistischen Berechnungen in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Aus der oben genannten Verteilung der TNM-Klassifikation ergab sich für das UICC-Stadium im untersuchten Patientenkollektiv folgendes Verteilungsmuster: UICC I lag bei 18% (n=16) vor, die Stadien UICC IIA und IIB waren mit 34,8% (n=31) und 6,7% (n=6) vertreten. In der Subgruppe UICC IIIA fand sich kein Patient aus dem untersuchten Kollektiv. Auf die Subgruppen UICC IIIB und IIIC entfielen 18% (n=16) beziehungsweise 6,7% (n=6). Die übrigen 15,7% (n=14) waren unter UICC IV einzuteilen.

Daten zum präoperativen Wert des Tumormarkers CEA (Carcinoembryonales Antigen) im Serum lagen für 86 Patienten vor. Bei exakt 50% (n=43) der untersuchten Patienten war das CEA im Serum auf pathologische Werte ( $\geq 3,4$ ng/ml) erhöht, während bei der anderen Hälfte des Patientenkollektivs präoperativ ein unauffälliger CEA-Wert gemessen wurde.

Der R-Status, als Indikator für die postoperative lokale Tumorfreiheit, wurde intraoperativ beziehungsweise durch den Pathologen bestimmt und war bei 95,5% (n=85) der eingeschlossenen Patienten R0, also tumorfrei. Bei 3,4% (n=3) der Patienten bestand eine R1-Resektion. Ein R2-Status ergab sich bei 1,1% (n=1) der Patienten.

Keiner der Patienten (n=0) erhielt eine neoadjuvante Chemotherapie.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden, aufgrund der relativ kleinen Fallzahlen, einzelne Tumorstadien zusammengefasst. Daraus ergaben sich für das Grading die Gruppen G1/G2 mit einem Anteil von 64% (n=57) versus G3/G4 mit einem Anteil von 35,9% (n=32). Das T-Stadium wurde in den Gruppen T1/2 mit 18% (n=16) und T3/4 mit 82% (n=73) zusammengefasst. In vergleichbarer Weise wurde der Lymphknotenstatus nach dem

Vorhandensein positiver Lymphknoten in N0: 64,0% (n=57) und N1/2: 36,0% (n=32) sowie der R-Status in R0: 95,5% (n=85) und R1/2: 4,5% (n=4) unterteilt.

### Patientencharakterisierung PT

Faktor	Gruppen	n	Verteilung	Prozent
Geschlecht	Männlich	89	50	56,2
	Weiblich		39	43,8
Alter (Jahre)	mean (range)	89	68,1 (43 – 90)	
	Standardabweichung		9,1	
	≤ 68.1		39	43,8
	> 68.1		50	56,2
Lokalisation	Coecum	89	9	10,1
	Colon ascendens		20	22,5
	Colon transversum		13	14,6
	Colon descendens		5	5,6
	Colon sigmoideum		34	38,2
	Rectum (>10cm ab ano)		8	9,0
	Hemikolon rechts*		47	52,8
	Hemikolon links*		42	47,2
Tumordurchmesser (cm)	mean (range)	89	4,7 (1,2 – 11,5)	
	Standardabweichung		1,8	
	≤ 4.7 cm		48	53,9
	> 4.7 cm		41	46,1
Histologischer Typ	Adenokarzinom	89	76	85,4
	Muzinöses Adenokarzinom		13	14,6
Grading (G)	G1	89	2	2,2
	G2		55	61,8
	G3		31	34,8
	G4		1	1,1
	G1/2		57	64,1
	G3/4		32	35,9
Tumorstatus (T)	pT1	89	3	3,4
	pT2		13	14,6
	pT3		60	67,4
	pT4		13	14,6
	pT1/2		16	18
	pT3/4		73	82

Nodalstatus (N)		89		
	pN0		57	64,0
	pN1		20	22,5
	pN2		12	13,5
Fernmetastasen (M)		89		
	cM0		75	84,3
	cM1		14	15,7
Cancer stage (UICC)		89		
	I		16	18,0
	IIA		31	34,8
	IIB		6	6,7
	IIIA		0	0
	IIIB		16	18,0
	IIIC		6	6,7
	IV		14	15,7
Lymphangiosis carcinomatosa (L)		55		
	L0		37	67,3
	L1		18	32,7
Gefäßinvasion (V)		55		
	V0		49	89,1
	V1		6	10,9
Perineuralinvasion (Pn)		20		
	Pn0		15	75,0
	Pn1		5	25,0
Resektionsstatus (R)		89		
	R0		85	95,5
	R1		3	3,4
	R2		1	1,1
CEA präoperativ		86		
	< 3.4 ng/ml		43	50,0
	> 3.4 ng/ml		43	50,0

Tabelle 11: Patientencharakterisierung im Kollektiv der eingeschlossenen Primärtumore  
\* Gruppierung rechtes/linkes Hemikolon

### 3.1.2 Lebermetastasen

Im untersuchten Kollektiv der Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms (Tabelle 12) waren 37,3% (n=22) der Patienten weiblich und 62,7% (n=37) männlich. Das mittlere Alter lag bei 62,6 Jahren und hatte eine Spanne von 40 bis 79 Jahren.

Bei 32,1% (n=18) der Patienten lag zum Zeitpunkt der Operation nur eine einzelne Lebermetastase vor, während bei 67,9% (n=38) multiple Lebermetastasen diagnostiziert wurden. Der Durchmesser der Metastasen, bei Vorliegen multipler Herde bezogen auf den Größten, betrug im Durchschnitt 3,93cm, mit einer Spanne von 0,9 bis 16 cm. Histologisch

zeigte sich bei 89,7% (n=52) ein Adenokarzinom und bei 10,3% (n=6) ein muzinöses Adenokarzinom.

### Patientencharakterisierung LM

Faktor	Gruppen	n	Verteilung	Prozent
Geschlecht	Männlich	59	37	62,7
	Weiblich		22	37,3
Alter (Jahre)	mean (range)	59	62,6 (40 – 79)	
	Standardabweichung		9,2	
	≤ 62.6		25	42,4
	> 62.6	34	57,6	
Tumordurchmesser (cm)	mean (range)	56	3,93 (0,9 – 16,0)	
	Standardabweichung		2,57	
	≤ 3,93 cm		21	37,5
	> 3,93 cm		35	62,5
Zahl der Lebermetastasen	1	56	18	32,1
	> 1		38	67,9
Histologischer Typ	Adenokarzinom	58	52	89,7
	Muzinöses Adenokarzinom		6	10,3
Grading (G)	G1	55	0	0
	G2		36	65,5
	G3		19	34,5
	G4		0	0
Lokalisation des Primärtumors	Coecum	59	8	13,6
	Colon ascendens		3	5,1
	Colon transversum		4	6,8
	Colon descendens		6	10,2
	Colon sigmoideum		26	44,1
	Rectum (>10cm ab ano)		5	8,5
	Nicht spezifiziert		7	11,9
Resektionsstatus (R)	R0	59	47	79,7
	R1		6	10,15
	R2		6	10,15
CEA präoperativ	< 3.4 ng/ml	56	13	23,2
	> 3.4 ng/ml		43	76,8
Neoadjuvante Chemotherapie	Ja	56	47	84,0
	Nein		9	16,0

Tabelle 12: Patientencharakterisierung im Kollektiv der eingeschlossenen Lebermetastasen

Die Untersuchung des Differenzierungsgrades der Tumorzellen (Grading) ergab bei den Lebermetastasen nur zwei Ausprägungen: G2 war mit 65,5% (n=36) und G3 mit 34,5% (n=19) vertreten. Bezüglich des Resektionsstatus lag in 79,7% (n=47) eine R0-Resektion vor. R1 und R2 traten mit jeweils 10,2% (n=6) gleichhäufig auf. Der präoperativ im Serum bestimmte Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen) war bei 76,8% (n=43) der Patienten pathologisch ( $\geq 3,4\text{ng/ml}$ ). Bei 23,2% (n=13) lag ein normwertiges CEA vor.

Die Charakterisierung der zugrundeliegenden Primärtumoren beschränkte sich auf die Lokalisation im Kolon, da zum Zeitpunkt der Operation das UICC-Stadium IV per definitionem vorlag. Der größte Anteil der hepatisch metastasierten Primärtumoren fand sich mit 44,1% (n=26) im Colon sigmoideum. Weitere 13,6% (n=8) lagen im Coecum, 5,1% (n=3) im Colon ascendens, 6,8% (n=4) im Colon transversum und 10,2% (n=6) im Colon descendens. Im Rektum (>10cm ab ano) waren 8,5% (n=5) der Primärtumoren lokalisiert. Für 11,9% (n=7) war die Lokalisation nicht bekannt.

Eine neoadjuvante Chemotherapie wurde in 84% (n=47) der Fälle durchgeführt. 16% (n=9) erhielten keine Chemotherapie vor der Resektion der Metastasen.

### 3.2 Zelllinien

Die Verwendung der Zelllinien wurde im *Kapitel 2.3* ausführlich erläutert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Charakterisierung in einer tabellarischen Zusammenfassung dargestellt (*Tabelle 13*).

Zelllinie	BRAF	KRAS	ERCC1
DLD-1	WT	G13D	T/T
HT29	V600E	WT	C/T
GEO	WT	G12A	C/T
HCT116	WT	G13D	T/T
RKO	V600E	WT	C/C
SW480	WT	G12V	C/C

*Tabelle 13: molekularbiologische Charakterisierung der verwendeten Zelllinien. WT= Wildtyp.*

### 3.3 Die Genauigkeit der Gelelektrophorese im Vergleich zur Pyrosequenzierung am Beispiel des ERCC1-Polymorphismus

Der Vergleich der Methoden Gelelektrophorese und Pyrosequenzierung zur Analyse der DNA-Sequenz anhand der Untersuchung des ERCC1-Polymorphismus wurde sowohl mit Zelllinien als auch mit Patientenproben durchgeführt (siehe auch 2.5.5). Je nach Ausprägung des Polymorphismus in Codon 118 können die Varianten `AAC` und/oder `AAT` vorliegen. Dies bedeutet, dass bei diploidem Chromosomensatz eine homozygote Ausprägung mit den Varianten `AAC` (C/C) oder `AAT` (T/T) oder eine heterozygote Ausprägung mit den Varianten `AAC` und `AAT` in der selben Zelle (C/T) vorliegen kann. Bei den ersten Analyseversuchen fiel auf, dass sich die Ergebnisse der Gelelektrophorese nicht immer eindeutig den einzelnen oben genannten Ausprägungen zuordnen ließen. Dies betraf nicht nur Patientenproben, deren Fehleranfälligkeit größer war, sondern auch Zelllinien, bei denen eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

In den *Abbildungen 9 bis 14* sind zunächst Beispiele für eindeutige Befunde des ERCC1-Polymorphismus anhand von Zelllinien und Patientenproben dargestellt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese der Zelllinien DLD1 und RKO (in *Abbildung 9*) zeigen in der rein visuellen Auswertung bei DLD1 in der rechten Spalte zwei Banden, die durch den erfolgten Restriktionsverdau entstanden sind. Hier konnte das Enzym BsrDI (Verfahren siehe auch

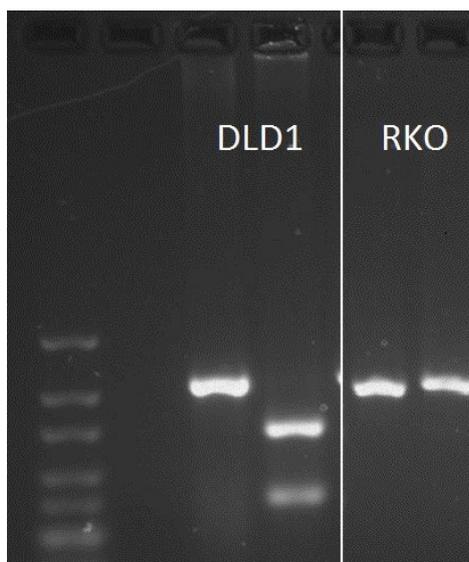


Abbildung 9: Gelelektrophorese zum ERCC1 Nachweis bei den Zelllinien DLD1 und RKO: Die jeweils linke Spalte enthält das PCR-Produkt, die rechte Spalte das Produkt nach BsrDI-Restriktionsverdau.

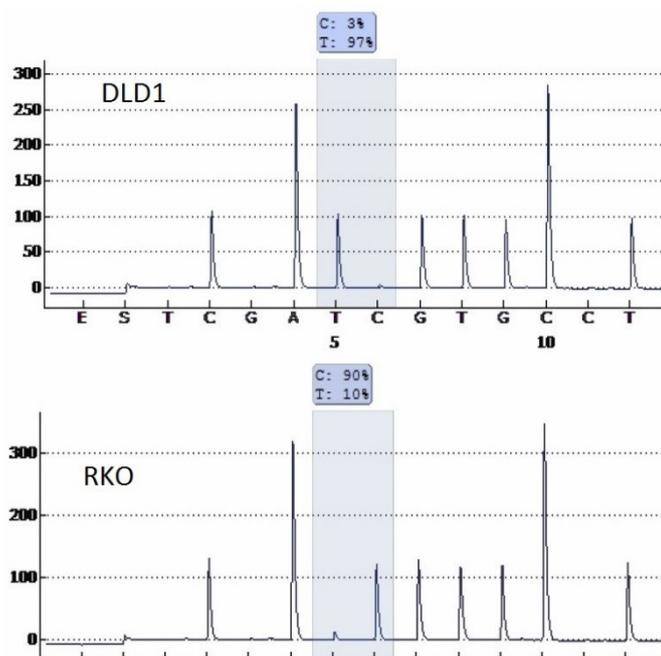


Abbildung 10: Ergebnis der Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus: DLD1 zeigt zu 97% T/T, RKO zeigt zu 90% C/C.

2.5.4.7) binden und die DNA schneiden, womit der Nachweis für das Vorliegen der T/T-Variante erbracht war. In der jeweils linken Spalte einer Probe ist, ebenso wie in allen folgenden Abbildungen der Elektrophorese-Gele, das unverdaute PCR-Produkt als Referenz getestet worden. Die Zelllinie RKO zeigte im Vergleich keinen Unterschied zwischen verdaulichem und unverdaulichem PCR-Produkt in der Gelelektrophorese. Hier konnte das Restriktionsenzym also nicht binden und somit lag in diesem Fall die Variante C/C vor. Diese Ergebnisse wurden in der Pyrosequenzierung bestätigt. In beiden Verfahren sind keine weiteren Banden beziehungsweise Peaks zu sehen.

Ein größtenteils eindeutiges Ergebnis war bei den Patienten mit den Batchnummern 4417 und 4477 zu sehen. Hier wurde jeweils sowohl gesundes Gewebe, also tumorfreie Mukosa als auch Tumorgewebe untersucht. In den *Abbildungen 11 bis 14* sind die Ergebnisse des Restriktionsverdaus mit Elektrophorese und der Pyrosequenzierung gegenübergestellt.

Mukosa wie auch Tumorgewebe von Patient 4417 zeigten im Gel und durch die quantitative Bestimmung mittels Pyrosequenzierung, hier mit 95%, die Expressionsvariante T/T. Bei Patient 4477 lag dagegen die heterozygote Ausprägung mit C/T vor. Im Gel sind deshalb, nach der Inkubation mit dem Restriktionsenzym BsrDI, drei Banden zu erkennen. Da bei heterozygoter Ausprägung beide Genvarianten vorliegen, wurde ein Teil der vorhandenen DNA durch das Enzym geschnitten, was zu zwei neuen Banden führte, während der andere Teil, als dritte Bande, unverändert blieb. Die schwächere Darstellung der Banden im Tumorgewebe von

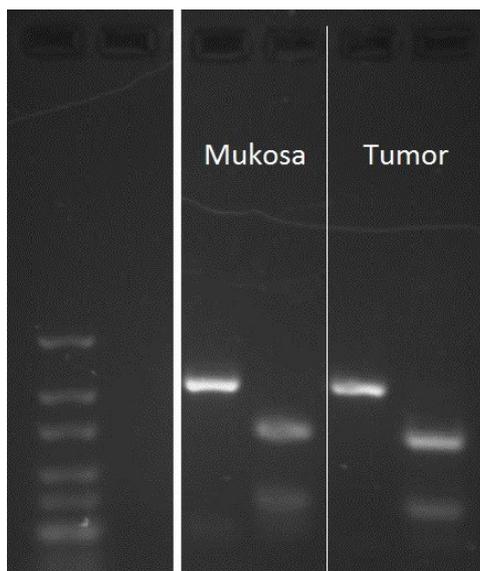


Abbildung 11: Patient 4417: Gelelektrophorese zum Nachweis der ERCC1-Ausprägung in tumorfreier Mukosa und Tumor. In der linken Spalte jeweils das PCR-Produkt, in der rechten Spalte DNA nach Restriktionsverdau mit BsrDI

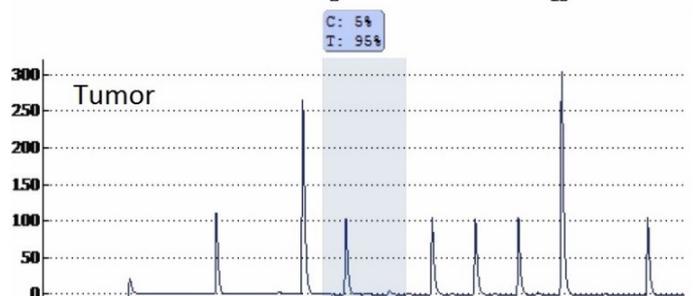
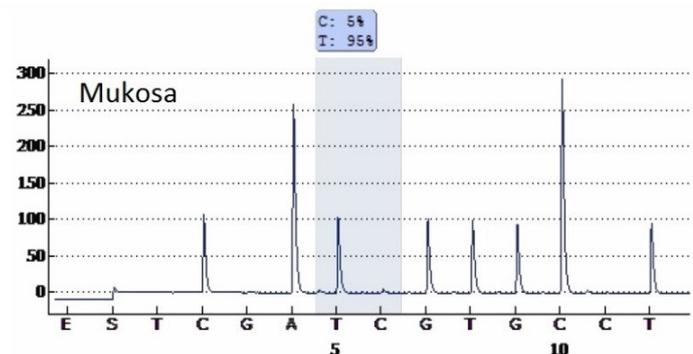


Abbildung 12: Ergebnis der Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus bei Patient 4417 in der tumorfreien Mukosa sowie im Tumorgewebe: Jeweils 95% T/T.

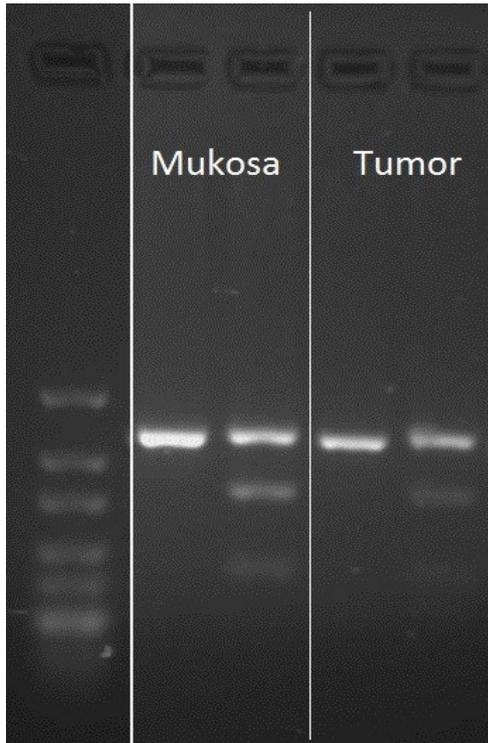


Abbildung 13: Patient 4477: Gelelektrophorese zum Nachweis der ERCC1-Ausprägung in tumorfreier Mukosa und Tumor. In der linken Spalte jeweils das PCR-Produkt, in der rechten Spalte DNA nach Restriktionsverdau mit BsrDI.

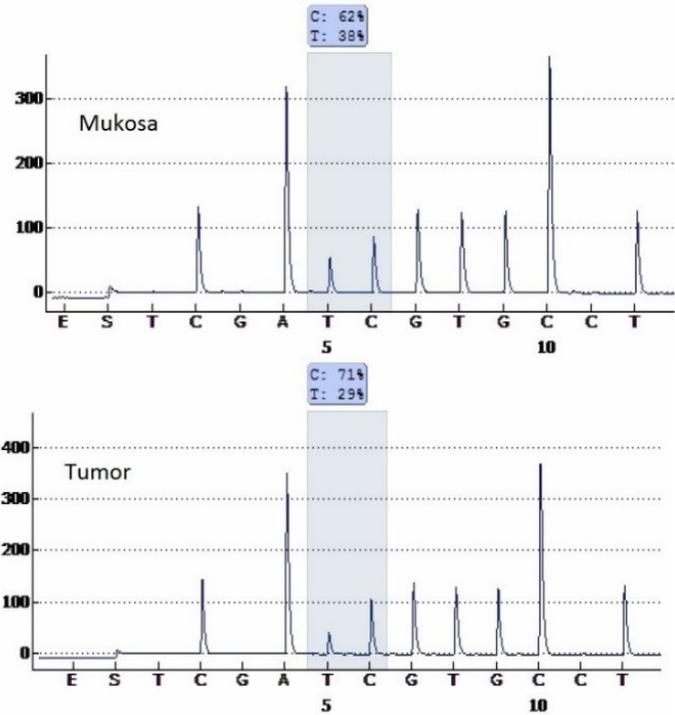
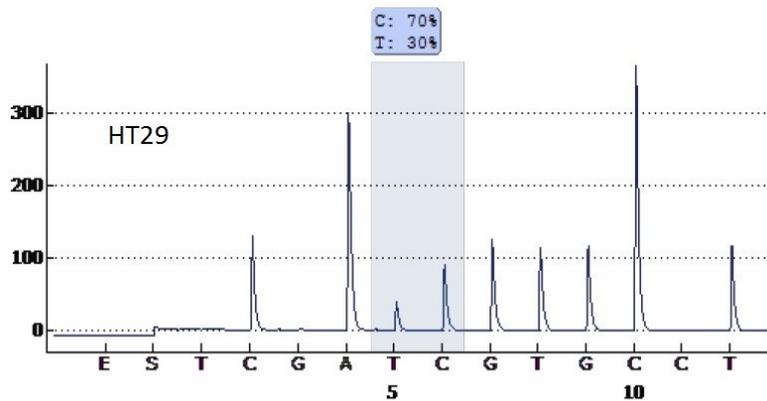
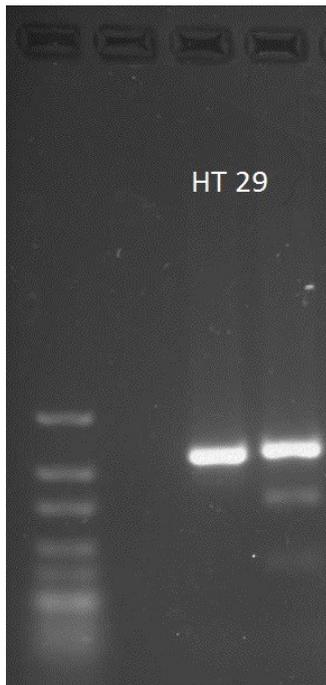


Abbildung 14: Ergebnis der Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus bei Patient 4477 in der tumorfreien Mukosa sowie im Tumorgewebe: Ausprägung C/T mit 62/38% bzw. 71/29%.

4477, bei dem die unterste Bande kaum noch sichtbar war, stellt bereits ein Beispiel für die Schwierigkeit einer präzisen Auswertung dar. Dieses Problem bildete die Grundlage für die Entwicklung eines alternativen Analyseverfahrens, der Pyrosequenzierung. Mit ihr konnten die Anteile der beiden Ausprägungsvarianten in Prozent ausgegeben werden. Somit ergab die Pyrosequenzierung bei dem Patient 4477, mit 38% Anteil „T“ in der Mukosa und 29% Anteil „T“ im Tumor, den Befund C/T. Allerdings spiegelte sich auch hier die schwächere Ausprägung im Tumor wider.

Während sich einige eindeutige Ergebnisse mit beiden Methoden gut darstellen ließen, eignete sich, bei unscharfen oder schwachen Banden im Gel, die Pyrosequenzierung deutlich besser. Dies zeigte beispielsweise das Elektrophoresegel der Zelllinie HT29 (Abbildung 15). Hier ist die Aussage über die Ausprägungsvariante von ERCC1 schwierig, da der Unterschied in der Intensität der Banden sehr hoch ist. Es könnte sich sowohl um die Ausprägung C/C mit einem Artefakt als auch um die Variante C/T handeln. Erst durch die Pyrosequenzierung (Abbildung 16) ist ersichtlich, dass die zweite Option, also die Ausprägung C/T, mit einer Verteilung von 70% zu 30% vorliegt.



Links: Abbildung 15: Gelelektrophorese zum Nachweis der ERCC1-Ausprägung in der Zelllinie HT29. Die linke Spalte enthält das PCR-Produkt, die rechte Spalte das Produkt des BsrDI-Restriktionsverdau.

Oben: Abbildung 16: Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus der Zelllinie HT29. Ausprägung C/T mit einem Verhältnis von 70%/30%

Ähnlich schwierig gestaltete sich die Interpretation der Patientenproben 4459 und 4464 (Abbildungen 17 bis 20). Auch wenn sich die Gewichtung der Anteile von C und T durch die Prozentangaben aus der Pyrosequenzierung in der Intensität der Banden im Gel widerspiegeln, war mit der alleinigen Gelelektrophorese keine eindeutige und vor allem keine sichere Aussage über die Ausprägung möglich. Insbesondere die quantitative Darstellung der DNA-Menge in den verschiedenen Banden des Gels war kaum einzuschätzen und erlaubte damit keine sichere Aussage über das vorliegende Material. Zudem könnten Artefakte die Aussagekraft einschränken. Für den Untersucher bleibt damit generell eine höhere Unsicherheit bei der Auswertung, welche bei der Verwendung der Pyrosequenzierung entfällt.

Zusammengefasst bietet die Pyrosequenzierung nicht nur eine modernere und weniger fehleranfällige Darstellung, sondern außerdem die Möglichkeit, einen Cutoff-Wert festzulegen, der eine bessere und sicherere Auswertbarkeit zulässt.

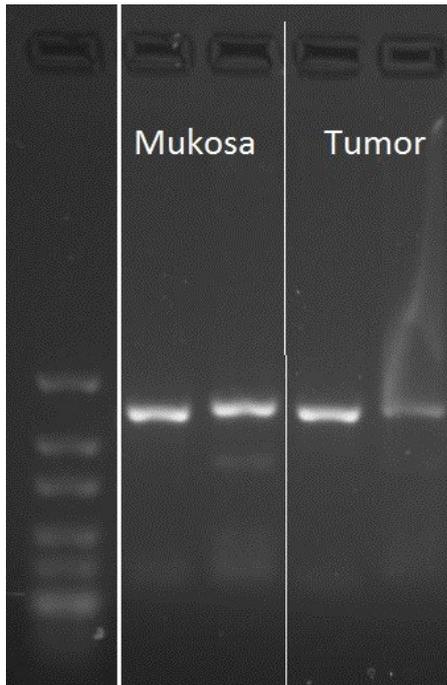


Abbildung 17: Gelelektrophorese zum Nachweis der ERCC1-Ausprägung bei 4459.

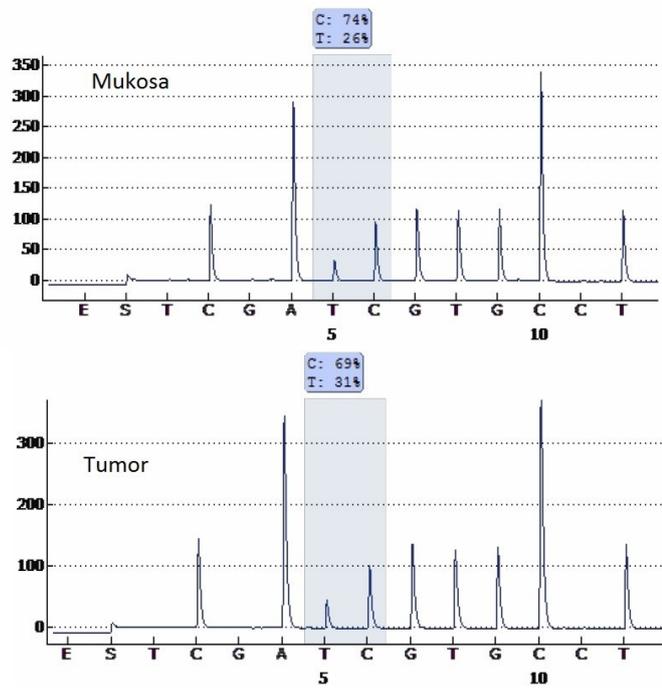


Abbildung 18: Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus bei 4459.

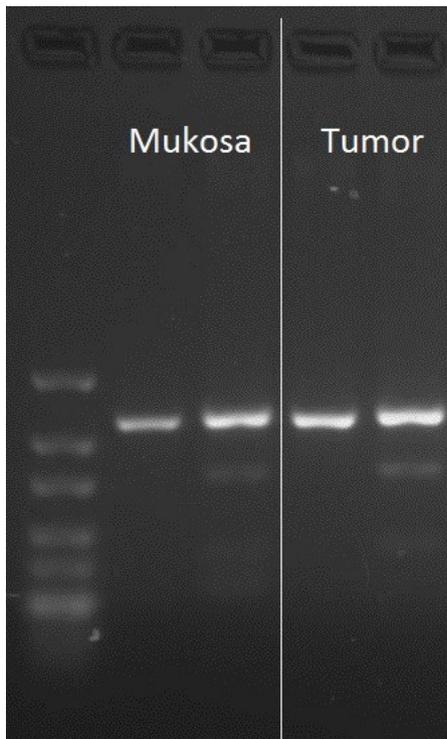


Abbildung 19: Gelelektrophorese zum Nachweis der ERCC1-Ausprägung bei 4464.

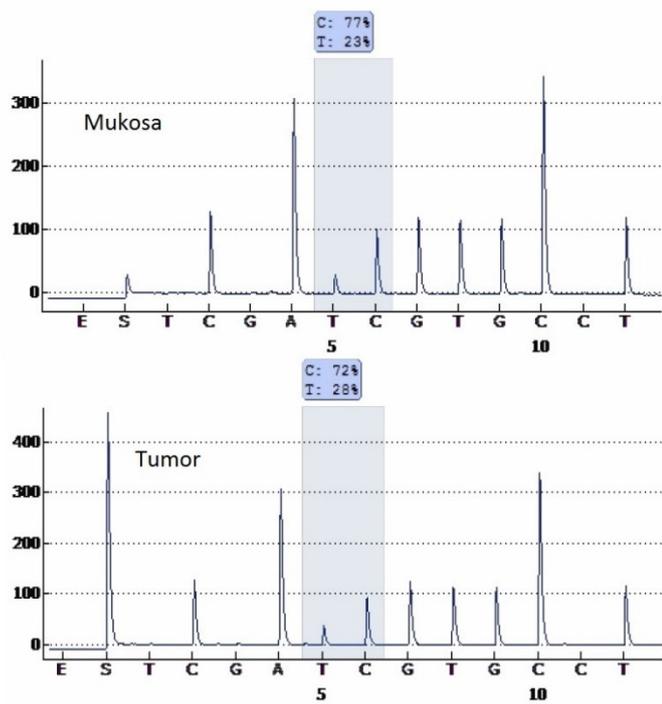


Abbildung 20: Pyrosequenzierung des ERCC1-Polymorphismus bei 4464.

### 3.4 ERCC1 – Abschließende Betrachtung des Methodenvergleichs

Die vergleichende Untersuchung der Gelelektrophorese und der Pyrosequenzierung anhand des im vorausgegangenen Kapitel erläuterten Verfahrens der ERCC1-Analyse wird an dieser Stelle abschließend und entsprechend ausführlich dargestellt, da sie im Diskussionsteil dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt wird.

Wie im *Kapitel 3.3* bereits anschaulich dargestellt, führt die Pyrosequenzierung zu wesentlich besser verwendbaren und eindeutigeren Resultaten, weil die Fehleranfälligkeit der semiquantitativen Schätzung im Elektrophoresegel entfällt. Da die Banden bei der Gelelektrophorese häufig in ihrer Intensität variieren, ist die Auswertung zum Teil schwierig und mit viel Unsicherheit verbunden. Auch die Erwartungshaltung des Auswertenden kann das Ergebnis bei dieser Methode, durch einen gewissen Interpretationsspielraum, massiv beeinflussen. In ihrer Arbeit haben Zhang et al. [124] die teilweise sehr schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der Gelelektrophorese an anderen Polymorphismen mit einer Übereinstimmung von nur 66-95% gezeigt. Allerdings wurden für die Untersuchungen nur FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) - Präparate verwendet, welche wiederum eher zu DNA-Degeneration führen [125] als frisches Gewebe. Das auch die Reproduzierbarkeit der ERCC1-Genanalyse fehleranfällig ist, wurde von Marchetti et al. an Hand von Lungentumoren diskutiert [126]. Der Autor stellte in diesem Fall die Entdeckung neuer Mutationen in Frage und bewertete sie, nach eigenen Untersuchungen, in seinem Kommentar als Artefakte. In diesem Sinne sind Schwierigkeiten bei der Herstellung und der Auswertung eindeutiger Ergebnisse, unabhängig von den eigenen Erfahrungen aus dieser Arbeit, bereits bekannt.

Diese Probleme machen die alternative ERCC1-Analyse mittels Pyrosequenzierung besonders interessant. Einen Vorteil dieser Methode ist die passgenaue Auswahl des zu sequenzierenden Genabschnitts durch die Auswahl der Primer für PCR und Pyrosequenzierung, wodurch Kontaminationen vermieden werden. Zum anderen besteht mit dieser neuen Methode erstmals die Möglichkeit, einen Cutoff-Wert festzulegen, mit dem sich die Auswertung weiter vereinheitlichen und präzisieren lässt. Für die Etablierung dieses Cutoff-Wertes und zur Gewinnung weiterer Kenntnisse über den direkten Einfluss von ERCC1 auf die Therapie sind weitere Versuchsreihen und die Korrelationen mit Therapiedaten nötig.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass der ERCC1-Nachweis mittels Pyrosequenzierung als neuer Referenzstandard empfohlen werden sollte. Es ist allerdings erforderlich, dass im Rahmen weiterer Arbeiten ein Cutoff für die jeweilige Ausprägung etabliert wird.

### 3.5 Statistische Auswertung der untersuchten Biomarker

Im Folgenden werden nun zunächst die Häufigkeiten und die Verteilung der einzelnen Faktoren beim Primärtumor und den Lebermetastasen dargestellt. Diesen schließen sich die signifikanten Korrelationen im Rahmen der bivariaten Analyse und die Überlebens-Statistik an. Im Wesentlichen sind die signifikanten Ergebnisse und die auffälligen Befunde in diesen Abschnitt eingeflossen. Die vollständigen Ergebnisse mit allen Daten und P-Werten sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt.

#### 3.5.1 Häufigkeit und Verteilung

##### 3.5.1.1 Primärtumoren

Der Biomarker CD44v6 verteilte sich, von fehlender beziehungsweise geringer Präsenz bis hin zu einem sehr starken Vorkommen, relativ homogen im Patientenkollektiv. Der Cutoff für die Gruppeneinteilung (positiv vs. negativ) konnte daher bei 50% gewählt werden: 34,8% (n=31) der untersuchten Tumoren zeigten bis zu 50% CD44v6-positive Zellen, während 65,2% (n=58) der Tumoren mehr als 50% positive Zellen aufwiesen.

Beim Zelladhäsionsmolekül MUC1 wurde der Cutoff aufgrund des geringeren prozentualen Vorkommens so festgelegt, dass jeder positive Tumor ab 1% positiver Zellen als MUC1-positiv gewertet wurde. Damit ergaben sich 64% (n=57) MUC1-negative und 36% (n=32) MUC1-positive Tumoren.

Der HGF- sowie der IGF1Rezeptor waren in einem großen Teil der Tumorproben hoch positiv. Für diese beiden Marker wurde der Cutoff deshalb bei 80% gesetzt. HGFR-positiv waren damit im Patientenkollektiv 75,3% (n=67). Als HGFR-negativ wurden 24,7% (n=22) gewertet. Die IGF1R-positiven Tumoren lagen bei 60,7% (n=54), gegenüber 39,3% (n=35) IGF1R-negativen Patientenproben.

Für das Hitzeschockprotein HSP90 wurde der Cutoff bei 50% festgelegt. Damit waren 24,7% (n=22) der Tumorproben positiv, also zu mehr als 50% gefärbt, während 75,3% (n=67) der Proben HSP90-negativ waren.

Die rpS6-Kinase zeigte, ähnlich wie MUC1, ein insgesamt geringeres Vorkommen, sodass alle Gewebeproben, bei denen sich ein positiver Nachweis der rpS6-Kinase ergab, der Gruppe der rpS6-Kinase-positiven Tumoren zugeordnet wurden. Auf diese Gruppe entfielen 46,1% (n=41) des untersuchten Patientenkollektivs. Als rpS6-Kinase-negativ wurden 53,9% (n=48) der Proben eingeordnet. Diese Verteilung der Biomarkerexpression ist zusammengefasst in *Tabelle 16* dargestellt.

Auf molekularbiologischer Ebene fand sich die Mutation BRAF V600E bei 11,2% (n=10) der Patienten. Bei 88,8% (n=79) wurde der Wildtyp nachgewiesen.

Die Mutationen im KRAS-Gen sind vielfältig. Ein wichtiger Teil dieser Mutationen findet sich in Exon 2 - Codon 12 und 13, welche in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurden. Pro Patient lag maximal eine der möglichen KRAS-Mutation vor. Damit wiesen in der Gruppe der Primärtumoren insgesamt 34,8% (n=31) der untersuchten Proben eine KRAS-Mutation auf. Bei 65,2% (n=58) der Patienten lag der KRAS-Wildtyp vor. In *Tabelle 14* ist die Verteilung der einzelnen KRAS-Mutationen dargestellt.

KRAS-Mutation	n	Prozent
G12A	2	2,2
G12C	1	1,1
G12D	11	12,4
G12S	1	1,1
G12V	11	12,4
G13D	5	5,6

*Tabelle 14: Verteilung der KRAS-Mutationen im Kollektiv der Primärtumoren*

### 3.5.1.2 Lebermetastasen

Die immunhistochemische Färbung der Lebermetastasen ergab ein dem Primärtumor vergleichbares Verteilungsmuster bei den positiven Tumorzellen. Somit konnten die biomarkerspezifischen Grenzwerte (Cutoffs) gleich denen der Primärtumoren (siehe 2.6.1) gewählt werden.

Von den untersuchten Lebermetastasen wiesen 50,8% (n=30) überwiegend CD44v6-positive Zellen auf. CD44v6-negativ waren 49,2% (n=29). MUC1-positve Zellen lagen bei 23,7% (n=14) der Lebermetastasen vor. Bei 76,3% (n=45) ließ sich MUC1 nicht nachweisen.

Der HGF-Rezeptor zeigte sich positiv bei 74,6% (n=44) der untersuchten Proben. 25,4% (n=15) waren HGFR-negativ. Ein ähnliches Verteilungsmuster war bei IGF1R zu sehen: Hier waren 76,3% (n=45) IGF1R-positiv und 23,7% (n=14) IGF1R-negativ.

Es fanden sich bei 32,2% (n=19) des Patientenkollektivs HSP90-positive Metastasen. HSP90-negative Tumoren wurden bei 67,8% (n=40) nachgewiesen. Die rpS6-Kinase war zu 61% (n=36) positiv und bei 39% (n=32) der untersuchten Proben negativ. Diese Verteilung der Biomarkerexpression ist zusammengefasst in *Tabelle 16* dargestellt.

In der Gruppe der Lebermetastasen fand sich ein Patient (1,7%) mit der BRAF-Mutation V600E.

Bei den übrigen 98,3% (n=57) der Patienten wurde der BRAF-Wildtyp nachgewiesen.

Ein positiver KRAS-Status zeigte sich bei 36,2% (n=21) der Metastasen. *Tabelle 15*: Verteilung der KRAS-Mutationen im Kollektiv der Lebermetastasen stellt die Häufigkeit der einzelnen KRAS-Mutation dar. Bei den verbleibenden 63,8% (n=37) der Patienten wurde der KRAS-Wildtyp nachgewiesen.

KRAS-Mutation	n	Prozent
G12A	0	0
G12C	2	3,4
G12D	9	15,3
G12S	2	3,4
G12V	5	8,5
G13D	3	5,1

*Tabelle 15: Verteilung der KRAS-Mutationen im Kollektiv der Lebermetastasen*

Biomarker	Primärtumoren (n=89)				Lebermetastasen (n=59)			
	Überexprimiert		Normal		Überexprimiert		Normal	
	%	n	%	n	%	n	%	n
CD44v6	65,2	58	34,8	31	50,8	30	49,2	29
MUC1	36,0	32	64,0	57	23,7	14	76,3	45
HGFR	75,3	67	24,7	22	74,6	44	25,4	15
IGF1R	60,7	54	39,3	35	76,3	45	23,7	14
HSP90	24,7	22	75,3	67	32,2	19	67,8	40
rpS6-Kinase	46,1	41	53,9	48	61,0	36	39,0	32
BRAF	11,2	10	88,8	79	1,7	1	98,3	57
KRAS	34,8	31	65,2	58	36,2	21	63,8	37

*Tabelle 16: Verteilung der Expression der untersuchten Biomarker in Primärtumoren und Lebermetastasen.*

### 3.5.1.3 Doppelmarker bei Primärtumor und Lebermetastase

Die Verteilung der durch die Bildung der Doppelmarker neuentstandenen Gruppen (positiv vs. negativ) war aufgrund der oben bereits gezeigten vom Biomarker abhängigen unterschiedlichen Gruppengröße ebenfalls sehr verschieden.

Bei den Lebermetastasen ergab sich für den Doppelmarker MUC1/HSP90 die Schwierigkeit, dass in der für beide Biomarker positiven Gruppe nur n=3 Patienten erschienen. Mit dieser kleinen Fallzahl waren Einschränkungen in der statistischen Auswertung verbunden.

Eine weitere Besonderheit im Kollektiv der Patienten mit Lebermetastasen war die Gruppenbildung aus MUC1- und HGFR-positiven Tumoren. Es zeigte sich dass alle MUC1-positiven Patienten (n=14) auch HGFR-positiv (n=44) waren und die Gruppen des Doppelmarkers somit dem Einzelmarker MUC1 entsprachen.

Doppelmarker	Positiv (+/+)	Negativ (+/-, -/+, -/-)
CD44v6/MUC1	22	67
CD44v6/HGFR	43	46
CD44v6/IGFR	34	55
CD44v6/HSP90	18	71
MUC1/HGFR	23	66
MUC1/IGFR	14	75
MUC1/HSP90	8	81
HGFR/HSP90	21	68
IGFR/HSP90	14	75

*Tabelle 17: Fallzahlen in den Gruppen positive und negative Expression der Doppelmarker beim Primärtumor.*

Doppelmarker	Positiv (+/+)	Negativ (+/-, -/+, -/-)
CD44v6/MUC1	11	48
CD44v6/HGFR	25	34
CD44v6/IGFR	23	36
CD44v6/HSP90	13	46
MUC1/HGFR	Alle MUC1-positiven(n=14)	45
MUC1/IGFR	12	47
MUC1/HSP90	3	56
HGFR/HSP90	14	45
IGFR/HSP90	15	44

*Tabelle 18: Fallzahlen in den Gruppen positive und negative Expression der Doppelmarker bei den Lebermetastasen*

### 3.5.2 Bivariate Analyse

Für die bivariate Analyse wurde das in der Literatur übliche Signifikanzniveau, zur Ablehnung der Nullhypothese, bei  $p < 0,05$  festgelegt. Zur Berechnung der Korrelation zwischen den einzelnen Variablen kam der exakte Test nach Fisher, also der korrigierte, zweiseitige Chi-Quadrat-Test, zum Einsatz. Die vollständigen Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den Tabellen im Anhang dargestellt.

Im Kollektiv der Lebermetastasen fand sich nur bei einem, bereits früh verstorbenen, Patienten eine einzige BRAF-Mutation. In diesem Einzelfall erschien eine statistische Auswertung nicht sinnvoll, weshalb von der Durchführung abgesehen wurde.

#### 3.5.2.1 Einzelmarker beim Primärtumor

Die Korrelation des Zelladhäsionsmoleküls CD44v6 mit den klinisch-pathologischen Parametern ergab einen signifikanten Zusammenhang mit der rechtsseitigen Tumorlokalisation ( $p=0,004$ ) und mit einem höheren Tumorgrading ( $p=0,021$ ). Die einzige weitere relevante Korrelation mit einem tumorbiologischen Faktor zeigte sich in den Intensitäten von CD44v6 mit EGFR ( $p=0,008$ ).

Der zweite Zelladhäsionsmarker MUC1 korrelierte mit dem positiven Nodalstatus sowohl bei der Auswertung nach Prozent ( $p=0,02$ ) als auch nach Intensität ( $p=0,021$ ). Die MUC1-Intensität zeigte eine signifikante Korrelation mit dem M-Status ( $p=0,017$ ) sowie dem L-Status ( $p=0,01$ ). MUC1-Prozent korrelierte zudem invers mit der Expression des IGF-1-Rezeptors ( $p=0,023$ ). Die Korrelation mit dem laborchemisch gemessenen, präoperativen CEA-Wert lag exakt auf dem Cutoff-Wert für ein signifikantes Ergebnis ( $p=0,05$ ).

Der IGF-1-Rezeptor korrelierte, außer mit MUC1 (s.o.), signifikant mit dem positiven L-Status ( $p=0,042$ ) und mit dem KRAS-Wildtyp ( $P=0,04$ ). Die Intensität der IGF1R-Färbung ergab entsprechende Korrelationen mit der Tumorlokalisation im linken Hemikolon ( $p=0,001$ ) und mit der histologischen Form eines Adenokarzinoms ( $p=0,015$ ). Zudem zeigte sich ein Zusammenhang der IGF1R-Intensität mit dem Leukozytenmarker CD45 im Bindegewebe ( $p=0,046$ ).

HGFR und HSP90 korrelierten, im Gegensatz zu den oben genannten Markern, nicht mit klinisch-pathologischen Faktoren. Es zeigten sich lediglich signifikante Korrelationen der

beiden Marker untereinander ( $p=0,01$ ) sowie zwischen der HGFR-Intensität mit dem L0-Status ( $p=0,046$ ) beziehungsweise dem BRAF-Wildtyp ( $p=0,047$ ).

Die rpS6-Kinase korrelierte mit dem positiven R-Status ( $0,041$ ) und den EGFR-positiven Tumoren ( $p=0,019$ ). Zudem war die Intensität der rpS6-Kinase signifikant mit dem KRAS-Mutationsstatus korreliert ( $p=0,015$ ).

Der molekularbiologische Marker BRAF korrelierte signifikant mit dem Grading ( $p=0,004$ ). Weitere Zusammenhänge bestanden mit dem positiven Nodalstatus ( $p=0,031$ ) und der Tumorlokalisierung ( $p=0,042$ ). Auch der Zusammenhang zwischen BRAF und KRAS war signifikant ( $p=0,013$ ). Es konnte bei keinem Patienten das gleichzeitige Vorkommen beider Mutationen nachgewiesen werden.

### 3.5.2.2 Doppelmarker im Kollektiv der Primärtumore

Durch die im Kapitel 2.6.2 beschriebene Verknüpfung von jeweils zwei der im Fokus stehenden Biomarker, bei der nur die für jeweils beide Marker positiven Patienten als positiv gewertet wurden (Doppelmarker), zeigte sich in vielen Fällen eine relevante Zunahme beziehungsweise eine Verstärkung der bereits unter 3.5.2.1 genannten Zusammenhänge. Um diesen Sachverhalt möglichst übersichtlich darzustellen, sind in den *Tabellen 19 bis 25* alle signifikanten Korrelationen der beteiligten Einzelfaktoren sowie die daraus resultierenden Doppelmarker gemeinsam aufgeführt.

Die Berechnung der Korrelation zwischen dem Marker CD44v6/MUC1 und dem Nodalstatus ergab, trotz fehlender Signifikanz für den einzelnen Marker CD44v6, einen stärkeren Zusammenhang ( $p=0,012$ ) als für MUC1-solo ( $p=0,02$ ). Zudem zeigte sich die Korrelation mit dem L-Status signifikant ( $p=0,045$ ), obwohl die einzelnen Faktoren dies nicht erreichten. Im gleichen Sinne wie bereits MUC1-solo, korrelierte CD44v6/MUC1 auch mit IGF1R invers ( $p=0,011$ ).

Der Doppelmarker CD44v6/HGFR korrelierte im Sinne einer Verstärkung der Signifikanz mit HSP90 ( $p=0,003$ ). Gleichzeitig war die positive CD44v6/HSP90 – Expression signifikant mit dem höheren Grading ( $p=0,026$ ) sowie mit der Gefäßinvasion V ( $p=0,049$ ) korreliert, ohne dass einer der Einzelmarker mit dem V-Status korrelierte. CD44v6/HSP90 zeigte zudem einen signifikanten Zusammenhang mit HGFR ( $p=0,036$ ) und mit dem molekularbiologischen Marker

BRAF (p=0,026). Auch bei BRAF kam es erst durch die Kombination der beiden Marker zu einer signifikanten Korrelation.

Die Verknüpfung von MUC1 mit HGFR ergab neue beziehungsweise stärkere signifikante Korrelationen mit dem Tumordurchmesser (p=0,014), dem Nodalstatus (p=0,006) und dem präoperativen CEA-Wert (p=0,014).

MUC1/IGF1R war signifikant mit dem Nodalstatus (p=0,031) sowie mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen M1 (p=0,041) korreliert. Diese beiden Korrelationen wurden entsprechend wieder im Tumorstadium nach UICC abgebildet (p=0,016). Die Verbindung von MUC1 und IGF1R ergab nicht nur die genannte neue Korrelation mit dem M-Status, sondern eine weitere mit dem Leukozytenmarker CD45 im Bindegewebe (p=0,019).

Für den Marker MUC1/HSP90 ergaben sich, bei einer relativ kleinen Fallzahl in der „Positiv-Gruppe“, signifikante Zusammenhänge mit der Tumorgröße (p=0,022), dem positiven L-Status (p=0,035) sowie dem Auftreten eines Rezidivs (p=0,05). Im Bereich der tumorbiologischen Faktoren zeigte sich bei dieser Verteilung von MUC1/HSP90 ein schwach signifikanter Zusammenhang mit CD44v6 (p=0,047) und BRAF (0,043). Trotz der teilweise eher nur knapp signifikanten P-Werte, ist auch hier bemerkenswert, dass keiner der beiden Einzelfaktoren mit einem der Marker korrelierte.

Bei IGF1R/HSP90 korrelierte einzig der Gefäßinvasions-Status (p=0,013) signifikant.

Für die Doppelmarker CD44v6/IGF1R und HGFR/HSP90 fand sich bei den Primärtumoren keine signifikante Korrelation.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	8	34	<b>0.004</b>
		Linksseitig	23	24	
Grading	89	G1-2	25	32	<b>0.021</b>
		G3-4	6	26	
Nodal status	89	pN0	20	37	1.0
		pN1-2	11	21	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	19	34	0.825
		III-IV	12	24	
Lymphangiosis carcinomatosa	55	Absent	16	21	0.377
		Present	5	13	

<b>MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	25	17	0.508
		Linksseitig	32	15	
Grading	89	G1-2	38	19	0.5
		G3-4	19	13	
Nodal status	89	pN0	42	15	<b>0.02</b>
		pN1-2	15	17	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	39	14	<b>0.027</b>
		III-IV	18	18	
Lymphangiogenesis carcinomatosa	55	Absent	24	13	0.382
		Present	9	9	
<b>CD44v6/MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	28	14	0.089
		Linksseitig	39	8	
Grading	89	G1-2	46	11	0.131
		G3-4	21	11	
Nodal status	89	pN0	48	9	<b>0.012</b>
		pN1-2	19	13	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	44	9	<b>0.048</b>
		III-IV	23	13	
Lymphangiogenesis carcinomatosa	55	Absent	31	6	<b>0.045</b>
		Present	10	8	

Tabelle 19: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und MUC1 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6 -Ausprägung >50% aufweisen als auch MUC1-positiv sind.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	8	34	<b>0.004</b>
		Linksseitig	23	24	
Grading	89	G1-2	25	32	<b>0.021</b>
		G3-4	6	26	
HSP90	89	≤ 50%	27	40	0.073
		> 50%	4	18	
<b>HGFR</b>	n	Gruppen	≤ 80%	> 80%	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	11	31	0.809
		Linksseitig	11	36	
Grading	89	G1-2	14	43	1.0
		G3-4	8	24	
HSP90	89	≤ 50%	21	46	<b>0.01</b>
		> 50%	1	21	
<b>CD44v6/HGFR</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig	17	25	0.057
		Linksseitig	29	18	
Grading	89	G1-2	34	23	0.051
		G3-4	12	20	
HSP90	89	≤ 50%	41	26	<b>0.003</b>
		> 50%	5	17	

Tabelle 20: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und HGFR sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6 -Ausprägung >50% als auch eine HGFR-Ausprägung >80% aufweisen.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig Linksseitig	8 23	34 24	<b>0.004</b>
Grading	89	G1-2 G3-4	25 6	32 26	<b>0.021</b>
Vein invasion	89	V0 V1	19 2	30 4	1.0
HGFR	89	≤ 80% > 80%	7 24	15 43	0.801
BRAF	89	Wildtyp Mutation	29 2	50 8	0.484
<b>HSP90</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig Linksseitig	32 35	10 12	1.0
Grading	89	G1-2 G3-4	46 21	11 11	0.131
Vein invasion	89	V0 V1	42 3	7 3	0.066
HGFR	89	≤ 80% > 80%	21 46	1 21	<b>0.01</b>
BRAF	89	Wildtyp Mutation	62 5	17 5	0.112
<b>CD44v6/HSP90</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Lokalisation	89	Rechtsseitig Linksseitig	33 38	9 9	0.798
Grading	89	G1-2 G3-4	50 21	7 11	<b>0.026</b>
Vein invasion	89	V0 V1	43 3	6 3	<b>0.049</b>
HGFR	89	≤ 80% > 80%	21 50	1 17	<b>0.036</b>
BRAF	89	Wildtyp Mutation	66 5	13 5	<b>0.026</b>

Tabella 21: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6 -Ausprägung >50% als auch eine HSP90-Ausprägung >50% aufweisen.

<b>MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm > 4.7 cm	33 24	15 17	0.378
Nodal status	89	pN0 pN1-2	42 15	15 17	<b>0.02</b>
Cancer stage (UICC)	89	I-II III-IV	39 18	14 18	<b>0.027</b>
CEA präoperativ	86	< 3.4 ng/ml > 3.4 ng/ml	31 23	12 20	0.118
HSP90	89	≤ 50% > 50%	43 14	24 8	1.0

HGFR	n	Gruppen	≤ 80%	> 80%	p
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm	15	33	0.145
		> 4.7 cm	7	34	
Nodal status	89	pN0	14	43	1.0
		pN1-2	8	24	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	14	39	0.803
		III-IV	8	28	
CEA präoperativ	86	< 3.4 ng/ml	11	32	1.0
		> 3.4 ng/ml	10	33	
HSP90	89	≤ 50%	21	46	<b>0.01</b>
		> 50%	1	21	
MUC1/HGFR	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm	41	7	<b>0.014</b>
		> 4.7 cm	25	16	
Nodal status	89	pN0	48	9	<b>0.006</b>
		pN1-2	18	14	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	45	8	<b>0.007</b>
		III-IV	21	15	
CEA präoperativ	86	< 3.4 ng/ml	37	6	<b>0.014</b>
		> 3.4 ng/ml	26	17	
HSP90	89	≤ 50%	52	15	0.261
		> 50%	14	8	

*Tabelle 22: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker MUC1 und HGFR sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl MUC1-positiv sind als auch eine HGFR-Ausprägung >80% aufweisen.*

MUC1	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
Nodal status	89	pN0	42	15	<b>0.02</b>
		pN1-2	15	17	
Metastatic status	89	cM0	50	25	0.243
		cM1	7	7	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	39	14	<b>0.027</b>
		III-IV	18	18	
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	24	13	0.382
		L1	9	9	
KRAS	89	Wildtyp Mutation	38 19	20 12	0.817
IGF1R	89	≤ 80% > 80%	17 40	18 14	<b>0.023</b>

<b>IGF1R</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 80%</b>	<b>&gt; 80%</b>	<b>p</b>
Nodal status	89	pN0	22	35	1.0
		pN1-2	13	19	
Metastatic status	89	cM0	31	44	0.553
		cM1	4	10	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	21	32	1.0
		III-IV	14	22	
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	20	17	<b>0.042</b>
		L1	4	14	
KRAS	89	Wildtyp	18	40	<b>0.04</b>
		Mutation	17	14	
MUC1	89	0%	17	40	<b>0.023</b>
		≥ 1%	18	14	
<b>MUC1/IGF1R</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>p</b>
Nodal status	89	pN0	52	5	<b>0.031</b>
		pN1-2	23	9	
Metastatic status	89	cM0	66	9	<b>0.041</b>
		cM1	9	5	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	49	4	<b>0.016</b>
		III-IV	26	10	
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	32	5	0.268
		L1	13	5	
KRAS	89	Wildtyp	48	10	0.763
		Mutation	27	4	

*Tabelle 23: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker MUC1 und IGF1R sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl MUC1-positiv sind als auch eine IGF1R-Ausprägung >80% aufweisen. MUC1 und IGF1R korrelieren auch untereinander.*

<b>MUC1</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>p</b>
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm	33	15	0.378
		> 4.7 cm	24	17	
Nodal status	89	pN0	42	15	<b>0.02</b>
		pN1-2	15	17	
Cancer stage (UICC)	89	I-II	39	14	<b>0.027</b>
		III-IV	18	18	
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	24	13	0.382
		L1	9	9	
Rezidiv/Progress	89	Nein	46	25	0.789
		Ja	11	7	
HGFR	89	≤ 80%	13	9	0.615
		> 80%	44	23	
IGF1R	89	≤ 80%	17	18	<b>0.023</b>
		> 80%	40	14	
CD44v6	89	≤ 50%	21	10	0.649
		> 50%	36	22	
BRAF	89	Wildtyp	52	27	0.485
		Mutation	5	5	

<b>HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 50%</b>	<b>&gt; 50%</b>	<b>p</b>
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm > 4.7 cm	37 30	11 11	0.806
Nodal status	89	pN0 pN1-2	42 25	15 7	0.799
Cancer stage (UICC)	89	I-II III-IV	39 28	14 8	0.803
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0 L1	31 12	6 6	0.177
Rezidiv/Progress	89	Nein Ja	55 12	16 6	0.368
HGFR	89	≤ 80% > 80%	21 46	1 21	<b>0.01</b>
IGF1R	89	≤ 80% > 80%	27 40	8 14	0.806
CD44v6	89	≤ 50% > 50%	27 40	4 18	0.073
BRAF	89	Wildtyp Mutation	62 5	17 5	0.112
<b>MUC1/HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>p</b>
Tumor size (mean)	89	≤ 4.7 cm > 4.7 cm	47 34	1 7	<b>0.022</b>
Nodal status	89	pN0 pN1-2	54 27	3 5	0.13
Cancer stage (UICC)	89	I-II III-IV	50 31	3 5	0.261
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0 L1	36 14	1 4	<b>0.035</b>
Rezidiv/Progress	89	Nein Ja	67 14	4 4	<b>0.05</b>
HGFR	89	≤ 80% > 80%	22 59	0 8	0.192
IGF1R	89	≤ 80% > 80%	30 51	5 3	0.255
CD44v6	89	≤ 50% > 50%	31 50	0 8	<b>0.047</b>
BRAF	89	Wildtyp Mutation	74 7	5 3	<b>0.043</b>

*Tabelle 24: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker MUC1 und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl MUC1-positiv sind als auch eine HSP90-Ausprägung >50% aufweisen.*

<b>IGF1R</b>	n	Gruppen	≤ 80%	> 80%	p
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	20	17	<b>0.042</b>
		L1	4	14	
Vein invasion	55	V0	24	25	0.204
		V1	1	5	
MUC1	89	0%	17	40	<b>0.023</b>
		≥ 1%	18	14	
HGFR	89	≤ 80%	9	13	1.0
		> 80%	26	41	
KRAS	89	Wildtyp	18	40	<b>0.04</b>
		Mutation	17	14	
<b>HSP90</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	P
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	31	6	0.177
		L1	12	6	
Vein invasion	55	V0	42	7	0.066
		V1	3	3	
MUC1	89	0%	43	14	1.0
		≥ 1%	24	8	
HGFR	89	≤ 80%	21	1	<b>0.01</b>
		> 80%	46	21	
KRAS	89	Wildtyp	42	16	0.449
		Mutation	25	6	
<b>IGF1R/HSP90</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Lymphangiosis carcinomatosa	55	L0	33	4	0.416
		L1	14	4	
Vein invasion	55	V0	46	3	<b>0.013</b>
		V1	3	3	
MUC1	89	0%	46	11	0.363
		≥ 1%	29	3	
HGFR	89	≤ 80%	21	1	0.174
		> 80%	54	13	
KRAS	89	Wildtyp	47	11	0.363
		Mutation	28	3	

Tabelle 25: Primärtumore: Signifikante Korrelationen der Marker IGF1R und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine HSP90 -Ausprägung >50% als auch eine IGF1R-Ausprägung >80% aufweisen.

### 3.5.2.3 Einzelmarker bei den Lebermetastasen

Bei der Untersuchung der Lebermetastasen ergab sich für das Zelladhäsionsmolekül CD44v6 eine positive Korrelation mit dem Durchmesser der Metastasen ( $p=0,026$ ) sowie mit dem zweiten Zelladhäsionsmolekül MUC1 ( $p=0,03$ ). Unter den tumorbiologischen Faktoren war zudem die CD44v6-Intensität mit dem CD45-Nachweis im Bindegewebe signifikant korreliert ( $p=0,029$ ). Neben der Korrelation mit CD44v6 ergaben sich für MUC1 signifikante, aber inverse

Korrelationen mit HGFR ( $p=0,013$ ) und mit der rpS6-Kinase ( $p=0,033$ ) sowie eine signifikante Korrelation mit HLADR ( $p=0,021$ ).

Von den tumorbiologischen Faktoren hing HGFR sowohl bei der Auswertung nach Prozent als auch nach Intensität signifikant mit dem CD45-Molekül im Bindegewebe zusammen ( $p=0,024$  und  $p=0,026$ ). Auch die anderen Wachstumsfaktorrezeptoren korrelierten untereinander. So bestand zudem ein Zusammenhang zwischen IGF1R und EGFR ( $p= 0,01$ ).

Die Berechnungen für das Hitzeschockprotein HSP90 ergaben signifikante Korrelationen mit dem Grading der Lebermetastasen ( $p=0,006$ ) sowie dem Auftreten extrahepatischer Fernmetastasen ( $p=0,023$ ). Des Weiteren war die HSP90-Intensität signifikant mit dem Geschlecht der Patienten ( $p=0,026$ ) verbunden, wobei weibliche Patienten häufiger eine hohe Intensität zeigten.

Die rpS6-Kinase zeigte, außer der bei MUC1 bereits beschriebenen Korrelation, einen signifikanten Zusammenhang mit EGFR ( $p=0,019$ ) und die Intensität der rpS6-Kinase mit dem Nachweis einer KRAS-Mutation ( $p=0,015$ ).

Der molekulargenetische Biomarker KRAS korrelierte signifikant mit dem Durchmesser der Metastasen ( $p=0,046$ ).

#### 3.5.2.4 Doppelmarker im Kollektiv der Lebermetastasen

Die Untersuchung der Doppelmarker bei den Lebermetastasen zeigte in einigen Fällen ebenfalls synergistische Effekte und neue Korrelationen durch die Kombination in einem Marker, wenngleich deutlich weniger ausgeprägt als beim Primärtumor. Die *Tabellen 26 bis 32* zeigen die, entsprechend der Biomarker geordneten, signifikanten Ergebnisse.

Die Verknüpfung von CD44v6 und MUC1 ergab eine signifikante Korrelation mit HLADR ( $p=0,025$ ) sowie einen p-Wert in der Korrelation mit HGFR, der exakt auf dem Cutoff lag ( $p=0,05$ ). Ein deutlicher Verstärkungseffekt entstand für die gleichen Marker in der Gruppierung CD44v6/HGFR korreliert mit MUC1 ( $p=0,004$ ).

Die Markergruppe CD44v6/IGF1R zeigte neue signifikante Zusammenhänge mit MUC1 ( $p=0,033$ ) und HGFR ( $p=0,03$ ). CD44v6 kombiniert mit HSP90 korrelierte mit dem Grading der Lebermetastasen ( $p=0,015$ ) sowie verstärkend mit dem Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen ( $p=0,004$ ). Zudem trat ein neuer Zusammenhang mit dem Labelingindex von

KI67 ( $p=0,043$ ) auf. Die Korrelation von MUC1/IGF1R mit den tumorbiologischen Faktoren ergab einen signifikanten P-Wert für HGFR ( $p=0,026$ ).

HGFR/HSP90 zeigten einen synergistischen Effekt im Zusammenhang mit dem Auftreten von extrahepatischen Fernmetastasen ( $p=0,012$ ), der Expression des EGF-Rezeptors ( $p=0,005$ ) sowie mit dem Grading der Lebermetastasen ( $p=0,01$ ).

Auch die Zusammenfassung von IGF1R und HSP90 ergab eine signifikante Korrelation mit dem Grading der Lebermetastasen ( $p=0,025$ ) und eine Zunahme der Signifikanz beim Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen ( $p= 0,005$ ) sowie dem histologischen Nachweis eines muzinösen Adenokarzinoms ( $p=0,034$ ).

Die für die Faktoren MUC1 und HGFR positiven Tumoren glichen sich zu hundert Prozent. Dies bedeutet, dass jeder der MUC1-positiven Tumoren ( $n=14$ ) auch für HGFR positiv war ( $n=14$ ), womit die, aus der Verbindung der beiden Marker, gebildete Variable die gleichen positiven Tumoren ( $n=14$ ) beinhaltet und somit keine neuen Ergebnisse ermöglicht hätte.

Der aus den Biomarkern MUC1 und HSP90 gebildete Doppelmarker enthielt mit  $n=3$  nur eine sehr geringe Anzahl an positiven Tumoren. Aufgrund dieser geringen Fallzahl wurde keine Kreuztabelle berechnet.

Einige Markergruppen wurden wegen der mit der Zusammenfassung einhergehenden Redundanz nicht beschrieben, sondern nur in den unten aufgeführten Tabellen dargestellt. Dazu gehören: HGFR/IGF1R, CD44v6/IGF1R, HGFR/HSP90. Bei diesen Biomarkern wiederholten sich die Korrelationen, welche bereits in den oben erläuterten Ergebnissen genannt wurden. Beispielsweise korreliert HGFR/IGF1R mit MUC1 und MUC1/HGFR mit IGF1R. Eine mehrfache Nennung des gleichen Zusammenhangs erschien nicht sinnvoll.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 6	13 15	<b>0.026</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	26 3	19 11	<b>0.03</b>
HGFR	59	≤ 80% > 80%	10 19	5 25	0.143
rpS6-Kinase	59	Negativ Positiv	9 20	14 16	0.288
HLADR	59	Negativ Positiv	20 9	21 9	1.0

<b>MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	28 14	7 7	0.343
CD44v6	59	≤ 50% > 50%	26 19	3 11	<b>0.03</b>
HGFR	59	≤ 80% > 80%	15 30	0 14	<b>0.013</b>
rpS6-Kinase	59	Negativ Positiv	14 31	9 5	<b>0.033</b>
HLADR	59	Negativ Positiv	35 10	6 8	<b>0.021</b>
<b>CD44v6/MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	30 15	5 6	0.298
MUC1	59	Negativ Positiv			Entfällt
CD44v6	59	≤ 50% > 50%			Entfällt
HGFR	59	≤ 80% > 80%	15 33	0 11	<b>0.05</b>
rpS6-Kinase	59	Negativ Positiv	16 32	7 4	0.089
HLADR	59	Negativ Positiv	37 11	4 7	<b>0.025</b>

Tabella 26: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und MUC1 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6-Ausprägung >50% als auch eine positive MUC1-Ausprägung aufweisen.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 6	13 15	<b>0.026</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	26 3	19 11	<b>0.03</b>
<b>HGFR</b>	n	Gruppen	≤ 80%	> 80%	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	8 6	27 15	0.752
MUC1	59	Negativ Positiv	15 0	30 14	<b>0.013</b>
<b>CD44v6/HGFR</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 10	13 11	0.282
MUC1	59	Negativ Positiv	31 3	14 11	<b>0.004</b>

Tabella 27: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und HGFR sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6-Ausprägung >50% als auch eine HGFR-Ausprägung >80% aufweisen.

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 6	13 15	<b>0.026</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	26 3	19 11	<b>0.03</b>
EGFR	59	≤ 50% > 50%	12 17	11 19	0.792
HGFR	59	≤ 80% > 80%	10 19	5 25	0.143
<b>IGF1R</b>	n	Gruppen	≤ 80%	> 80%	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	5 6	30 15	0.298
MUC1	59	Negativ Positiv	12 2	33 12	0.482
EGFR	59	≤ 50% > 50%	10 4	13 32	<b>0.01</b>
HGFR	59	≤ 80% > 80%	5 9	10 35	0.316
<b>CD44v6/IGF1R</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 11	13 10	0.576
MUC1	59	Negativ Positiv	31 5	14 9	<b>0.033</b>
EGFR	59	≤ 50% > 50%	18 18	5 18	0.054
HGFR	59	≤ 80% > 80%	13 23	2 21	<b>0.03</b>

Tabelle 28: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und IGF1R sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6-Ausprägung >50% als auch eine IGF1R-Ausprägung >80% aufweisen

<b>CD44v6</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	p
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	22 6	13 15	<b>0.026</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	7 22	5 25	0.532
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	21 8	14 16	0.064
Grading	55	G2 G3	20 7	16 12	0.259
MUC1	59	Negativ Positiv	26 3	19 11	<b>0.03</b>
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	21 8	24 6	0.552
KI67 (Labeling index)	59	≤ 30% > 30%	13 16	7 23	0.103

<b>HSP90</b>	n	Gruppen	≤ 50%	> 50%	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	24 15	11 6	1.0
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 31	0 19	<b>0.046</b>
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	28 12	7 12	<b>0.023</b>
Grading	55	G2 G3	29 8	7 11	<b>0.006</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	29 11	16 3	0.514
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	27 13	18 1	<b>0.024</b>
KI67 (Labeling index)	59	≤ 30% > 30%	16 24	4 15	0.239
<b>CD44v6/HSP90</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	P
Tumordurchmesser (mean)	56	≤ 3.93 cm > 3.93 cm	29 16	6 5	0.73
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 37	0 13	0.185
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	32 14	3 10	<b>0.004</b>
Grading	55	G2 G3	32 11	4 8	<b>0.015</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	35 11	10 3	1.0
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	33 13	12 1	0.159
KI67 (Labeling index)	59	≤ 30% > 30%	19 27	1 12	<b>0.043</b>

Tabelle 29: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker CD44v6 und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine CD44v6-Ausprägung >50% als auch eine HSP90-Ausprägung >50% aufweisen.

<b>MUC1</b>	n	Gruppen	Negativ	Positiv	p
CD44v6	59	≤ 50% > 50%	26 19	3 11	<b>0.03</b>
HGFR	59	≤ 80% > 80%	15 30	0 14	<b>0.013</b>
rpS6-Kinase	59	Negativ Positiv	14 31	9 5	<b>0.033</b>
HLADR	59	Negativ Positiv	35 10	6 8	<b>0.021</b>
EGFR	59	≤ 50% > 50%	19 26	4 10	0.532

<b>IGF1R</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 80%</b>	<b>&gt; 80%</b>	<b>P</b>
CD44v6	59	≤ 50%	7	22	1.0
		> 50%	7	23	
HGFR	59	≤ 80%	5	10	0.316
		> 80%	9	35	
rpS6-Kinase	59	Negativ	6	17	0.762
		Positiv	8	28	
HLADR	59	Negativ	11	30	0.516
		Positiv	3	15	
EGFR	59	≤ 50%	10	13	<b>0.01</b>
		> 50%	4	32	
<b>MUC1/IGF1R</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>P</b>
CD44v6	59	≤ 50%	26	3	0.104
		> 50%	21	9	
HGFR	59	≤ 80%	15	0	<b>0.026</b>
		> 80%	32	12	
rpS6-Kinase	59	Negativ	16	7	0.185
		Positiv	31	5	
HLADR	59	Negativ	35	6	0.158
		Positiv	12	6	
EGFR	59	≤ 50%	21	2	0.103
		> 50%	26	10	

*Tabelle 30: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker MUC1 und IGF1R sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine positive MUC1-Ausprägung >50% als auch eine IGF1R-Ausprägung >80% aufweisen.*

<b>HGFR</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 80%</b>	<b>&gt; 80%</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein	2	7	1.0
		Ja	13	37	
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein	11	24	0.238
		Ja	4	20	
Grading	55	G2	9	27	1.0
		G3	4	15	
MUC1	59	Negativ	15	30	<b>0.013</b>
		Positiv	0	14	
CD45 im Bindegewebe	59	1-2	11	34	0.738
		3	4	10	
EGFR	59	≤ 50%	9	14	0.07
		> 50%	6	30	

<b>HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 50%</b>	<b>&gt; 50%</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 31	0 19	<b>0.046</b>
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	28 12	7 12	<b>0.023</b>
Grading	55	G2 G3	29 8	7 11	<b>0.006</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	29 11	16 3	0.514
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	27 13	18 1	<b>0.024</b>
EGFR	59	≤ 50% > 50%	18 22	5 14	0.254
<b>HGFR/HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 36	0 14	0.098
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	31 14	4 10	<b>0.012</b>
Grading	55	G2 G3	31 10	5 9	<b>0.01</b>
MUC1	59	Negativ Positiv	34 11	11 3	1.0
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	32 13	13 1	0.152
EGFR	59	≤ 50% > 50%	22 23	1 13	<b>0.005</b>

*Tabelle 31: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker HGFR und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine HGFR-Ausprägung >80% als auch eine HSP90-Ausprägung >50% aufweisen.*

<b>IGF1R</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 80%</b>	<b>&gt; 80%</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	2 12	7 38	1.0
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	9 5	26 19	0.762
Grading	55	G2 G3	9 3	27 16	0.511
Histologie	58	Adenokarzinom Mucinöses Adenokarzinom	13 0	39 6	0.32
EGFR	59	≤ 50% > 50%	10 4	13 32	<b>0.01</b>
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	12 2	33 12	0.482

<b>HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>≤ 50%</b>	<b>&gt; 50%</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 31	0 19	<b>0.046</b>
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	28 12	7 12	<b>0.023</b>
Grading	55	G2 G3	29 8	7 11	<b>0.006</b>
Histologie	58	Adenokarzinom Mucinöses Adenokarzinom	38 2	14 4	0.068
EGFR	59	≤ 50% > 50%	18 22	5 14	0.254
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	27 13	18 1	<b>0.024</b>
<b>IGF1R/HSP90</b>	<b>n</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>P</b>
Neoadjuvante Chemotherapie	59	Nein Ja	9 35	0 15	0.095
Extrahepatische Fernmetastasen	59	Nein Ja	31 13	4 11	<b>0.005</b>
Grading	55	G2 G3	30 10	6 9	<b>0.025</b>
Histologie	58	Adenokarzinom Mucinöses Adenokarzinom	41 2	11 4	<b>0.034</b>
EGFR	59	≤ 50% > 50%	20 24	3 12	0.126
CD45 im Bindegewebe	59	1-2 3	31 13	14 1	0.09

*Tabelle 32: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen der Marker IGF1R und HSP90 sowie deren Doppelmarker: Als „Positiv“ gelten hier alle Patienten, die sowohl eine IGF1R-Ausprägung >80% als auch eine HSP90-Ausprägung >50% aufweisen.*

### 3.5.2.5 Verstärkungseffekt der Doppelmarker im Vergleich zwischen Primarius und Lebermetastasen

Wie aus den vorausgegangenen Kapiteln hervorgeht, ist der Verstärkungseffekt der Doppelmarker bei den Primärtumoren deutlich stärker ausgeprägt als bei den Lebermetastasen. Mit Verstärkung ist gemeint, dass ein Doppelmarker im Vergleich neue oder zunehmende Signifikanz zu den jeweiligen Einzelmarkern aufweist aus denen er besteht. Dies kommt in weitaus größerem Umfang bei den Primärtumoren vor als in den Lebermetastasen

(Tabelle 33). Bei den Primärtumoren tritt der so bezeichnete Verstärkungseffekt bei 82% (n=18) auf, während er bei den Doppelmarkern im Kollektiv der Lebermetastasen nur in 53% (n=8) auftritt. Es ergibt sich daraus zwar kein signifikanter Unterschied, aber mit einem p-Wert von 0,08 einen Trend in diese Richtung.

Doppelmarker mit Verstärkung		
Primaria	Ja	18
	Nein	4
Metastasen	Ja	8
	Nein	7
P=0,08		

Tabelle 33: Verteilung der Zunahme des Signifikanzniveaus ("Verstärkung") zwischen Primärtumor und Lebermetastasen.

### 3.5.3 Nichtparametrische Überlebensfunktion – Kaplan-Meier-Schätzer

Die Analyse der Überlebenszeit in Abhängigkeit von einzelnen Merkmalen wurde auf Grundlage der, aus der regelmäßig durchgeführten Nachsorge stammenden, Daten realisiert. Der Beobachtungszeitraum begann für jeden Patienten mit dem Operationstermin und der damit verbundenen Ankunft des Gewebes im Labor. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Gewebeeingang ab dem Jahr 2006 untersucht. Das Ende der Erhebung der Nachsorgedaten lag im Dezember 2015. Damit konnte für die Patienten ein Beobachtungszeitraum von längstens 110,03 Monaten (9,2 Jahren) bei den Primärtumoren und ein Zeitraum von 125,8 Monaten (10,5 Jahren) für die Lebermetastasen erreicht werden. Als Endpunkt für die Statistik wurde das tumorbedingte Versterben gewählt. War die Nachsorge nicht mehr möglich, beispielsweise durch Umzug oder Wechsel des Hausarztes, wurde der Patient mit dem letzten Nachsorgedatum zensiert und die Zeitspanne bis zur Zensur verwendet. Patienten deren Todesursache im Rahmen der Nachsorge nicht geklärt werden konnte, wurden ebenso zensiert.

Als Standardmethoden wurden Kaplan-Meier-Kurven und der Log-Rank-Test verwendet. Mit zunehmendem Beobachtungszeitraum veränderte sich allerdings die Stellung der

Überlebenskurven zueinander und damit der P-Wert im Log-Rank-Test. Dabei schwächte sich die Signifikanz einiger Variablen im Verlauf ab, was größere Überlebensunterschiede in der Anfangsphase des postoperativen Beobachtungszeitraums vermuten ließ. Um diese Überlebensunterschiede gesondert zu untersuchen, wurde der Wilcoxon-Test zusätzlich zum Log-Rank-Test verwendet. Der Fokus des Wilcoxon-Tests liegt auf dem Anfang der Kaplan-Meier-Kurven und bildet diesen besser ab. Es zeigte sich, dass das Phänomen der Abschwächung und Annäherung der Kurven im Verlauf nur bei den Lebermetastasen auftrat, was die Schlussfolgerung nahelegt, dass der Therapieerfolg vor allem von der Ausgangssituation und dem primären Therapiekonzept abhängig ist. Weiteres dazu im Diskussionsteil. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests für die Primärtumoren sind im Anhang aufgeführt.

Alle Merkmale, bei deren Berechnung sich kein signifikanter Zusammenhang ergab ( $p > 0,05$ ), werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur im Anhang dargestellt.

#### 3.5.3.1 Primärtumoren

In der Überlebensanalyse zeigten, unter den klinisch-pathologischen Merkmalen, besonders die Faktoren der TNM- und UICC-Klassifikation teilweise hoch signifikante Zusammenhänge mit einem kürzeren Überleben. Der Tumorstatus (Log-Rank:  $p=0,031$ ), der Nodalstatus (Log-Rank:  $p=0,001$ ) und der Metastasierungsstatus (Log-Rank:  $p<0,001$ ) sowie der L-Status (Log-Rank:  $p=0,002$ ) und der V-Status (Log-Rank:  $p<0,001$ ) waren signifikant. Damit ergab sich konsequenterweise auch für die UICC-Klassifikation (Gruppen I-IIa vs. IIb-IV) ein signifikanter Zusammenhang (Log-Rank:  $p<0,001$ ). Ebenso war das R-Stadium (Log-Rank:  $p<0,001$ ) hoch signifikant mit einer eingeschränkten Überlebensdauer verknüpft. War der präoperativ bestimmte Tumormarker CEA pathologisch, zeigte sich ebenfalls eine signifikant reduzierte Überlebenszeit (Log-Rank:  $p=0,004$ ).

Unter den immunhistochemisch gefärbten Tumormarkern war der EGF-Rezeptor sowohl bei der Auswertung in Prozent (Log-Rank:  $p=0,014$ ) als auch nach Intensität (Log-Rank:  $p=0,049$ ) signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Der einzige weitere signifikante Marker war der BRAF-Mutationsstatus (Log-Rank:  $p<0,001$ ).

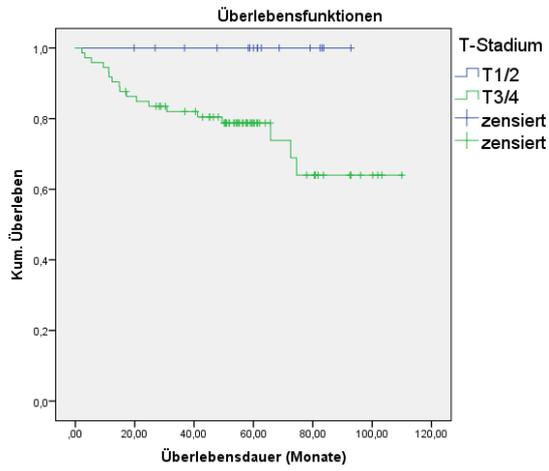


Abbildung 21: Primärtumor, T-Stadium: T1-2 vs. T3-4

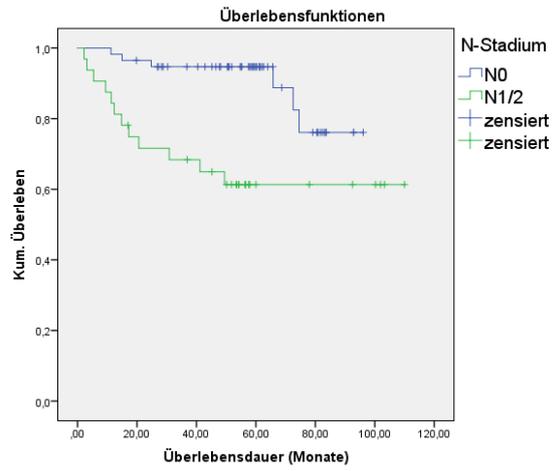


Abbildung 22: Primärtumor, N-Stadium: N0 vs. N1-2

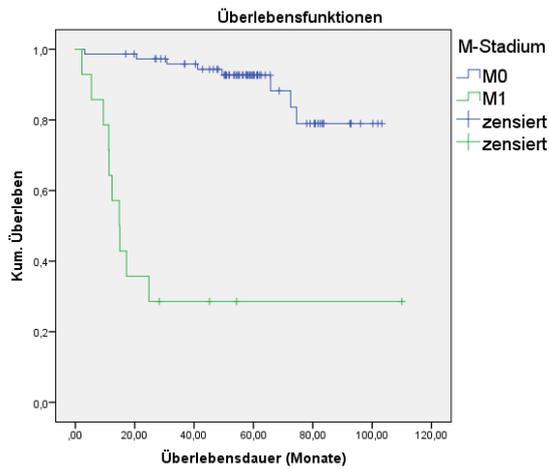


Abbildung 23: Primärtumor, M-Stadium: M0 vs. M1

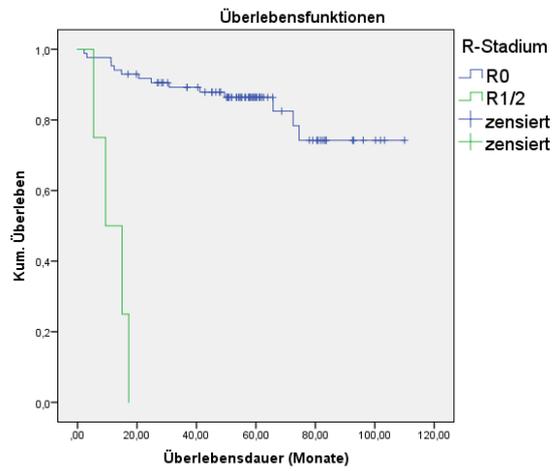


Abbildung 24: Primärtumor, R-Stadium: R0 vs. R1-2

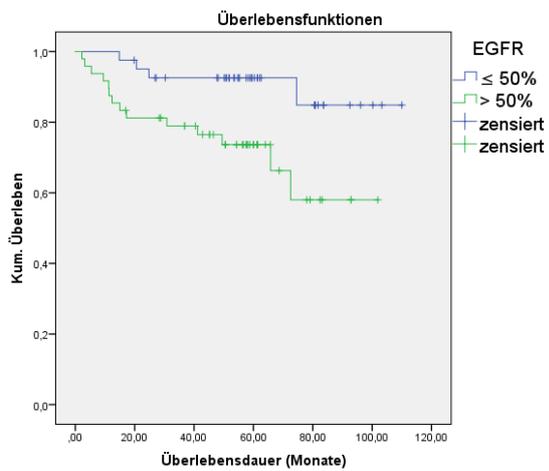


Abbildung 25: Primärtumor, EGFR EGFR ≤50% vs. >50%

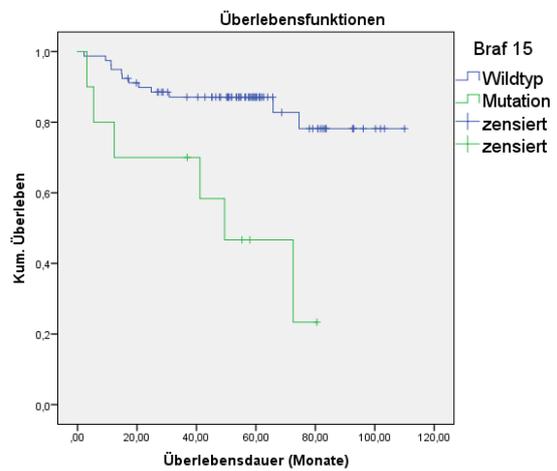


Abbildung 26: Primärtumor, BRAF: BRAF15 wt vs. mut

### 3.5.3.2 Lebermetastasen

Die Auswertung der, mittels Kaplan-Meier-Schätzer untersuchten, Lebermetastasen ergab einen signifikanten Einfluss des histologischen Gradings der Metastasen (Log-Rank:  $p=0,008$ / Wilcoxon:  $p=0.005$ ) auf das Überleben. Das Auftreten oder Vorhandensein von extrahepatischen Fernmetastasen nach der initialen Resektion der Lebermetastasen war ebenfalls signifikant mit einem eingeschränkten Überleben assoziiert (Log-Rank:  $p=0,001$ / Wilcoxon:  $p= 0.024$ ).

Auch der Durchmesser der jeweils größten Metastase zeigte im Log-Rank-Test zunächst einen signifikanten Wert. Dieses Ergebnis schwächte sich im Verlauf der Nachbeobachtung ab, bis es schließlich zum Ende des Beobachtungszeitraumes zu einer Kreuzung der Überlebenskurven kam (Log-Rank:  $p=0,158$ / Wilcoxon:  $p= 0.057$ ) (*siehe Abbildung 29*). In ähnlicher Weise lag die, im Log-Rank-Test zunächst eindeutig signifikante, Korrelation des Zelladhäsionsmoleküls CD44v6 mit einem kürzeren Überleben auf längere Sicht knapp oberhalb des Cutoffs. Mit Fokus auf den frühen Nachsorgezeitraum durch den Wilcoxon-Test, zeigte sich wiederum einen signifikanten Unterschied (Log-Rank:  $p=0,054$ / Wilcoxon:  $p=0,006$ ) (*siehe Abbildung 30*).

Eindeutig signifikant war der Biomarker MUC1: Zum einen nach Prozent (Log-Rank:  $p=0,019$ / Wilcoxon:  $p=0,007$ ) und zum anderen schwach signifikant nach seiner Intensität (Log-Rank:  $p=0,049$ / Wilcoxon  $p=0,054$ ). Ebenso unabhängig vom Beobachtungszeitraum hatte das Hitzeschockprotein HSP90 (Log-Rank:  $p=0,018$ / Wilcoxon  $p=0,019$ ) einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Der molekularbiologische Marker BRAF wurde aufgrund einer einzigen nachgewiesenen Mutation (1,7% von  $n=59$ ) bei einem Patienten mit frühem Versterben (12,35 Monate postoperativ) nicht untersucht.

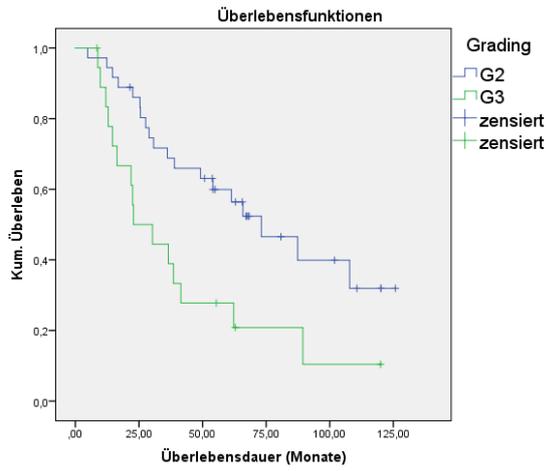


Abbildung 27: Lebermetastasen, Grading: G2 vs. G3

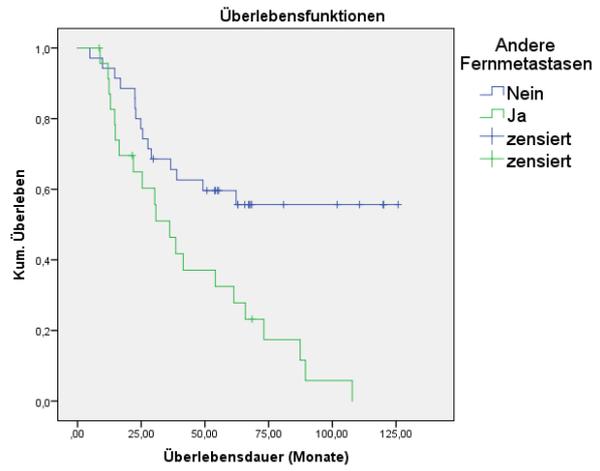


Abbildung 28: Extrahep. Fernmetastasen: nicht vorhanden vs. vorhanden

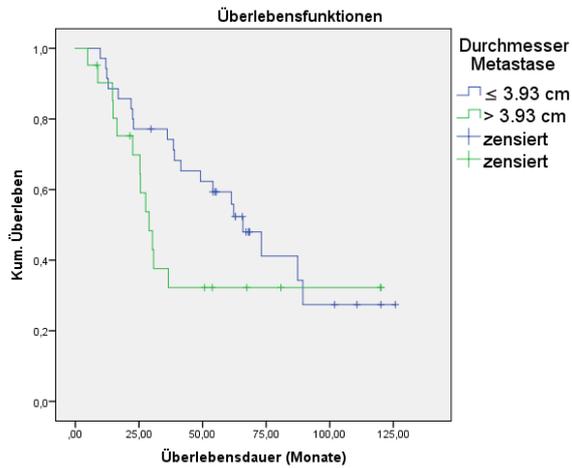


Abbildung 29: Lebermetastase, Durchmesser: ≤ 3,93cm vs. >3,93 cm (nicht signifikant)

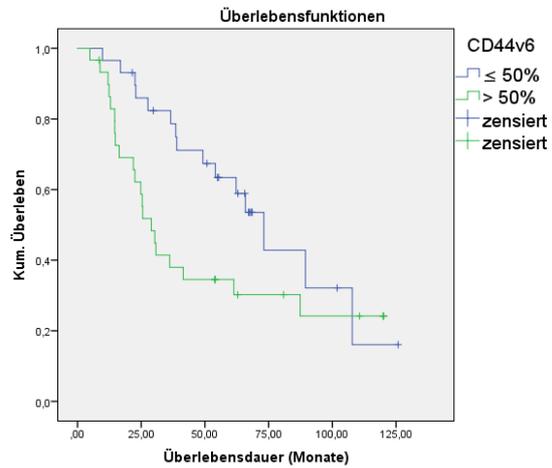


Abbildung 30: Lebermetastasen, CD44v6: ≤ 50% vs. > 50% (nur Wilcoxon-Test signifikant)

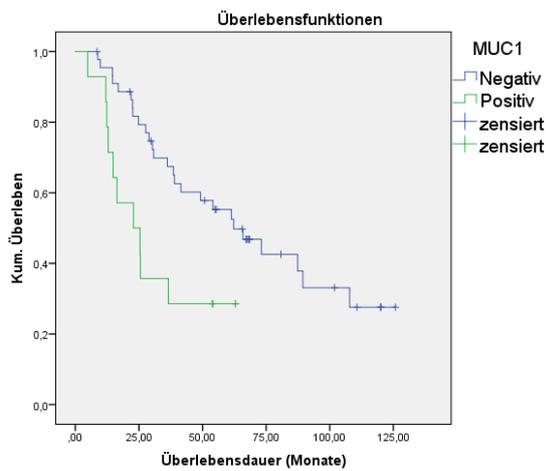


Abbildung 31: Lebermetastase, MUC1: negativ vs. positiv

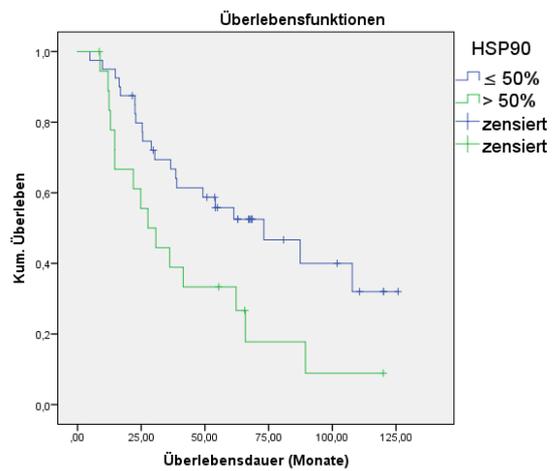


Abbildung 32: Lebermetastase, HSP90 ≤ 50% vs. > 50%

### 3.5.3.3 Doppelmarker in Primärtumor und Lebermetastasen

Signifikante Ergebnisse in der Überlebenszeitanalyse stellten sich im Kollektiv der Primärtumoren bei den Doppelmarkern MUC1/HSP90 (Log-Rank:  $p=0,034$ ), CD44v6/HGFR (Log-Rank:  $p=0,048$ ) und CD44v6/HSP90 (Log-Rank:  $p=0,031$ ) dar.

Die Untersuchung der Lebermetastasen zeigte auch bei der Analyse der Doppelmarker ein komplexeres Gesamtbild, sodass erneut sowohl der Log-Rank-Test als Standardverfahren als auch der Wilcoxon-Test zur Fokussierung auf den frühen Beobachtungszeitraum verwendet wurden. Dies war im Besonderen für die Betrachtung der Wachstumsfaktorrezeptoren relevant: Der Doppelmarker aus CD44v6 mit HGFR (Log-Rank:  $p=0,087$ / Wilcoxon:  $p=0,008$ ) beziehungsweise IGF1R (Log-Rank:  $p=0,098$ / Wilcoxon:  $p=0,017$ ) ergab mit dem Wilcoxon-Test signifikante Überlebensunterschiede. In beiden Analysen kreuzten sich die Überlebenskurven

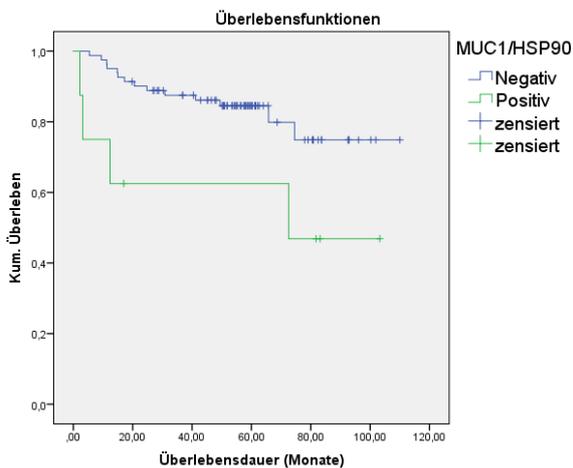


Abbildung 33: Primärtumor, MUC1/HSP90: negativ vs. positiv

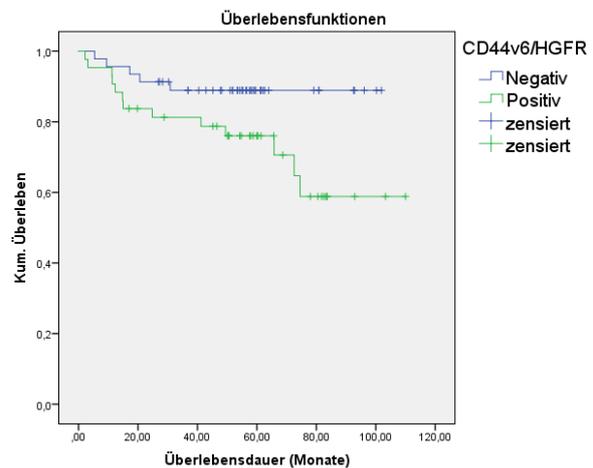


Abbildung 34: Primärtumor, CD44v6/HGFR: negativ vs. positiv

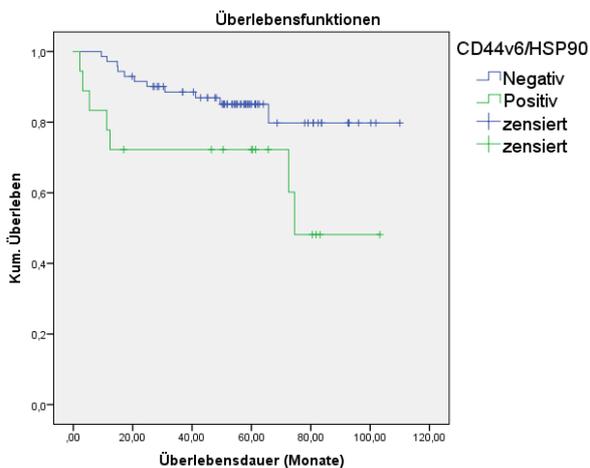


Abbildung 35: Primärtumor, CD44v6/HSP90: negativ vs. positiv

zum Ende des Beobachtungszeitraumes mit einer sehr geringen Patientenzahl nach der Kreuzung ( $n=3$ ) (siehe *Abbildungen 36 und 37*). Ähnlich, jedoch ohne Kreuzen der Überlebenskurven, verhielt es sich mit MUC1/IGF1R (Log-Rank:  $p=0.069$ / Wilcoxon  $p=0.018$ ). Die weiteren Biomarkerkombinationen, welche einen signifikanten Überlebensunterschied aufwiesen, zeigten nur kleine Abweichungen zwischen den beiden Testverfahren: MUC1/CD44v6 (Log-Rank:  $p=0.011$ / Wilcoxon:  $p=0.002$ ), CD44v6/HSP90 (Log-Rank:  $p<0.001$ / Wilcoxon:  $p<0.001$ ), MUC1/rpS6-Kinase (Log-Rank:  $p=0.038$ / Wilcoxon:  $p=0.024$ ), HGFR/HSP90 (Log-Rank:  $p=0.016$ / Wilcoxon:  $p=0.007$ ), IGF1R/HSP90 (Log-Rank:  $p=0.003$ / Wilcoxon:  $p=0.011$ ) sowie MUC1/HSP90 (Log-Rank:  $p<0.001$ / Wilcoxon:  $p<0.001$ ). Der letztgenannte Faktor MUC1/HSP90 wurde aufgrund einer sehr kleinen positiven Gruppe von  $n=3$  nur unter Vorbehalt ausgewertet.

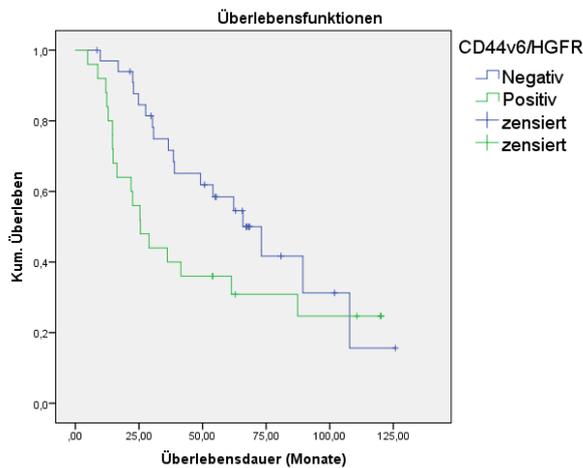


Abbildung 36: Lebermetastasen, CD44v6/HGFR: negativ vs. positiv

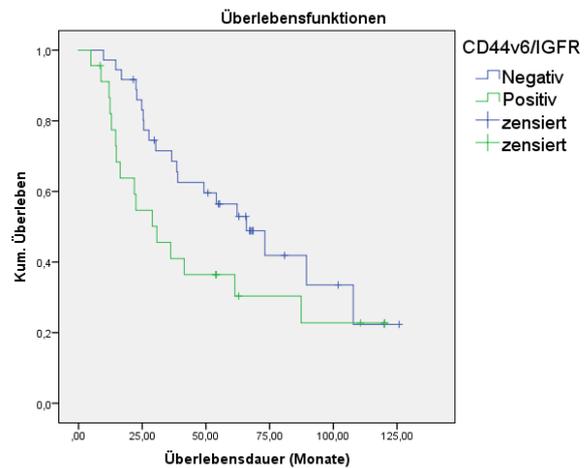


Abbildung 37: Lebermetastasen, CD44v6/IGF1R: negativ vs. positiv

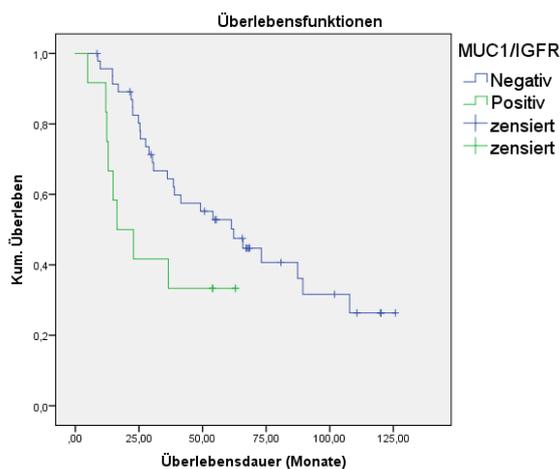


Abbildung 38: Lebermetastasen, MUC1/IGF1R: negativ vs. positiv

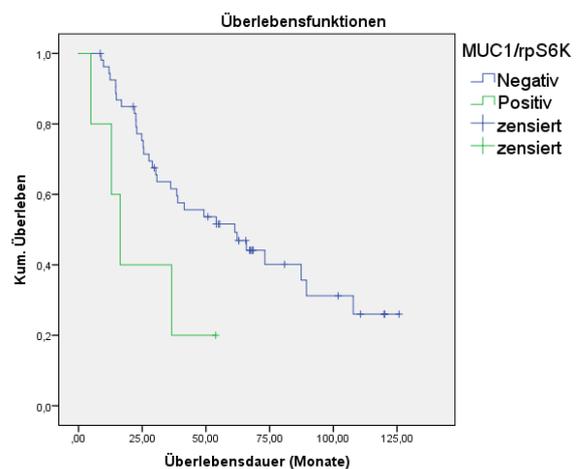


Abbildung 39: Lebermetastasen, MUC1/rpS6-Kinase: negativ vs. positiv

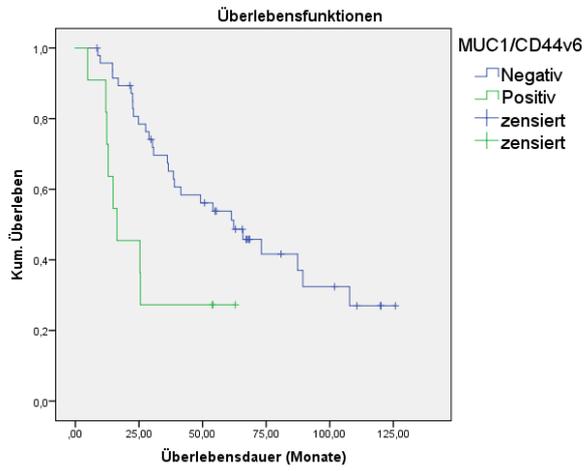


Abbildung 40: Lebermetastasen, MUC1/CD44v6: negativ vs. positiv

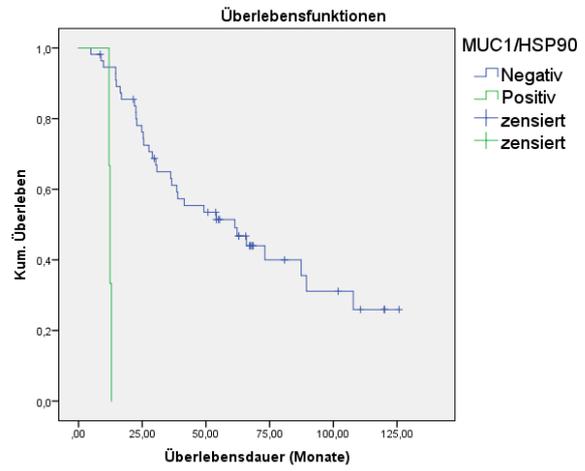


Abbildung 41: Lebermetastasen, MUC1/HSP90: negativ vs. positiv

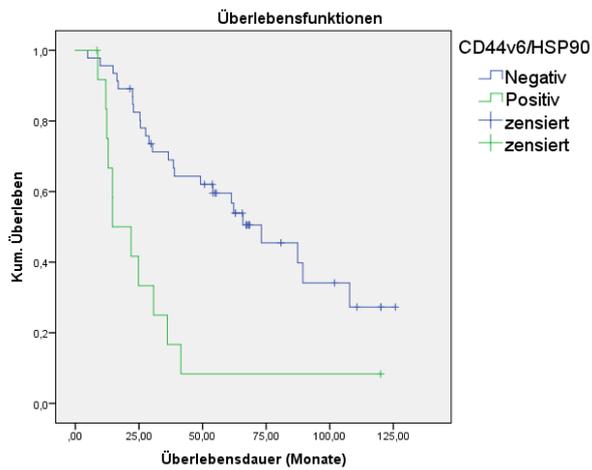


Abbildung 42: Lebermetastasen, CD44v6/HSP90: negativ vs. positiv

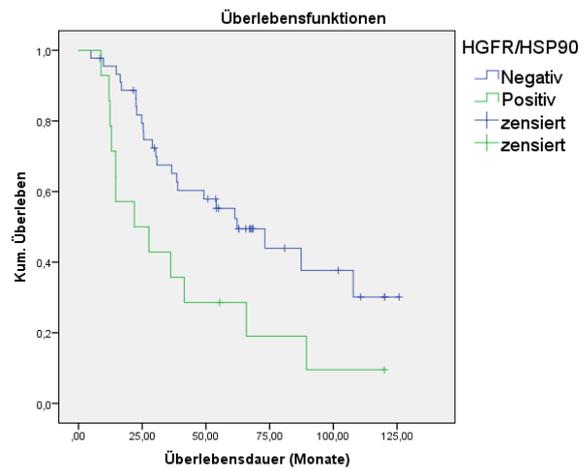


Abbildung 43: Lebermetastasen, HGFR/HSP90: negativ vs. positiv

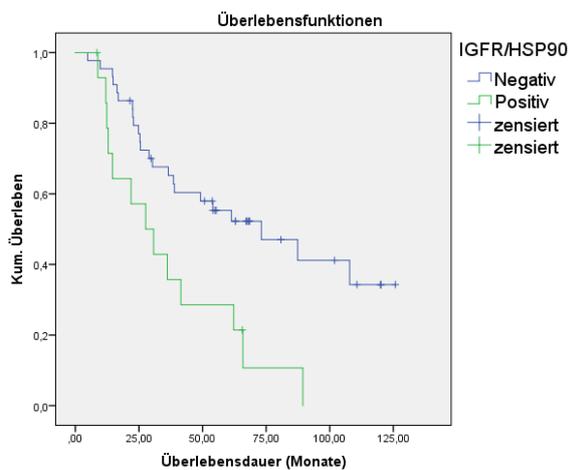


Abbildung 44: Lebermetastasen, IGF1R/HSP90: negativ vs. positiv

### 3.5.4 Cox-Regressionsmodell

#### 3.5.4.1 Cox-Regression im Kollektiv der Primärtumoren und Lebermetastasen

Die Kollektivbeschreibung der einzelnen Tumorentitäten umfasste, neben den in *Kapitel 3.1* bereits erläuterten Daten, auch die Berechnung der Cox-Regression um die Gewichtung der einzelnen klinisch-pathologischen Faktoren im Kollektiv zu beschreiben.

Zunächst wurde die Cox-Regression der klinisch-pathologischen Faktoren, unter Einschluss der molekularbiologischen Marker BRAF und KRAS, zur Analyse des Kollektivs der Primärtumore durchgeführt. Hierfür wurden die in *Tabelle 34* aufgeführten Variablen berücksichtigt.

Variable	Gruppen	Kaplan-Meier (Log-Rank)
Geschlecht	Männlich Weiblich	P=0,388
Alter (mean)	≤ 68,1 Jahre > 68,1 Jahre	P=0,148
Lokalisation	Rechtes Kolon Linkes Kolon	P=0,157
Histologie	Adenokarzinom Muzinöses Adenokarzinom	P=0,235
Tumordurchmesser	≤ 4,7cm > 4,7cm	P=0,931
Grading	G1-2 G3-4	P=0,127
T-Stadium	T1-2 T3-4	P=0,031
N-Stadium	N0 N1-N2	P=0,001
M-Stadium	M0 M1	P<0,001
R-Stadium	R0 R1-2	P<0,001
KRAS	WT Mutiert	P=0,86
BRAF	WT Mutiert	P<0,001

*Tabelle 34: Primärtumore: In die Cox-Regression einfließende Variablen.*

Die Cox-Analyse der klinisch-pathologischen Variablen ergab signifikante Werte für den Metastasierungsstatus mit  $p<0,001$  (Odds Ratio 14.708, 95%-KI 4,686-46,164) sowie die BRAF-

Mutation mit  $p < 0,001$  bei einer Odds Ratio von 7,217 (95%-KI 2,462-21,15). Der R-Status war im Rahmen der mehrstufigen Analyse erst im letzten Schritt mit  $p = 0,056$  (Odds Ratio 0,979, 95%-KI 0,964-16,415) nicht mehr signifikant.

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
M-Status	<0,001	14,708	4,686	46,164
R-Status	0,056	3,979	0,964	16,415
BRAF	<0,001	7,217	2,462	21,15

Tabella 35: Primärtumore, Cox-Regression: Signifikante Variablen.

In die primäre Analyse der Lebermetastasen flossen die in *Tabella 36* aufgeführten klinisch-pathologischen Variablen ein. BRAF wurde, wie bereits oben beschrieben, aufgrund der geringen Fallzahl ( $n=1$ ) nicht berücksichtigt.

Variable	Gruppen	Kaplan-Meier (Log-Rank)
Geschlecht	Männlich Weiblich	$P=0,163$
Alter (mean)	$\leq 62,6$ Jahre $> 62,6$ Jahre	$P=0,254$
Histologie	Adenokarzinom Muzinöses Adenokarzinom	$P=0,429$
Tumordurchmesser	$\leq 3,93$ cm $> 3,93$ cm	$P=0,158$
Anzahl Lebermetastasen	1 >1	$P=0,493$
Extrahepatische Metastasen	0 $\geq 1$	$P=0,001$
Grading	G2 G3	$P=0,008$
R-Stadium	R0 R1-2	$P=0,63$
KRAS	WT Mutierte	$P=0,534$

Tabella 36: Lebermetastasen: In die Cox-Regression einfließende Variablen.

Die Cox-Regression für die klinisch-pathologischen Faktoren bei den Lebermetastasen ergab zwei signifikante Variablen (siehe *Tabella 37*): Extrahepatische Fernmetastasen mit  $p=0,012$  bei einer Odds Ratio von 2,534 (95%-KI 1,23-5,221) und das histologische Grading der Metastasen mit  $p=0,026$  bei einer Odds Ratio von 2,271 (95%-KI 1,101-4,682).

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,012	2,534	1,23	5,221
Grading	0,026	2,271	1,101	4,682

Tabelle 37: Lebermetastasen, Cox-Regression: Signifikante Variablen.

### 3.5.4.2 Überlegungen zur Cox-Regression für die Analyse der tumorbiologischen Faktoren

Die Cox-Regression ist ein Verfahren zur Schätzung des Einflusses unabhängiger Variablen auf die Überlebenszeit. Es handelt sich um ein sogenanntes semiparametrisches Verfahren, bei dem die Schätzung kein komplettes Vorhersagemodell für die Überlebenszeit bietet, sondern es lässt die Verteilungsfunktion der beobachteten Episodenenden unspezifiziert und schätzt ausschließlich den Einfluss metrischer oder kategorialer Variablen.

Da empfohlen wird, den Fokus der Cox-Regression für die jeweilige Berechnung auf zwei der zu analysierenden Variablen zu legen und die weiteren Variablen in diesem Test als Kontrollvariablen zu verwenden, fließen in die Berechnung der Cox-Regression für das tumorbedingte Versterben nicht nur die relevanten signifikanten Merkmale der Kaplan-Meier-Analysen (siehe *Kapitel 3.5.3*) ein, sondern auch nicht signifikante epidemiologische Variablen zur Kontrolle und Stabilisierung des Berechnungsmodells. In der endgültigen Rechnung werden somit die signifikanten Doppelmarker mit den darin enthaltenen Einzelmarkern und den epidemiologischen Variablen Alter und Geschlecht verwendet. Als weitere Kontrollvariablen werden die übrigen „starken“ einzelnen Biomarker verwendet. Soll beispielsweise der Doppelmarker CD44v6/HSP90 analysiert werden, wird je ein Berechnungsansatz mit den beiden Einzelmarkern und ein Ansatz mit dem Doppelmarker gerechnet. Hinzu kommen die bereits beschriebenen Kontrollvariablen, bestehend aus signifikanten Variablen im Kaplan-Meier-Schätzer, epidemiologischen Variablen und den noch nicht primär enthaltenen starken Biomarkern. Alle in der Cox-Regression verwendeten Variablen sind in *Tabelle 38* aufgeführt.

Da in der Cox-Regression nur komplette Datensätze erlaubt sind, verkleinert sich die Fallzahl mit jedem Patienten dem ein zu untersuchendes Merkmal fehlt. Um über eine möglichst große Fallzahl verfügen zu können, wurden Variablen, bei denen Daten (zum Beispiel durch uneindeutige Angaben in pathologischen Berichten) fehlen, zunächst erneut geprüft. Auf diese Weise wurden schließlich die erweiterten TNM-Merkmale Lymphangiosis

carcinomatosa (n=55), Gefäßinvasion (n=55) und Perineuralscheideninvasion (n=20) für die Cox-Regression ausgeschlossen.

Ebenso wurde der BRAF-Mutationsstatus nicht berücksichtigt, da bei der Untersuchung der Lebermetastasen (n=59) nur in einem Fall eine Mutation nachgewiesen wurde. Diese war im Vergleich zu den üblicherweise publizierten Fallzahlen nicht repräsentativ und könnte so zu einer Schwächung des Modells führen. Die in der Literatur [42, 80, 127] beschriebene und auch in dieser Arbeit, unter den Primärtumoren, zu ersehende Häufigkeit der BRAF-Mutation beim kolorektalen Karzinom lag in der Regel bei 6-15%.

Um dem Einfluss untereinander korrelierter Variablen, welcher durch die Doppelmarker entstehen konnte, Rechnung zu tragen, wurde im Statistikprogramm SPSS die Methode „Vorwärts LR“ verwendet. Mit dieser Methode wurden Modelle entsprechend der Stärke der Einflussgrößen erstellt, wodurch verhindert wurde, dass hochkorrelierte Variablen gemeinsam erschienen. Es wurden also die stärksten Einflussfaktoren nacheinander, in einer schrittweise durchgeführten Berechnung, in das Modell aufgenommen und daraus jeweils die Cox-Regression berechnet. Mit diesem Verfahren konnten alle im Kaplan-Meier-Schätzer

Primärtumoren		Lebermetastasen	
Faktor	Kaplan-Meier (Log-Rank)	Faktor	Kaplan-Meier (Log-Rank)
MUC1/HSP90	p=0,034	CD44v6/HSP90	P<0,001
CD44v6/HSP90	P=0,031	CD44v6/MUC1	P=0,011
CD44v6/HGFR	P=0,048	MUC1/HSP90	P<0,001
CD44v6	P=0,109	MUC1/rpS6	P=0,038
MUC1	P=0,917	MUC1/IGF1R	P=0,069*
HGFR	P=0,212	CD44v6/HGFR	P=0,087*
HSP90	P=0,151	CD44v6/IGF1R	P=0,098*
Alter (mean)	P=0,148	HGFR/HSP90	P=0,016
Geschlecht	P=0,388	IGF1R/HSP90	P=0,003
N-Status	P=0,001	CD44v6	P=0,054*
M-Status	P<0,001	MUC1	P=0,019
R-Status	P<0,001	HSP90	P=0,018
		Extrahepat. Fernmetastasen	P=0,001
		Alter (mean)	P=0,254
		Geschlecht	P=0,163
		R-Status	P=0,63

Tabelle 38: Variablen für die Cox-Regression. \*Im Wilcoxon-Test signifikanter P-Wert (nicht in dieser Tabelle gezeigt).

signifikanten Variablen, abgesehen von den unberücksichtigten Faktoren (L, V, Pn, BRAF), verwendet werden.

Im Rahmen der Analyse des Patientenkollektivs wurde zunächst die Cox-Regression aus den klinisch-pathologischen Faktoren zusammen mit den molekularbiologischen Markern BRAF und KRAS berechnet (Ergebnis s.o.). Nun folgt die Berechnung der tumorbiologischen Variablen. Hier flossen, entweder als Einzel- oder als Doppelmarker, aber niemals mehrfach, die in *Tabelle 38* aufgeführten Variablen in die Cox-Regression ein.

### 3.5.4.3 Cox-Regression im Kollektiv der Primärtumore

Im Rahmen der Regressions-Analyse fiel die besondere Relevanz des Biomarkers HSP90 auf. Dieser war an zwei Dritteln der Doppelmarkern beteiligt (MUC1/HSP90 und CD44v6/HSP90) und spielte auch als Einzelfaktor in vielen Berechnungen eine wichtige Rolle. Dies machte ihn zum stärksten unabhängigen Biomarker im untersuchten Panel. Von den klinisch-pathologischen Variablen waren der M-Status und der R-Status stets die stärksten Faktoren. Zunächst wurde die Cox-Regression für die Einzelmarker berechnet. Unter den Einzelmarkern war HSP90 mit  $p=0,012$  (Odds Ratio 4,037; 95%-KI 1,356-12,023) gemeinsam mit den Variablen M-Status  $p<0,001$  (Odds Ratio 16,854; 95%-KI 5,06-56,142) und R-Status  $p=0,04$  (Odds Ratio 4,262; 95%-KI 1,07-16,981) signifikant (siehe *Tabelle 39*).

Die Analyse des Doppelmarkers CD44v6/HSP90 ergab einen signifikanten M-Status mit  $p<0,001$  (Odds Ratio 16,315; 95%-KI 4,972-53,539), einen signifikanten R-Status mit  $p=0,037$  (Odds Ratio 4,361; 95%-KI 1,09-17,446) und den Marker CD44v6/HSP90 mit  $p=0,004$  (Odds Ratio 4,932; 95%-KI 1,683-14,449).

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
M-Status	<0,001	16,854	5,06	56,142
R-Status	0,04	4,262	1,07	16,981
HSP90	0,012	4,037	1,356	12,023

*Tabelle 39: Cox-Regression bei den Primärtumoren, nur Einzelmarker: CD44v6, HSP90, MUC1, HGFR und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, N-Status, M-Status und R-Status.*

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
M-Status	<0,001	16,315	4,972	53,539
R-Status	0,037	4,361	1,09	17,446
CD44v6/HSP90	0,004	4,932	1,683	14,449

Tabella 40: Cox-Regression bei den Primärtumoren: Doppelmarker CD44v6/HSP90 und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, N-Status, M-Status, R-Status und MUC1.

Die Cox-Regression für CD44v6-mono und HGFR-mono, mit allen in der Tabelle genannten Kontrollvariablen, entsprach im Ergebnis der Testung der Einzelmarker (siehe *Tabella 39*). Auch der Doppelmarker CD44v6/HGFR zeigte keine weiteren oder neuen Ergebnisse. Wurde HSP90 aus der Rechnung entfernt, änderten sich die Werte der anderen Variablen. *Tabella 41* zeigt das veränderte Ergebnis mit signifikanten P-Werten für den M-Status  $p=0,003$  (Odds Ratio 5,845; 95%-KI 1,816-18,813), den R-Status  $p=0,009$  (Odds Ratio 7,954; 95%-KI 1,693-37,36), den N-Status  $p=0,05$  (Odds Ratio 3,037; 95%-KI 1,002-9,203) sowie für den Marker CD44v6/HGFR mit  $p=0,023$  (Odds Ratio 3,919; 95%-KI 1,204-12,76).

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
M-Status	0,003	5,845	1,816	18,813
R-Status	0,009	7,954	1,693	37,36
N-Status	0,05	3,037	1,002	9,203
CD44v6/HGFR	0,023	3,919	1,204	12,76

Tabella 41: Cox-Regression bei den Primärtumoren: Doppelmarker CD44v6/HGFR ohne HSP90. Alle anderen Kontrollvariablen (Alter, Geschlecht, N-Status, M-Status, R-Status und MUC1) sind in die Berechnung eingegangen.

Auch bei der Betrachtung des dritten Doppelmarkers, MUC1/HSP90, fiel die Dominanz von HSP90 auf. Zusammengefasst ergeben sich relevante Werte für den M-Status mit  $p<0,001$  (Odds Ratio 12,996; 95%-KI 4,198-40,232), den R-Status mit  $p=0,023$  (Odds Ratio 5,014; 95%-KI 1,246-20,172) und den Doppelmarker MUC1/HSP90 mit  $p=0,006$  (Odds Ratio 5,453; 95%-KI 1,61-18,47).

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
M-Status	<0,001	12,996	4,198	40,232
R-Status	0,023	5,014	1,246	20,172
MUC1/HSP90	0,006	5,453	1,61	18,47

Tabella 42: Cox-Regression bei den Primärtumoren: Doppelmarker MUC1/HSP90 und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, N-Status, M-Status, R-Status und CD44v6.

### 3.5.4.4 Cox-Regression im Kollektiv der Lebermetastasen

Für die Durchführung der Cox-Regression im Kollektiv der Lebermetastasen wurden, aufgrund der Tumorbiologie und den vorhandenen klinisch-pathologischen Faktoren, mehr Biomarker und andere Kontrollvariablen verwendet als für die Analyse der Primärtumoren. Eine Übersicht über alle verwendeten Variablen bietet *Tabelle 38*.

Das Grading wurde trotz des signifikanten Überlebensunterschiedes im Kaplan-Meier-Schätzer nicht in der Analyse berücksichtigt, da sich im Kollektiv eine Interaktion mit dem Biomarker HSP90 gezeigt hatte. Bereits im Fisher-Test war eine hochsignifikante Korrelation zwischen HSP90 und dem Grading aufgefallen, sodass, durch die wechselseitige Beeinflussung, nur einer der beiden Faktoren in die Cox-Regression aufgenommen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde HSP90 bevorzugt, da es als therapeutisch relevantes Zielmolekül für die Fragestellung der Arbeit eine höhere Relevanz in Bezug auf neue Therapieoptionen besaß. Das Grading war hingegen nicht im Sinne therapeutischer Maßnahmen beeinflussbar und für die eigentliche Fragestellung weniger interessant.

Im ersten Schritt zur Analyse der Daten wurden wiederum die Einzelfaktoren zusammen mit den klinisch-pathologischen Faktoren berechnet. Hierbei ergaben sich folgende signifikante Variablen: Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen  $p=0,003$  mit einer Odds Ratio von 3,018 (95%-KI 1,471-6,193), MUC1 mit  $p=0,001$  und einer Odds Ratio von 4,367 (95%-KI 1,845-10,333) und HSP90 mit  $p=0,021$  und einer Odds Ratio von 2,372 (95%-KI 1,137-4,948) Die Ergebnisse sind in *Tabelle 43* dargestellt.

	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,003	3,018	1,471	6,193
MUC1	0,001	4,367	1,845	10,333
HSP90	0,021	2,372	1,137	4,948

*Tabelle 43: Cox-Regression bei den Lebermetastasen, nur Einzelmarker: CD44v6, HSP90, MUC1 und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, extrahepatische Fernmetastasen und R-Status.*

Durch die Signifikanz von MUC1 und HSP90 als Einzelmarker, ergab sich auch für die Doppelmarker, die in den meisten Fällen einen der beiden Einzelmarker enthielten, weitere signifikante Ergebnisse. Als Biomarker mit der größten Relevanz traten wieder MUC1, HSP90 und CD44v6 besonders hervor (siehe *Tabelle 44*). Bei der Testung des Doppelmarkers CD44v6/MUC1 waren, neben eben dieser Variable mit  $p=0,002$  (Odds Ratio 3,502; 95%-KI

1,596-7,683), der Biomarker MUC1 mit  $p=0,001$  (Odds Ratio 4,053; 95%-KI 1,744-9,422) und das Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen mit  $p=0,003$  (Odds Ratio 3,021; 95%-KI 1,464-6,23) signifikant. Die Analyse des Doppelmarkers CD44v6/MUC1, zusammen mit den klinisch-pathologischen Faktoren, ergab folgende Variablen: extrahepatische Fernmetastasen  $p=0,006$  (Odds Ratio 2,68; 95%-KI 1,332-5,391), CD44v6/MUC1  $p=0,002$  (Odds Ratio 4,014; 95%-KI 1,652-9,751) und HSP90  $p=0,032$  (Odds Ratio 2,192; 95%-KI 1,072-4,485). Durch das Zusammenfügen von MUC1 und HSP90 wurden diese nicht mehr als einzelne Faktoren, im Sinne der Kontrollvariablen, mitgetestet. Somit ergab sich bei der Cox-Regression für den Doppelmarker: MUC1/HSP90  $p=0,002$  (Odds Ratio 13,986; 95%-KI 2,676-73,085) und das Vorhandensein von extrahepatischen Fernmetastasen  $p=0,009$  (Odds Ratio 2,514; 95%-KI 1,263 -5,005). Einschränkend sollte hier bemerken werden, dass der Doppelmarker MUC1/HSP90 nur  $n=3$  positive Patienten enthielt.

<b>CD44v6/HSP90</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,003	3,021	1,464	6,23
MUC1	0,001	4,053	1,744	9,422
CD44v6/HSP90	0,002	3,502	1,596	7,683
<b>CD44v6/MUC1</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,006	2,68	1,332	5,391
HSP90	0,032	2,192	1,072	4,485
CD44v6/MUC1	0,002	4,014	1,652	9,751
<b>MUC1/HSP90 (n=3)</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,009	2,514	1,263	5,005
MUC1/HSP90	0,002	13,986	2,676	73,085

*Tabelle 44: Cox-Regression bei den Lebermetastasen, Doppelmarker CD44v6/HSP90, CD44v6/MUC1 und MUC1/HSP90 und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, extrahepatische Fernmetastasen R-Status und ggf. CD44v6, MUC1, HSP90.*

Weitere signifikante Ergebnisse ergab die Kombination von MUC1 mit rpS6 und IGF1R sowie der Marker IGF1R/HSP90. Diese sind in der *Tabelle 45* aufgeführt. Neben dem Biomarker

MUC1/rpS6 mit  $p=0,017$  (Odds Ratio 3,763; 95%-KI 1,261-11,223) war in dieser Konstellation nur das Vorhandensein extrahepatischer Metastasen mit  $p=0,001$  (Odds Ratio 3,075; 95%-KI 1,562-6,056) signifikant. Bei MUC1/IGF1R war das Vorhandensein extrahepatischer Metastasen mit  $p=0,003$  (Odds Ratio 3,059; 95%-KI 1,478-6,329), der Einzelmarker HSP90 mit  $p=0,04$  (Odds Ratio 2,122; 95%-KI 1,036-4,344) und der untersuchte Marker selbst mit  $p=0,004$  (Odds Ratio 3,752; 95%-KI 1,522-9,245) signifikant. Die Regressionsanalyse des Doppelmarkers IGF1R/HSP90 ergab schließlich für das Vorhandensein extrahepatischer Metastasen  $p=0,009$  (Odds Ratio 2,734; 95%-KI 1,287-5,807), für MUC1 als Einzelmarker  $p=0,001$  (Odds Ratio 4,007; 95%-KI 1,725-9,307) und für IGF1R/HSP90  $p=0,03$  (Odds Ratio 2,371; 95%-KI 1,086-5,177).

<b>MUC1/rpS6</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,001	3,075	1,562	6,056
MUC1/rpS6	0,017	3,763	1,261	11,223
<b>MUC1/IGF1R</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,003	3,059	1,478	6,329
HSP90	0,04	2,122	1,036	4,344
MUC1/IGF1R	0,004	3,752	1,522	9,245
<b>IGF1R/HSP90</b>				
	P	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	
			unterer	oberer
Extrahep. Fernmetastasen	0,009	2,734	1,287	5,807
MUC1	0,001	4,007	1,725	9,307
IGF1R/HSP90	0,03	2,371	1,086	5,177

*Tabelle 45: Cox-Regression bei den Lebermetastasen, Doppelmarker MUC1/rpS6, MUC1/IGF1R und IGF1R/HSP90 und die Kontrollvariablen Alter, Geschlecht, extrahepatische Fernmetastasen R-Status und ggf. CD44v6, MUC1, HSP90.*

Die Ergebnisse der übrigen Doppelmarker CD44v6/HGFR, CD44v6/IGF1R und HGFR/HSP90 entsprachen den in *Tabelle 43* gezeigten Einzelmarkern, ohne das Auftreten weiterer oder neuer signifikanter Zusammenhänge.

### 3.6 Subgruppenanalyse

Für die gesonderte Betrachtung von therapie relevanten Patientengruppen wurden Subgruppen mit speziellen, prognoserelevanten Merkmalen gebildet. Ziel der Analyse war es, Gruppen zu identifizieren, die beispielsweise eine schlechtere Prognose als das Gesamtkollektiv aufwiesen oder mit etablierten Therapien bisher nicht ausreichend effektiv behandelt werden konnten. Folgende Gruppen wurden gebildet:

- KRAS mutiert (Primärtumor, n=31)
- Lokalisation: Rechts- und linksseitiges Kolonkarzinom (Primärtumor, n=42 / n=47)
- Alter: Junge (bis 60 Jahre) und alte (ab 75 Jahre) Patienten (Primärtumor, n=22 / n=17)
- Schlecht differenzierte Tumoren mit Grading G3 und G4 (Primärtumor, n=32)
- Patienten mit multiplen Lebermetastasen (Lebermetastasen, n=30)

Die Analyse dieser Subgruppen ergab nur eine geringe Einflussnahme der Biomarker in den jeweiligen Konstellationen. Dies war unter anderem dem Umstand geschuldet, dass die Gruppengrößen, im verkleinerten Kollektiv der Subgruppe, teilweise auf einstellige Zahlen abnahmen und somit an Aussagekraft verloren. Die gesamten Ergebnisse befinden sich in tabellarischer Form im Anhang.

Besonderes Augenmerk verdiente der, trotz kleiner Fallzahl (n=4), bestehende Zusammenhang zwischen BRAF-positiven Tumoren und dem Grading bei den jungen

Subgruppe	n	Faktoren	P
Junge Patienten (Alter bis 60 Jahre)	22	BRAF vs. Grading	0,005
Rechtsseitige Tumoren	42	MUC1 vs. Geschlecht	0,027
	42	HGFR vs. Tumordurchmesser	0,032
KRAS positive Tumoren	31	MUC1 (Kaplan-Meier)	0,036

Tabelle 46: Tabellarische Darstellung des Exakten Test nach Fisher innerhalb der beschriebenen Subgruppen.

Patienten (p=0,005), da alle BRAF-positiven Gewebeproben ein höheres Grading aufwiesen. Zudem korrelierte bei den rechtsseitigen Tumoren der Faktor MUC1 mit dem weiblichen Geschlecht (p=0,027) und HGFR mit einem größeren Tumordurchmesser (p=0,032). In der Gruppe der KRAS positiven Tumore war MUC1, im Gegensatz zum Gesamtkollektiv, mit einem schlechteren Überleben assoziiert (p=0,036).

Die Details der Subgruppenanalyse inklusive Log-Rank-Test sind im Anhang (Abschnitt 5.3.10) in tabellarischer Form dargestellt.

## 4 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Ziele formuliert, mit denen nun in die Diskussion eingeleitet werden soll. Zusammengefasst war das Ziel therapierelevante Biomarker zu identifizieren und deren Zusammenwirken zu untersuchen sowie Patientengruppen mit hohem Bedarf an neuen Therapiestrategien zu definieren. Um diese Ziele zu erreichen, wurden Verfahren zur immunhistologischen Färbung, zur molekularbiologischen Analyse und die Erhebung der Nachsorgedaten genutzt. Daraus ergaben sich drei Hauptergebnisse, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1. Die Veränderungen der Tumorbiologie zwischen Primarius und der daraus entstehenden Lebermetastase lassen sich durch die jeweils unterschiedlichen Ausprägungsmuster der Biomarker zeigen. Zum einen geschieht dies durch den Verstärkungseffekt der Doppelmarker im Vergleich zu den beteiligten Einzelmarkern, welcher praktisch nur beim Primärtumor auftritt (Unterschied  $p=0,08$ ; siehe *Kapitel 3.5.2.5*), zum anderen unterscheiden sich die Expressionsmuster der beiden Entitäten deutlich voneinander.

Obwohl der Unterschied beim Verstärkungseffekt der Doppelmarker nicht signifikant ist, was am Ehesten auf die kleine Fallzahl zurückzuführen ist, zeigt sich mit  $p=0,08$  dennoch ein Trend. Diese Lesart wird bei der näheren Betrachtung der reinen Zahlen (Doppelmarker mit höherem Signifikanzniveau als bei den beteiligten Einzelmarkern: 18/4 (Primaria) und 8/7 (Metastasen)) unterstützt.

Die Unterschiede im Expressionsmuster werden an dieser Stelle exemplarisch am Biomarker MUC1 dargestellt: Dieser korreliert im Kollektiv der Primärtumore nur mit IGF1R als einzigem Biomarker. Zudem ist die Korrelation invers. Im Kollektiv der Lebermetastasen liegen vier signifikante Korrelationen von MUC1 mit anderen Biomarkern (CD44v6, HGFR, rpS6 und HLADR) vor. Daraus ergibt sich aus tumorbiologischer Sicht eine völlig andere Tumorentität.

Die beschriebenen Veränderungen zwischen Primärtumor und Lebermetastase lassen sich mit einer Weiterentwicklung der Tumorbiologie erklären. Während es also im Genotyp kaum zu Veränderungen bei der Entwicklung der Lebermetastasen aus dem Primarius kommt, Petaccia de Macedo et al. zeigen die Homogenität des

Mutationsstatus beider Gewebe [128], scheint der Phänotyp häufig große Unterschiede aufzuweisen. Mao et al. haben neben dem Mutationsstatus auf molekularer Ebene die PTEN-Expression verglichen und dabei eindeutige Unterschiede zwischen Primarius und korrespondierender Metastase in Bezug auf den Phänotyp nachgewiesen, während der Genotyp sich kaum veränderte [129]. In weiteren Publikationen wird dieser Prozess ebenfalls bestätigt: So gehen beispielsweise Slesser et al. in ihrem Review trotz der in vielen Fällen geringen Qualität der Studien davon aus, dass sich nur einige spontanmutierte Zellen an die neue Umgebung (micro-environment) in der Leber adaptieren können, was mit einer veränderten Zellbiologie einhergehen muss [130].

Aus den dargestellten Zusammenhängen lässt sich in einem weiteren Schritt ableiten, dass die Mutationsanalyse mittels Next-generation-sequencing bei der Untersuchung von Lebermetastasen, vielleicht von Metastasen im Allgemeinen, möglicherweise keine neuen tumorrelevanten Erkenntnisse gewähren kann.

2. Der weit überdurchschnittliche Nachsorgezeitraum von ca. zehn Jahren wurde in dieser Arbeit bewusst gewählt, um die Einflüsse der Biomarker in einem langen Zeitraum zu beobachten. Letztlich zeigt sich, dass der Nachsorgezeitraum von fünf Jahren, der bereits in vielen Studien [131-136] untersucht wurde, vollkommen ausreichend ist. Dennoch besteht ein bemerkenswerter Unterschied zwischen dem Überleben von Patienten mit Primärtumoren im Vergleich zu Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen. Patienten mit Überexpression einiger Biomarker in den Lebermetastasen zeigen ein signifikant schlechteres Überleben: CD44v6 (Logrank:  $p=0,054$ / Wilcoxon:  $p=0,006$ ), MUC1 (Logrank:  $p=0,019$ / Wilcoxon:  $p=0,007$ ) und HSP90 (Logrank:  $p=0,018$ / Wilcoxon  $p=0,019$ ). Darüber hinaus sind die Verläufe der Kaplan-Meier-Kurven bei diesen Patienten innerhalb der ersten Monate besonders steil und nähern sich im späteren Verlauf der Vergleichskurve an. Aus diesem Zusammenhang kann geschlossen werden, dass eine möglichst frühe und äußerst wirkungsvolle Therapie erforderlich ist, um Verbesserungen in dieser Subgruppe zu ermöglichen.

3. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Bedeutung der dualen Inhibition. Auch bei anderen Tumorentitäten des Gastrointestinaltrakts wird bereits über die gleichzeitige Inhibition mehrerer Zielmoleküle diskutiert [137-141]. Die Therapieansätze in den verfügbaren Studien verfolgen verschiedene Primärziele: Neben besserem Therapieansprechen versuchen die Autoren die Toxizität durch Dosisreduktion zu vermindern oder Resistenzen zu umgehen.

Auch in der vorliegenden Arbeit haben sich durch den Vergleich von Einzel- und Doppelmarkern viele Hinweise auf das komplexe Zusammenwirken der überexprimierten Biomarker ergeben. So sind erst durch die Betrachtung der Doppelmarker aus MUC1 und den Wachstumsfaktoren wichtige Korrelationen in Bezug auf das Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen entstanden (MUC1/HGFR vs. UICC-Stadium:  $p=0,007$ ; MUC1/IGF1R vs. UICC-Stadium  $p=0,016$ ). In ähnlicher Weise trat die Überexpression von HSP90 als wichtigster Einflussfaktor auf das Überleben in den Vordergrund.

Auch wenn mit bisher verfügbaren Mitteln nicht in allen Konstellationen eine verbesserte Therapie, ein besseres Therapieansprechen und ein rezidivfreies Überleben erreicht werden kann, reicht das Spektrum möglicher Therapieansätze durch einen zweiten Inhibitor von adjuvanten Effekten auf das gleiche Zielmolekül über die komplette Blockade eines weiteren Signalwegs bis zur Modulation der Resistenzentwicklung. In Zukunft ist durch die voranschreitende Entwicklung möglicherweise auch eine Dreifach-Inhibition denkbar, die eines Tages in der gänzlich individualisierten und auf das Biomarkerprofil des jeweiligen Tumors zugeschnittenen Therapie münden könnte.

## 4.1 Die Entwicklung der Doppelmarker

In der Einleitung wurde bereits auf die komplexen Zusammenhänge in der Signaltransduktion und die Interaktion der einzelnen Biomarker eingegangen. Diesen Interaktionen wird auch mit dem zunehmenden Aufkommen von Doppelhemmungsstrategien in internationalen Studien Rechnung getragen, wie Beispiele in den folgenden Kapiteln der Diskussion zeigen. Durch den in der Regel eingeschränkten Wirkungsgrad einzelner Biomarkerinhibitoren kann man leicht zu der Strategie übergehen, einen zweiten und gegebenenfalls auch einen dritten Biomarker im Tumor zu hemmen um, je nach Expressionsprofil, eine möglichst effektive und angepasste Tumorthherapie zu entwickeln. Die möglichen positiven Effekte einer Doppelhemmungsstrategie wären:

- Resistenzmechanismen zu vermeiden oder gegebenenfalls zu überwinden
- Synergistische und/oder additive Therapieeffekte zu nutzen
- Verringerung der toxischen Effekte durch eine Dosisreduktion der einzelnen Therapeutika bei kombinierter Anwendung

Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Anhalt für die Sinnhaftigkeit einer solchen Mehrfachhemmungsstrategie. Dennoch bleiben viele Fragen zu den Auswirkungen einer mehrfachen Biomarkerinhibition auf Tumorbiologie, Prognose und Prädiktivität offen und bedürfen weiterer Studien mit größeren Patientenkollektiven.

## 4.2 Das Patientenkollektiv

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv ist aufgrund der Aufgabenstellung und der Auswahl der Methoden mit  $n=148$  untersuchten Tumoren bei 144 Patienten als eher klein einzuschätzen. Dennoch ist es im Vergleich mit anderen Studien [76-83], welche größere Patientenpopulationen untersucht haben, in Bezug auf klinisch-pathologische Faktoren und auf die untersuchten Biomarker, in Häufigkeiten und Verteilung zum größten Teil übereinstimmend. In der Gegenüberstellung der erhobenen Daten mit den genannten Studien sind die Daten stets vergleichbar und somit repräsentativ. Dies bedeutet, dass das Kollektiv und die darin untersuchten Biomarker die klinische Situation zuverlässig abbilden.

### 4.2.1 Primärtumore

Das durchschnittliche Alter der Patienten lag im Kollektiv der Primärtumoren bei 68,1 Jahren und unterschied sich damit kaum von Studienpopulationen von Zarcos-Pedrinaci et al. und anderen [76-79, 81, 82]. Mit einer leichten Überzahl an männlichen Patienten (56,2%) glichen die untersuchten Patienten den oben genannten Gruppen. Der R-Status, als wichtiger prognostischer Faktor und Indikator für eine wirkungsvolle chirurgische Therapie, lag mit 95,5% an R0-Resektionen in einem verhältnismäßig guten Bereich. Als weiterer therapierelevanter Faktor fand sich im bearbeiteten Kollektiv, wie auch in vergleichbaren Studien [76-78, 81], meist ein weiter fortgeschrittenes Tumorleiden mit einem konsekutiv höhergradigen TNM-Stadium. Die Verteilungshäufigkeit der Mutationen im KRAS- und BRAF-Gen lag ebenfalls im Bereich der großen Studien wie beispielsweise der NORDIC-VII-Studie [80]. Sie fanden sich bei 34,8% (KRAS), respektive bei 11,2% (BRAF), der untersuchten Primärtumoren.

Für die Prüfung der Unabhängigkeit der klinisch-pathologischen Variablen, inklusive BRAF und KRAS, wurde eine Cox-Regressions-Analyse, zunächst ohne die in der Folge untersuchten Biomarker, durchgeführt. Hier kristallisierten sich die starken Einflussfaktoren M-Status ( $n=14$ ), BRAF ( $n=10$ ) und R-Status ( $n=4$ ), letzterer mit  $p=0,056$  gerade nicht mehr im signifikanten Bereich, für die Primärtumoren heraus (*Tabelle 35*). Diese Faktoren zeigten eine eingeschränkte Prognose an und waren somit die stärksten Einflussfaktoren auf das tumorbedingte Überleben. Dieser Umstand spiegelte sich an vielen Stellen in der Literatur [9,

41, 84] wider und unterstrich ihre Wichtigkeit sowie die Übertragbarkeit des in dieser Arbeit untersuchten Kollektivs.

Durch die Zusammenfassung zweier Biomarker zu einer gemeinsamen Variablen, dem Doppelmarker, kam es jedoch zu einem interessanten Verstärkungseffekt bei vielen Korrelationen, der teilweise vollkommen neue Zusammenhänge erbrachte. Dies geschah auch in Fällen, in denen die beiden Biomarker unabhängig voneinander keine signifikante Korrelation ergaben. Zeigte einer der Faktoren eine positive Korrelation, kam es in den meisten Fällen zu Verstärkungseffekten durch den Zusammenschluss, obwohl der zweite Biomarker allein keinen signifikanten Wert ergeben hatte (siehe *Tabelle 47*).

Faktor	CD44v6/ MUC1	CD44v6	MUC1
pN 1-2	0,012	1,0	0,02
L 1	0,045	0,377	0,382
UICC III-IV	0,048	0,825	0,027
IGF1R ≥80%	0,011	0,653	0,023
Tumor rechts	0,089	0,004	0,508
Faktor	CD44v6/ HSP90	MUC1	HSP90
G 3-4	0,026	0,021	0,131
V	0,049	1,0	0,066
HGFR	0,036	0,801	0,01
BRAF	0,036	0,484	0,654
Faktor	MUC1/ IGF1R	MUC1	IGF1R
pN 1-2	0,031	0,02	1,0
M 1	0,041	0,243	0,553
UICC III-IV	0,016	0,027	1,0
CD45 im BG	0,019	0,826	0,124

Faktor	MUC1/ HSP90	MUC1	HSP90
Tu >4,7cm	0,022	0,378	0,806
L 1	0,035	0,382	0,177
R	0,05	0,789	0,368
CD44v6 ≥50%	0,047	0,649	0,073
BRAF pos.	0,043	0,485	0,112
HGFR	0,192	0,615	0,01
Faktor	MUC1/ HGFR	MUC1	HGFR
Tu >4,7cm	0,014	0,378	0,145
N 1-2	0,006	0,02	1,0
UICC III-IV	0,007	0,027	0,803
CEA	0,014	0,118	1,0
Faktor	IGF1R/ HSP90	IGF1R	HSP90
V 1	0,013	0,204	0,066
L 1	0,416	0,042	0,177
KRAS	0,363	0,04	0,449

*Tabelle 47: Primärtumore: Verstärkungseffekte durch die Verwendung der Doppelmarker, Berechnung der Korrelation mittels Exaktem Test nach Fisher (P-Werte). Vielfach sind beide Einzelmarker nicht oder nur schwach Signifikant, während die Doppelmarker ein deutlich höheres Signifikanzniveau aufweisen.*

Signifikante Unterschiede im tumorbedingten Überleben zeigten sich außer bei den oben genannten klinisch-pathologischen Faktoren bei den Doppelmarkern. Diese traten hauptsächlich bei einer Beteiligung der Faktoren CD44v6 oder HSP90 in Erscheinung. Die

beiden Biomarker waren letztlich an allen im Log-Rank- beziehungsweise Wilcoxon-Test signifikanten Doppelmarkern beteiligt:

- MUC1/HSP90  $p= 0,034$  /  $p= 0,015$  (Wilcoxon)
- CD44v6/HSP90  $p= 0,031$
- CD44v6/HGFR  $p= 0,048$
- CD44v6/IGF1R  $p= 0,039$  (Wilcoxon)

Eine weitere Besonderheit bei der Analyse des tumorbedingten Überlebens ergab sich durch den, relativ zu anderen Studien, längeren Nachsorgezeitraum. Dabei fiel auf, dass sich je nach Testverfahren unterschiedliche Aussagen ergaben: Beispielsweise unterschieden sich im Log-Rank-Test Tumoren mit Expression von CD44v6/IGF1R nicht signifikant von Doppelmarker-negativen Tumoren über den gesamten Nachsorgezeitraum von bis zu 110 Monaten. Betrachtete man allerdings den Wilcoxon-Test, dessen Fokus sich auf dem vorderen Teil der Kaplan-Meier-Kurve, also auf das erste Drittel des Nachsorgezeitraums, richtet, ergab sich ein signifikanter Unterschied.

Das Korrelat der sich im zeitlichen Verlauf abschwächenden Werte des Langzeit-follow-ups (Log-Rank-Test), zu Gunsten des Wilcoxon-Tests, war in einer erneuten beziehungsweise späten Annäherung oder Kreuzung der Überlebenskurven zu sehen. Dies wies für den langfristigen Verlauf, also über den normalen Nachsorgezeitraum von fünf Jahren hinaus, auf eine Abschwächung oder Aufhebung des Einflusses der jeweiligen Faktoren hin. Da dieses Phänomen vorrangig bei den Lebermetastasen auftrat, werden die daraus resultierenden Implikationen im nächsten Kapitel behandelt.

#### 4.2.2 Lebermetastasen

Patienten mit Lebermetastasen waren mit einem durchschnittlichen Alter von 62,6 Jahren in der Regel etwas jünger als Patienten mit nicht metastasiertem Tumor. Auch hier zeigte sich eine Überzahl an männlichen Patienten (62,7%). Im untersuchten Kollektiv lagen die R0-Resektionen bei 79,7%.

Die Mutationsanalyse ergab KRAS-Punktmutationen bei 36,2% der untersuchten Lebermetastasen. Eine Mutation im BRAF-Gen wurde nur bei einem einzigen Patienten detektiert (1,7%) und deshalb von der weiteren Analyse und Statistik ausgeschlossen.

Die Berechnung der Kreuztabellen mit dem Exakten Test nach Fisher ergab bei den Lebermetastasen deutlich mehr signifikante Korrelationen als bei den Primärtumoren. Auch hier waren an nahezu allen Korrelationen die Biomarker CD44v6, MUC1 oder HSP90 beteiligt. HSP90 korrelierte dabei vornehmlich mit klinisch-pathologischen Daten (Grading undifferenziert:  $p=0,006$ , extrahepatische Fernmetastasen:  $p=0,023$ , Chemotherapie neoadjuvant:  $0,046$ ), während bei MUC1 der Zusammenhang mit der Überexpression tumorbiologischer Marker (HGFR:  $p=0,013$ , CD44v6:  $p=0,03$ , HLADR  $P=0,022$ , rpS6:  $p=0,033$ ) im Vordergrund stand. Die CD44v6-Überexpression war außerdem mit der Tumorgröße korreliert ( $p=0,026$ ). Daraus ergibt sich für HSP90 eher eine Rolle als Einflussfaktor bei fortgeschrittenem Tumorleiden mit stattgehabter Metastasierung und entdifferenzierten Tumorzellen. MUC1 ist andererseits gemeinsam mit Zelladhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren überexprimiert und ist dadurch direkt an Prozessen des Tumorwachstums und der Metastasierung beteiligt. Aus diesen Zusammenhängen ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Betrachtung einzelner Subgruppen.

Ein wichtiger Unterschied war durch die Gegenüberstellung der einzelnen und der Doppelmarker festzustellen: Anders als bei den Primärtumoren kam es bei den Lebermetastasen nicht zu einer Erhöhung des Signifikanzniveaus oder zu neuen signifikanten Korrelationen. Diese Beobachtung unterstützte die Vermutung nach der die Metastasen bereits eine zum Primarius deutlich veränderte Tumorbiologie entwickelt hatten. Von dieser Tatsache ausgehend sollte zukünftig eine bessere Anpassung der Therapiekonzepte speziell an die Tumorbiologie der Lebermetastasen diskutiert werden.

Die Einzelfaktoren hatten bei den Lebermetastasen einen wesentlich größeren Einfluss auf das Überleben: Neben wenigen klinisch-pathologischen Faktoren war vor allem die Überexpression der Biomarker CD44v6 (Wilcoxon:  $p=0,006$ ), MUC1 (Log-Rank:  $p=0,019$ ) und HSP90 (Log-Rank:  $p=0,018$ ) mit einem signifikant ungünstigeren Überleben verbunden. Wie schon im *Kapitel 3.5.3* erläutert, zeigten die Biomarker bei den Lebermetastasen deutliche Unterschiede im kurz- und langfristigen Verlauf des Nachsorgezeitraums. Einige Variablen verloren im Verlauf des Langzeit-follow-ups von längstens 125,8 Monaten ihren initial vorhandenen signifikanten Überlebensunterschied im Log-Rank-Test, während der Wilcoxon-Test diesen zeigen konnte. Dieser Effekt war bei CD44v6, MUC1 und KI67 zu sehen, während die klinisch-pathologischen Faktoren in beiden Tests größtenteils vergleichbar blieben. Für die

Therapie scheint dieser letztgenannte Umstand wiederum nützlich zu sein, da die klinisch-pathologischen Faktoren, im Gegensatz zu den Biomarkern, keine Therapieziele darstellen.

Unter den Doppelmarkern ergaben die Wachstumsfaktorrezeptoren in Kombination mit CD44v6 oder MUC1, abhängig von der Betrachtung des regulären des langfristigen oder des regulären fünf-Jahres-Nachsorgezeitraums, ebenfalls relevante Unterschiede. Der Wilcoxon-Test war nur bei CD44v6/HGFR ( $p=0,008$ ), CD44v6/IGF1R ( $p=0,017$ ) und MUC1/IGF1R ( $p=0,018$ ) signifikant. Die übrigen Doppelmarker zeigten mit beiden Testverfahren vergleichbare Werte in der Überlebensanalyse. Dabei spielten in der Regel HSP90 mit MUC1 eine wichtige Rolle.

Das Verfahren für die Entwicklung und Durchführung der Cox-Regression entsprach dem Vorgehen bei den Primärtumoren. Die relevanten Faktoren wurden nach den gleichen Kriterien ausgewählt und in einem mehrstufigen Verfahren einzeln und mit den Doppelmarkern analysiert. In allen Berechnungen trat stets das Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen als unabhängiger und prognostisch ungünstiger Faktor hervor. Unter den Einzelfaktoren waren zudem MUC1 und HSP90 prognostisch relevant. Diese beiden Biomarker stellten sich gemeinsam mit CD44v6 in allen Konstellationen als unabhängige Faktoren heraus. An weiteren Variablen waren die Kombinationen von MUC1 und HSP90 mit IGF1R und der Marker MUC1/rpS6 signifikant.

#### 4.2.3 Prognostische Wertigkeit der Biomarker

Als prognoserelevant gelten die in die TNM-Klassifikation einfließenden klinisch-pathologischen Parameter [9, 85, 142, 143]. Dies konnte auch anhand der vorliegenden Daten gezeigt werden, da sich der Zusammenhang des höhergradigen TNM-Status beziehungsweise einer R1/R2-Resektion mit einer schlechteren Überlebensprognose ( $p<0,001$ ) bestätigte. Auch der bereits präoperativ pathologische CEA-Wert war mit einem schlechteren Überleben assoziiert ( $p=0,004$ ).

Unter den analysierten Biomarkern der Primärtumoren trat nur der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR mit einem signifikanten Überlebensunterschied ( $p=0,014$ ) in Erscheinung. Unter den in anderen Studien verfügbaren Ergebnissen zur prognostischen Relevanz der Wachstumsfaktorrezeptoren ist EGFR der am ehesten mit prognostischer Aussagekraft assoziierte Marker [97, 144]. Für die anderen Wachstumsfaktorrezeptoren ist das Bild weniger

Faktor	Gruppe	Log-Rank-Test (P)	Wilcoxon-Test (P)
T-Status	T3-4	0,031	0,046
N-Status	N1-2	0,001	<0,001
M-Status	M1	<0,001	<0,001
R-Status	R1-2	<0,001	<0,001
L-Status	L1	0,002	<0,001
V-Status	V1	<0,001	<0,001
Grading	G3-4	0,127	0,105
CEA	> 3,4ng/ml	0,004	<0,001
EGFR	>50%	0,014	0,018
CD44v6	> 50%	0,109	0,133
HSP90	>50%	0,151	0,148
MUC1	positiv	0,917	0,946
HGFR	>80%	0,212	0,313
IGF1R	>80%	0,752	0,603
rpS6	positiv	0,268	0,511
CD44v6/HGFR	positiv	0,048	0,095
CD44v6/IGF1R	positiv	0,053	0,039
CD44v6/HSP90	positiv	0,031	0,036
MUC1/HSP90	positiv	0,034	0,015

Tabelle 48: Primärtumore: Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank- und Wilcoxon-Test.

eindeutig: Während Peters et al. bei IGF1R Limitationen in der prognostischen Wertigkeit beschreiben [145], sehen Takahari et al. IGF1R im kolorektalen Karzinom als Prognosemarker an [62]. Weitere prognoseorientierte Studien beim kolorektalen Karzinom sind für IGF1R nicht verfügbar. Ähnlich eingeschränkt ist die Studienlage für HGFR: Hier sind lediglich Untersuchungen an Bronchialkarzinomen und Mammakarzinomen verfügbar [146, 147], die eine prognostische Relevanz unter einem patientenkollektivbezogenen Vorbehalt für HGFR beschreiben.

Stellt man den nicht signifikanten einzelnen Biomarkern die Doppelmarker gegenüber, zeigt sich, dass die Beteiligung von CD44v6 und HSP90 meist zu einem signifikanten Überlebensunterschied führt. An dieser Stelle sollte zunächst erläutert werden, dass häufig nicht die Überexpression, sondern die Abnahme der CD44v6-Expression im Tumor mit einer Prognoseverschlechterung einhergeht [148-150]. Nur Ozawa et al. schreiben über die Variante zwei des CD44-Moleküls (CD44v2), dass die Überexpression mit einer schlechteren

Prognose assoziiert ist als die anderer Varianten [151]. In der vorliegenden Untersuchung scheint die CD44v6-Expression in anderer Weise mit der Prognose zusammenzuhängen als dies in den oben genannten Arbeiten publiziert wurde. Zwar ist die CD44v6-Überexpression im Log-Rank-Test nicht signifikant, es kommt aber im Wilcoxon-Test bei den Lebermetastasen zu einem signifikanten Unterschied im Überleben. Ebenso ist CD44v6 primär kein unabhängiger Faktor in der Cox-Analyse, tritt aber im Rahmen der Doppelmarkeranalyse als beteiligter Biomarker auf. Die Einzelheiten, die diesen unterschiedlichen Ergebnissen zu Grunde liegen, müssen in weitere Untersuchungen geklärt werden.

Für die prognostische Wertigkeit des Biomarkers HSP90 im kolorektalen Karzinom liegen keine verwertbaren Aussagen aus internationalen Publikationen vor, während für andere Tumorentitäten (Mamma, Magen, NSCLC) eine eindeutige prognostische Relevanz gezeigt [152-155] wird. Mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich zeigen, dass die HSP90-Überexpression ein unabhängiger Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom ist, der zudem auch als Doppelmarker gemeinsam mit anderen Biomarkern eine prognostische Relevanz hat. Wurde HSP90 in der Cox-Regression nicht berücksichtigt, kam es zu einer Verschiebung der Gewichtung einzelner Faktoren. So trat beispielsweise im Primärtumor bei CD44v6/HGFR zu den stets unabhängigen relevanten Faktoren M-Status und R-Status auch der Nodalstatus mit  $p=0,05$  als weiterer Prognosefaktor hinzu.

Weitere an den signifikanten Korrelationen beteiligte Biomarker sind MUC1 und HGFR. MUC1 wird in vielen Publikationen zum kolorektalen Karzinom [54, 156-158] und anderen Tumorentitäten [159, 160] als prognostischer Marker betrachtet, wobei Lugli et al. betonen, dass MUC1 nur im sporadischen kolorektalen Karzinom prognostische Aussagekraft hat, nicht aber bei hereditären Tumoren [156]. Sinn et al. zeigen in ihrer Arbeit [161], dass MUC1 bei Mammakarzinomen eine Rolle als prädiktiver, aber nicht als prognostischer Marker zukommt. Zusammenfassend ergibt sich eine Bestätigung der Biomarker HSP90 und MUC1 als unabhängige Prognosefaktoren für Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen sowie HSP90 als Prognosefaktor bei den Primärtumoren. Sie nehmen in diesem Sinne auch Einfluss auf die Doppelmarker, allerdings gewinnen beispielsweise die Wachstumsfaktorrezeptoren und CD44v6 in den neuen Konstellationen ein eigenes Gewicht und spielen als Teil der Doppelmarker ebenfalls eine Rolle für die Prognose.

#### 4.2.4 Spezielle Aspekte der prognostischen Wertigkeit bei den Lebermetastasen

Der in dieser Arbeit erreichte Nachsorgezeitraum von bis zu 125,8 Monaten war im Vergleich zu dem üblicherweise angewendeten Fünf-Jahre-Nachsorgeintervall ungefähr doppelt so lang, wodurch eine wesentliche Veränderung im Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven entstand. Erst im späteren Nachsorge- und Krankheitsverlauf, nach mehr als 60 Monaten, zeigte sich eine Annäherung der Überlebenskurven, die bis zu diesem Zeitpunkt kontinuierlich auseinanderwichen. Würde man in dieser Phase der ersten 60 Monate einen Trend für den Verlauf unterstellen, blieben Veränderungen der Kurvenverläufe zueinander im folgenden Zeitraum unerkannt. Auch rein rechnerisch ließ sich diese Veränderung im Kurvenverlauf durch die Anwendung zweier unterschiedlicher Testverfahren (Log-Rank und Wilcoxon) nachweisen.

Der Überlebenszeitanalyse zufolge verstarb ein größerer Anteil der Patienten, 50% (n=36) der tumorbedingt verstorbenen, innerhalb der ersten 26 Monate nach Diagnosestellung, während die Anzahl der tumorbedingten Todesfälle im Kollektiv im weiteren Verlauf abnahm. Damit scheint eine zügig eingeleitete und möglichst radikale Therapie der Lebermetastasen im kurz- bis mittelfristigen Verlauf an Wichtigkeit zu gewinnen. Eine mögliche Empfehlung aus diesen Gegebenheiten könnte demnach lauten, durch möglichst frühe und radikale Therapie, gemäß dem dritten Leitsatz aus der Sepsistherapie „hit hard and early“ (The Tarragona Strategy [162]) den frühen Krankheits- und Therapieverlauf möglichst optimal zu gestalten, um so das Überleben in der kritischen Phase zu verbessern. Im späteren Krankheitsverlauf scheint eine solch radikale Therapie nicht mehr gleich sinnvoll zu sein.

Von den klinisch-pathologischen Faktoren waren lediglich der Durchmesser der größten Metastase mit einer starken Expression von CD44v6 und MUC1 sowie das Grading und das Auftreten extrahepatischer Fernmetastasen mit HSP90 assoziiert. Es zeigte sich somit auch hier die Relevanz dieser Biomarker, deren Aktivität und Überexpression mit dem Ausmaß der Metastasierung und der Differenzierung der Tumorzellen zusammenhängt.

Die Überlebenszeitanalyse mit Log-Rank- und Wilcoxon-Test sowie die Cox-Regression sahen als wichtigste Faktoren stets MUC1 (Log-Rank:  $p=0,019$ ), HSP90 (Log-Rank:  $P=0,018$ ) und, als Prognosefaktor weniger ausgeprägt, CD44v6 (Wilcoxon:  $p=0,006$ ) an. Die weiteren untersuchten Biomarker, insbesondere die Wachstumsfaktorrezeptoren, ergaben als Doppelmarker in Verbindung mit den zuvor genannten stärkeren Markern signifikante

Faktor	Gruppe	Log-Rank-Test (P)	Wilcoxon-Test (P)
Durchmesser	> 3.93 cm	0,158	0,057
Grading	G3	0,008	0,005
Extrahepat. Fernmetastasierung	Ja	0,001	0,024
EGFR	>50%	0,56	0,46
CD44v6	> 50%	0,054	0,006
HSP90	>50%	0,018	0,019
MUC1	positiv	0,019	0,007
HGFR	>80%	0,584	0,396
IGF1R	>80%	0,462	0,55
rpS6	positiv	0,838	0,653
CD44v6/MUC1	positiv	0,011	0,002
CD44v6/HSP90	positiv	<0,001	<0,001
CD44v6/HGFR	positiv	0,087	0,008
CD44v6/IGF1R	positiv	0,098	0,017
CD44v6/rpS6	positiv	0,319	0,186
MUC1/HSP90	positiv	<0,001	<0,001
MUC1/HGFR	positiv	Siehe Einzelmarker MUC1	
MUC1/IGF1R	positiv	0,069	0,018
MUC1/rpS6	positiv	0,038	0,024
HGFR/HSP90	positiv	0,016	0,007
IGF1R/HSP90	positiv	0,003	0,011

Tabelle 49: Lebermetastasen: Kaplan-Meier-Analyse mittels Log-Rank- und Wilcoxon-Test.

Überlebensunterschiede. Der Verstärkungseffekt, welcher bei den Primärtumoren beschrieben wurde, zeigte sich hier nicht. Diese Tatsache unterstützte den Eindruck, dass sich die Tumorbiologie in den Metastasen verändert haben könnte und bedeutete in der Konsequenz veränderte Bedingungen für die Prognose und für mögliche Therapieansätze. Unter den Gesichtspunkten der Tumorbiologie und der Biomarkerexpression ergab sich damit die Frage, in wie weit es sich bei den Lebermetastasen noch um den gleichen (kolorektalen) Tumor handelte.

Als unabhängige Prognosefaktoren waren unter den einzeln analysierten Variablen, ebenso wie unter den Doppelmarkern, neben dem Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen ( $p=0,003$ ), stets MUC1 ( $p=0,001$ ) und HSP90 ( $p=0,021$ ) statistisch signifikant. Dass Fernmetastasen in anderen Organen die Prognose massiv einschränken, ist nicht nur naheliegend, sondern zeigt auch die Validität des untersuchten Patientenkollektivs und der

angewendeten Methoden. Für die Biomarker MUC1 und HSP90 gilt neben ihrer Funktion als Zielmoleküle für die Chemotherapie, dass ihre standardmäßige Erhebung als Prognosemarker für metastasierte kolorektale Karzinome, auf der Grundlage weiterer Forschung, die Entwicklung neuer Prognosescores ermöglichen könnte.

Einschränkend auf die Interpretation der Ergebnisse wirkt sich natürlich die geringere Fallzahl im Kollektiv der Lebermetastasen aus. Durch die Zusammenfassung zweier Marker zu einer neuen Variablen besteht die Gefahr, sehr kleine Fallzahlen pro Gruppe zu generieren. Ein Beispiel dafür ist MUC1/HSP90. Von insgesamt n=59 Patienten sind nur drei Metastasen für beide Marker positiv. Dies führt zur Entstehung einer sehr kleinen Gruppe Doppelmarker-positiver Tumoren, deren Ergebnisse kaum noch auf das Gesamtkollektiv anwendbar sind. Von Interesse bleiben sie allerdings dennoch als mögliche Subgruppe, welche für die Entwicklung einer individualisierten Tumortherapie sehr wohl herangezogen werden kann. Zum anderen zeigt dieses Beispiel mit lediglich drei positiven Patienten, dass bei den Lebermetastasen häufiger eine Überexpression von nur einem dieser beiden Biomarker, also entweder MUC1 (23,7% positive Metastasen) oder HSP90 (32,2% positive Metastasen), vorliegt. Somit ist bei ca. 50% der untersuchten Lebermetastasen mindestens ein prognostisch relevanter Biomarker vorhanden.

### 4.3 Klinischer Bezug der Biomarker im Kontext der aktuellen Literatur

Die aktuell -im Jahr 2018- vorliegende Zahl an klinischen Studien, in welchen Inhibitoren und Antikörper gegen die einzelnen Zielmoleküle untersucht wurden, ist noch relativ klein und sehr heterogen. Viele Inhibitoren befinden sich noch in der Entwicklung und in der klinischen Erprobung, weshalb sich vorwiegend Publikationen zu Studien in Phasen I und II, mit meist eher kleinem Patientenkollektiv, finden. Die darin untersuchten Tumorentitäten reichen von „soliden Tumoren diverser Organe“ über fortgeschrittene kolorektale Karzinome bis hin zu metastasierten kolorektalen Karzinomen und tragen damit zur Heterogenität der Studienlage bei. Problematisch für eine umfassende Analyse erscheint zudem, dass die meisten Studien nur Patienten mit fehlendem Ansprechen auf die First- (oder Second-) Line-Therapie einschließen.

Um dieser fragmentierten und unvollständigen Studienlage gerecht zu werden, ohne die Übersichtlichkeit zu verlieren, wurde die Unterteilung zwischen Primärtumor und Lebermetastasen für die Besprechung der aktuellen Literatur im Folgenden aufgehoben.

Neben Studien, welche die duale Inhibition verschiedener tumorrelevanter Biomarker mit teils etablierten Therapeutika untersuchen, befinden sich viele neuentwickelte Inhibitoren in Zulassungsstudien der Phasen I und II (-III). Um den Stand dieser hoch aktuellen und teilweise noch in Arbeit befindlichen Studien zu erfassen, wurden die Datenbanken der Zulassungsbehörden der EU ([clinicaltrialsregister.eu](http://clinicaltrialsregister.eu)) und der USA ([clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)) nach aktuellen Therapie- und Zulassungsstudien entsprechend des Biomarkerprofils dieser Arbeit durchsucht. Die Suche ergab ein sehr gemischtes Bild an Studienkonzepten, dessen Schwerpunkt vor allem auf den metastasierten Tumorerkrankungen lag. Viele der registrierten Studien waren in der Planungs- oder Rekrutierungsphase aufgrund fehlender Effektivität oder durch Sponsorentscheidung, aber auch ohne Angabe von Gründen gestoppt oder abgebrochen worden. Für andere Studien lagen trotz mehrjähriger Laufzeit noch keine Ergebnisse vor. Der überwiegende Teil der im Folgenden zitierten Studien stammt daher aus bereits abgeschlossenen und publizierten Studien. Für die Recherche wurde die Pubmed-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet.

Mit der gleichzeitigen zielgerichteten Inhibition zweier prognostisch relevanter Tumormarker beim kolorektalen Karzinom wurde vor ca. 10 Jahren an Zelllinien mit einem IGF1R-Inhibitor

begonnen [163]. Im Rahmen der Weiterentwicklung wurden die Therapeutika mit Fokus auf die Signalwege RAS/RAF/MEK/MAPK und PTEN/PI3K/AKT/mTOR [164, 165] entwickelt. Im Einzelnen konnten nicht alle Autoren synergistische Effekte durch eine duale Inhibition nachweisen [166].

In einer Studie aus dem Jahr 2016 wurden schließlich, in einem weiteren Entwicklungsschritt, Pyrimidin-basierte Wirkstoffe (Compounds) synthetisiert, welche neben ihrer primären Funktion als CDK2 (cyclin-dependent kinases 2) - Inhibitoren auch PI3K hemmen [167]. Diese duale CDK2/PI3K-Hemmung zeigte in den untersuchten HCT116- und HT29 – Zellen eine suffiziente Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion, war aber weniger effektiv als der vergleichend verwendete Inhibitor Dactolisib, ein dualer PI3K- und mTOR-Inhibitor.

In den aktuellen Therapiestudien wurde die Wirksamkeit vieler neuer Inhibitoren und „small molekules“ ebenfalls im Rahmen einer Kombinationstherapie beziehungsweise der dualen Hemmung untersucht. Sie werden im Folgenden, bezogen auf den jeweiligen Biomarker, diskutiert.

Die Bewertung der Intensität der Biomarkern entfällt für die abschließende Bewertung und Diskussion, weil die Daten nicht über eine ausreichende Aussagekraft verfügen.

#### 4.3.1 Einzelmarker

Bei der isolierten Betrachtung des Biomarkers CD44v6 ergaben sich zunächst keine relevanten Befunde in der Überlebensanalyse. Der deutlich stärkere Einfluss von CD44v6 in Kombination mit anderen Biomarkern ließ sich bereits bei der Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurve mittels des Wilcoxon-Tests im Kollektiv der Lebermetastasen vermuten. Hier zeigte sich ein signifikant schlechteres Überleben ( $p=0,006$ ) bei CD44v6-positiven Tumoren. Die Prognose für diese Patienten war dementsprechend vor allem in den ersten Monaten schlechter und führte bei gleichzeitigem Auftreten anderer positiver Biomarker, zum Beispiel MUC1 und HSP90, zu einer weiteren Einschränkung der Prognose. Anhalt hierfür gab wiederum die positive Korrelation von CD44v6 mit MUC1 ( $p=0,03$ ) bei den Lebermetastasen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Arbeiten verschiedener Autoren [148-150], die eine Abnahme der CD44v6-Aktivität (downregulation) als Prognosefaktor beschreiben.

Die Korrelation des Biomarkers mit der rechtsseitigen Tumorlokalisierung des Primarius ( $p=0,004$ ) und dem höheren Tumorgrading ( $p=0,021$ ) spielten in diesem Kollektiv eine eher

untergeordnete Rolle. In der Zusammenschau mit der einzigen positiven Korrelation in den untersuchten Lebermetastasen, dem Metastasendurchmesser ( $p=0,026$ ), ergab sich jedoch der Anhalt für den Einfluss von CD44v6 auf schlechter differenzierte und größere Tumore.

Der einzige bisher entwickelte Wirkstoff gegen den Biomarker CD44v6 ist der monoklonale Antikörper Bivatuzumab. Seine Wirksamkeit wurde bisher nicht beim kolorektalen Karzinom, sondern nur beim Mammakarzinom und bei squamösen Kopf- und -Halsneoplasien untersucht [168, 169]. Die Erprobung der klinischen Wirksamkeit wurde nach wenigen Phase I Studien durch den Sponsor beendet. Im Jahr 2017 wurde eine erste Phase I/Ib Studie an soliden Tumoren mit dem neuentwickelten CD44v6-Inhibitor AMC303 begonnen [53]. Die Ergebnisse dieser Studie stehen zum Abgabetermin der vorliegenden Arbeit noch aus.

Ganz aktuell (2019) publizierten Hara et al. die immunhistologische Analyse von CD44v6 und HGFR beim Ösophaguskarzinom [170]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein doppelt-positives Expressionsmuster (CD44v6/HGFR positiv) mit einem negativen Einfluss auf die Prognose assoziiert ist.

In den Ergebnissen von CD44v6 spielt der Biomarker MUC1 durch eine Korrelation untereinander bereits eine Rolle. Neben der oben genannten Korrelation der beiden Biomarker zeigte sich bei MUC1 ein signifikanter Zusammenhang mit dem positiven Nodalstatus ( $p=0,02$ ) beim Primärtumor. Interessanterweise kam es zu inversen Korrelationen mit der Expression des IGF1-Rezeptors ( $p=0,023$ ) im Primärtumor und mit der Expression von HGFR ( $p=0,013$ ) in den Metastasen. Aus diesem inversen Zusammenhang ließ sich postulieren, dass MUC1-positive und IGF1R-positive Patienten zu zwei größtenteils unterschiedlichen Patientensubgruppen gehören, bei denen vollkommen unterschiedliche und unabhängige Signalwege betroffen sein könnten. In diesem Patientenkollektiv ist MUC1/IGF1R tatsächlich weder mit anderen Faktoren korreliert noch mit einem signifikant besseren oder schlechteren Überleben assoziiert. Um weitere Erkenntnisse zur gemeinsamen oder entgegengesetzten Wirkung dieser beiden Biomarker zu gewinnen, sind weitere Arbeiten erforderlich. Eine duale Inhibition scheint in dieser Konstellation zumindest nicht sinnvoll zu sein.

Für die inverse Korrelation von MUC1 und HGFR führen solche Überlegungen nicht weiter, da alle MUC1-positiven Patienten ( $n=14$ ) auch HGFR-positiv sind ( $n=44$ ).

MUC1 als Einzelmarker war in der Überlebensanalyse (Logrank:  $p=0,019$ ) und im Cox-Modell nur im Kollektiv der Lebermetastasen signifikant. Besonders fiel hier das Ergebnis der Cox-

Regression auf. Bei der Analyse des Einflusses der Einzelfaktoren war MUC1 ( $p=0,001$ ), neben dem Vorhandensein extrahepatischer Fernmetastasen ( $p=0,003$ ) und dem Einzelmarker HSP90 ( $p=0,021$ ), signifikant. MUC1 scheint somit als unabhängiger Faktor einen großen Einfluss auf das tumorbedingte Überleben zu haben. Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die aktuelle Studienlage, so entsteht der Eindruck, dass dieser Umstand nicht ausreichend gewürdigt wird. Neben den Arbeiten zur MUC1-Vaccinierung befindet sich lediglich der monoklonale Antikörper Pankomab in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium.

Für Pankomab wiederum liegen, außer einer einzigen Phase I Studie an soliden Tumoren [171], keine Therapie- oder Dosisfindungsstudien bei kolorektalen Karzinomen vor. Der Schwerpunkt der Forschung findet sich hier aktuell beim Ovarialkarzinom, dem Mammakarzinom und dem NSCLC (non small cell lung cancer). Dabei ist Pankomab bisher meist nur als diagnostisches Werkzeug in der Erprobung [172]. Eine mögliche Therapieoption durch Verbindung mit zytotoxischen Komponenten wird bisher lediglich diskutiert [173]. Gleichzeitig wird an der MUC1-Vaccinierung gearbeitet [174-176]. Besonders Lohmueller et al. zeigen auf diesem Gebiet vielversprechende Ansätze [174], die Einführung in klinische Therapiekonzepte scheint aber noch nicht absehbar.

Das Hitzeschockprotein HSP90 korrelierte bei den Patienten mit Primärtumor mit HGFR ( $p=0,01$ ) und bei den untersuchten Lebermetastasen mit höherem Grading ( $p=0,006$ ) und dem Auftreten extrahepatischer Fernmetastasen ( $p=0,023$ ). In weitaus größerem Maße führte die Expression von HSP90 zu einer signifikanten Einschränkung des tumorbedingten Überlebens bei Patienten mit Lebermetastasen (Logrank:  $p=0,018$ ).

Diese außerordentliche Relevanz wurde auch durch die Unabhängigkeit von HSP90 in der Cox-Regression gezeigt. Sowohl für die Expression im Primärtumor als auch für die Expression in den Lebermetastasen konnte für das Hitzeschockprotein ein unabhängiger Einfluss nachgewiesen werden ( $p=0,012$ , respektive  $p=0,021$ ). Im Kollektiv der Primaria waren daneben der M-Status ( $p<0,001$ ) und der R-Status ( $p=0,04$ ) unabhängige Einflussfaktoren. Die Tatsache, dass der M-Status ein höheres Signifikanzniveau im Vergleich zum R-Status zeigte, lag am ehesten an der geringen Zahl der R-positiven Patienten im Kollektiv.

In allen Fällen und unter den verschiedenen Betrachtungsmöglichkeiten, die sich aus dieser Arbeit ergaben, war HSP90 stets der Biomarker, der im Kollektiv der Lebermetastasen am

eindeutigsten und in allen Analysen stets mit statistischer Signifikanz auf eine schlechtere Prognose hinwies. Der sich daraus ergebenden zentralen Rolle für eine zielgerichtete und individualisierte Tumorthherapie wird auch bereits durch die relativ große Zahl an vorhandenen Studien Rechnung getragen. In vielen dieser Therapiestudien spielen Co-Faktoren und die Doppelhemmung eine wichtige Rolle. Deshalb wird der HSP90-Inhibitor Ganetespib auch in der sich anschließenden Besprechung des Wachstumsfaktorrezeptors HGFR aufgegriffen.

Die Therapiestudien mit dem HSP90-Inhibitor Ganetespib ergaben ein sehr heterogenes und wohl eher unvollständiges Bild. Da die verschiedenen Therapiekonzepte mit Ganetespib allenfalls geringe, teilweise auch keine Vorteile für die Therapie beim Lungenkarzinom und beim Pankreaskarzinom zeigten, kam es in einigen Fällen zum Abbruch der Studien aufgrund von fehlender Effektivität [177, 178].

Studien, die Ganetespib und weitere HSP90-Inhibitoren am kolorektalen Karzinom untersuchten, wurden hingegen vorwiegend an Zelllinien vorgenommen: Die Arbeitsgruppe um Nagaraju et al. untersuchte verschiedenste Effekte von Ganetespib auf den Zellzyklus, die DNA-Methylierung sowie die Angiogenese und den Einfluss auf Signalkaskaden an Zelllinien und im Xenograft-Modell [179-182] und konnte stets einen antiproliferativen Effekt nachweisen. Einschränkend ist anzumerken, dass diese Ergebnisse nur auf zellbiologischer Ebene beziehungsweise am Xenograft-Modell getestet wurden und dass es sich bei der Auswahl der Zelllinien um solche mit jeweils hohem Expressionslevel der Zielmoleküle, wie beispielsweise DNMT (DNA-Methyltransferase-Enzyme), handelte. Bei Cercek et al. ergab sich hingegen kein Effekt durch die Monotherapie mit Ganetespib bei insgesamt 17 behandelten Patienten mit therapierefraktären metastasierten Kolonkarzinom [183]. Allerdings ließen sich aus diesem sehr kleinen Kollektiv, ohne eindeutige Ergebnisse, nur schwierig relevante Schlussfolgerungen ziehen. Während He et al. [184] eine verbesserte Sensitivität von HCT116 – Zellen auf Bestrahlung und Therapie mit Fluorouracil durch die Behandlung mit Ganetespib nachwies, fokussierten sich die Arbeitsgruppen von Landmann [185] und Rouhi [186] in ihren Untersuchungen auf Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegen HSP90-Inhibitoren. Landmann et al. korrelierten in ihrer Studie die Expressionslevel von UGT1A, einer UDP-Glucuronosyltransferase, zu deren Aufgaben die Glucuronidierung und Inaktivierung von Medikamenten gehört, mit dem Ansprechen auf Ganetespib [185]. Es konnte gezeigt werden, dass bei Zelllinien mit hoher UGT1A-Expression eine Resistenz gegen Ganetespib vorlag und dass diese primär Ganetespib-resistenten Zelllinien, nach Ausschalten von UGT1A, auf die

Behandlung mit Ganetespib ansprachen. Andererseits wurden Ganetespib-sensitive Zellen durch Hochregulation von UGT1A nicht gegenüber dem Inhibitor resistent. Rouhi et al. erzeugten durch Inkubation mit steigenden Dosen des Purin-basierten HSP90-Inhibitors PU-H71 zunächst resistente Zelllinien und suchten in diesen nach neu aufgetretenen Resistenzmechanismen [186]. Es zeigte sich, dass je nach Zelllinie (A549 - Lungenkarzinom, MDA-MB-231 - Mammakarzinom und SW480 - kolorektales Karzinom) verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen können. Dazu gehörten die Hochregulation von HSP90 in der Zelle, eine Punktmutation im HSP90 $\alpha$ -Gen (Y142N) sowie Veränderungen im Transportprotein MDR1, über welches Purine aus der Zelle befördert werden. Die Entwicklung dieser Resistenzmechanismen könnte bei Patienten auch bereits durch regelrechte Erst- und Zweitlinientherapie begünstigt worden sein, sodass in der Folge eine spätere Behandlung mit einem HSP90-Inhibitor, im Rahmen einer Drittlinientherapie oder Studie, des somit vorselektierten Patientenkollektivs eine geringere beziehungsweise keine messbare Wirkung mehr erzielen könnte. Schließlich untersuchten Rouhi et al. inwiefern die erworbene Resistenz gegen PU-H71 eine Auswirkung auf die Therapie mit anderen HSP90-Inhibitoren haben könnte. Dabei zeigte sich eine Kreuzresistenz der Mamma- und der Kolonzelllinie gegen das Geldanamycin-Derivat Tanespimycin. Ganetespib hingegen konnte die Apoptose unabhängig von der PU-H71-Resistenz induzieren, was unter anderem die Vermutung zuließ, dass Ganetespib kein Substrat des MDR1-Transporters sei. Dieser ist der Studie zufolge für die erworbene Resistenz mitverantwortlich. Mit diesen Ergebnissen wird erneut deutlich, dass sorgfältige Diagnostik und Selektion der Patienten für die individualisierte Chemotherapie erforderlich sind, um Resistenzmechanismen, wie beispielsweise durch den Transport über MDR1, mit einem, in diesem Fall speziellen HSP90-Inhibitor, zu umgehen.

HGFR korrelierte bei Patienten mit Primärtumor lediglich mit HSP90 ( $p=0,01$ ). Dieser Zusammenhang ist für die individualisierte Tumorthherapie von besonderer Bedeutung wie bereits die Arbeiten von Courtin et al. und Miyajima et al. [187, 188] im Rahmen von Doppelhemmungsstudien gegen HGFR und HSP90 gezeigt haben.

Inhibitoren gegen HGFR beziehungsweise das Signalmolekül cMET sind, neben dem bereits erwähnten Rilotumumab, die Therapeutika Crizotinib, Tivantinib und Onartuzumab. Außer der Studie von van Cutsem et al. [189], die für Rilotumumab zwar eine um 10% und damit signifikant bessere ORR (objective response rate) zeigte ohne gleichzeitig das Outcome zu

verbessern, finden sich für diesen Inhibitor nur Studien bei Magen-, Pankreas- und Lungenkarzinomen [190-194]. Darin sind vor allem für Magen- und Pankreaskarzinome dosisabhängige Effekte auf das Gesamtüberleben und eine gute Verträglichkeit bei HGFR-positiven Tumoren beschrieben.

Ein Großteil der Studien zu Tivantinib befasste sich mit hepatozellulären Karzinomen und Lungenkarzinomen. Pant et al. behandelten Tumore des oberen Verdauungstraktes mit einer Kombinationstherapie aus FOLFOX und Tivantinib [195]. Es konnte keine signifikante Verbesserung in Bezug auf das Therapieansprechen oder Überleben erzielt werden. Kolorektale Karzinome unter Therapie mit Tivantinib wurden lediglich in zwei Phase I/II - Studien untersucht [196, 197]. In diesen zeigte sich keine Verbesserung im Outcome bei kolorektalen Karzinomen, wobei Eng et al. einen positiven Effekt in der Subgruppe der HGFR-exprimierenden Tumoren sahen.

In der bisher einzigen Studie zum Einsatz von Onartuzumab beim kolorektalen Karzinom zeigte sich in der Kombinationstherapie mit mFOLFOX-6 keine Verbesserung des Überlebens oder des Therapieansprechens [198]. Weitere Studien [199-201] mit Schwerpunkt auf Lungenkarzinome ergaben keine klaren Hinweise auf die Wirksamkeit des Inhibitors.

Therapiestudien mit Crizotinib, ebenfalls ein HGFR-Inhibitor, fanden sich nahezu ausschließlich für Lungenkarzinome [202, 203]. Die Studien ließen bei ALK-positiven Tumoren gutes Therapieansprechen erkennen. Miyajima et al. untersuchten die duale Hemmung mit Crizotinib und Ganetespib (HSP90-Inhibitor) bei einer Zelllinie des Magenkarzinoms sowie vergleichend einer Lungentumorzelllinie in vitro und am Xenograft-Modell [188]. Es zeigten sich synergistische Effekte durch die Kombinationstherapie mit verstärkter Inhibition der abhängigen Signalwege, signifikant gehemmtem Zellwachstum und vermehrtem Zelltod in der Zellkultur und eine signifikant verbesserte Wachstumshemmung im Xenograft-Modell. Zudem wurde eine überraschend starke Abhängigkeit des MET-Aktivitätsgrades von der Interaktion mit HSP90 nachgewiesen. Auch wenn ein gewichtiger Teil des nachgewiesenen Antitumoreffekts dem Ganetespib zuzuschreiben war, wurde hier eine weitere Kombinationstherapie entwickelt, mit der Resistenzmechanismen einzelner Zielmoleküle, bei gleichzeitiger Nutzung synergistischer Effekte, umgangen werden konnten. Ähnliches wurde auch bereits für Lungenkarzinome berichtet [187]. Die angesprochenen Resistenzmechanismen basieren sowohl auf primärer als auch erworbener Resistenz und erhöhen die Komplexität der Tumorthherapie um ein Vielfaches [204, 205].

Als weiterer Wachstumsfaktorrezeptor wurde IGF1R mit einigen anderen in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren korreliert. Bei Patienten mit Lebermetastasen war dies für EGFR ( $p=0,01$ ) der Fall. Bezogen auf die Primärtumoren bestanden zudem positive Korrelationen mit MUC1 (s.o.) und dem L-Status ( $p=0,042$ ).

Der IGF1R-Inhibitor Dalotuzumab wurde in diversen Phase I Studien bei fortgeschrittenen soliden Tumoren verschiedener Entitäten, aufgeführt in der Übersichtsarbeit von Iams et al. [206] sowie im Rahmen von Kombinationstherapien mit verschiedenen Chemotherapieregimen, Inhibitoren und Antikörpern untersucht. Dazu gehören sowohl weitere Phase I Studien, unter anderen von Brana et al. (Dalotuzumab mit dem NOTCH-Inhibitor MK-0752) [207] und Di Cosimo et al. (Dalotuzumab mit dem mTOR-Inhibitor Ridaforolimus) [208], als auch die Arbeiten von Lamhamedi-Cherradi et al. (IGF1R und mTOR Blockade beim Ewing Sarkom) [209], Moran et al. (Dalotuzumab plus Erlotinib bei NSCLC) [210] und Huang et al. (mit Premetrexed und Cisplatin beim NSQLC) [211]. Die Publikationen von Sclafani et al [212, 213] beziehen sich hingegen nur auf das metastasierte kolorektale Karzinom. Allen Studien gemeinsam ist die Erkenntnis, dass Dalotuzumab eine gute Verträglichkeit mit einer relativ geringen Nebenwirkungsrate zeigt.

Während Lamhamedi-Cherradi et al. beim Ewing Sarkom von synergistischen Effekten durch die Kombinationstherapie für das Outcome berichteten, zeigten Moran und Huang beim Lungenkarzinom keine Verbesserung durch die Hinzunahme von Dalotuzumab. Limitierend kam hinzu, dass Lamhamedi-Cherradi et al. hauptsächlich Zelllinien und Xenografts untersuchten, während die beiden anderen Studien zwar Patienten behandelten, diese aber mit 75, respektive 26 Patienten relativ kleine Kollektive aufwiesen. Durch die unterschiedlichen Tumorentitäten und die verschiedenen Therapiestrategien bleibt die Vergleichbarkeit zwischen diesen Studien sehr eingeschränkt. Sclafani et al. untersuchte in zwei Arbeiten, unterteilt nach dem KRAS-Mutationsstatus [212, 213], die Gabe von Dalotuzumab in Kombination mit Cetuximab und Irinotecan im Vergleich zur Standardtherapie mit Cetuximab und Irinotecan beim therapierefraktären metastasierten Kolonkarzinom. In dem nicht weiter selektierten Patientenkollektiv, welches Progress unter Last-line-therapy zeigte, kam es durch die Hinzunahme von Dalotuzumab zu keiner Verbesserung des Outcomes. Obwohl die IGF1R-Expression nicht mit einem verbesserten Ansprechen auf die Inhibition korrelierte, empfahlen die Autoren aufgrund des kleinen Patientenkollektivs, des Studiendesigns sowie der unvollständigen RAS-Analyse die Anti-IGF1R-Therapie an

selektierten Patientenkollektiven mit ausgewähltem Biomarkerprofil fortzuführen. Dies ähnelt dem Vorschlag von Huang et al., Responder mittels prädiktiver Biomarker zu identifizieren und diese einer selektiven Therapie zuzuführen [211]. In ihrer Betrachtung der Anti-IGF1R-Therapie betonen Qu et al., unter anderem bezugnehmend auf die Arbeit von Sclafani et al., jedoch deutlich, dass Dalotuzumab einen nachteiligen Effekt auf das Gesamtüberleben zu haben scheint [65]. Auch diese Einschätzung ist aufgrund der kleinen Anzahl an Studien, beziehungsweise Patienten, in weiteren Untersuchungen zu prüfen. Die Wirksamkeit des IGF1R-Inhibitors Dalotuzumab bleibt somit ungeklärt.

Zu den weiteren relevanten IGF1R-Inhibitoren für das kolorektale Karzinom zählen Linsitinib und Ganitumab. Während für Linsitinib nur zwei Phase I Studien beim kolorektalen Karzinom vorlagen [214, 215], wurde Ganitumab, ähnlich wie Dalotuzumab, kritisch bezüglich der Wirksamkeit und des Nutzens diskutiert. Die Kombinationstherapie von Ganitumab mit Conatumumab bei Cohn et al. [216] und bei Taberno et al. [217] sowie mit Panitumumab bei van Cutsem et al. [189] zeigte in keiner der Studien eine Verbesserung des Überlebens im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Berechtigte Kritikpunkte waren auch hier die fehlende Selektion nach Biomarkerprofil und die kleinen Patientenzahlen. Besonders erwähnenswert scheint aber die Studie von van Cutsem et al., bei der in einem dritten Arm der MET (HGFR) – Inhibitor Rilotumumab getestet wurde. In diesem Studienarm zeigte sich ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie, jedoch ohne zu einer Verbesserung des Überlebens zu führen.

Für Linsitinib liegt der Fokus der aktuellen Forschung auf Bronchialkarzinomen [218-221]. Hier sind unter anderem Therapiestudien in Arbeit, die Erlotinib mit Linsitinib kombinieren. In ihrer Dosisfindungsstudie beim kolorektalen Karzinom sahen Bendell et al. bei insgesamt n=18 eingeschlossenen Patienten kein Ansprechen auf die Therapie [215]. Putzanov et al. haben in ihrer Phase I Studie hingegen solide Tumoren mit einem Anteil kolorektaler Karzinome von 45% (47 von 95 Patienten) untersucht [214]. In dieser Arbeit wurde, im Gegensatz zu einem Großteil der verfügbaren Therapiestudien, von einer messbaren Antitumoraktivität berichtet. Weitere Studien, welche die Anti-IGF1R-Therapie bei kolorektalen Karzinomen und soliden Tumoren allgemein untersuchen, sind unter ClinicalTrials.gov registriert, aber bisher nicht abgeschlossen und daher ohne publiziertes Ergebnis [222-225].

Der in den bisher verfügbaren Studien gezeigten, deutlich eingeschränkten bis gänzlich fehlenden Wirksamkeit der IGF1R-Inhibitoren liegt möglicherweise eine Resistenzentwicklung

zugrunde. Zu diesem Ergebnis kommen Zhang et al. in einer Studie an Zelllinien und Xenograft-Modellen [226]. Demnach sensibilisieren hohe Expressionslevel des Tumorsuppressors Pcd4 (Programmed cell death 4) die Tumorzellen gegenüber dem IGF1R-Inhibitor OSI-906 (Linsitinib) unter anderem durch Inhibition der Proteinkinase p70S6K1. Wird p70S6K1 dagegen vermehrt phosphoryliert, beispielsweise durch geringe Pcd4-Aktivität, entwickeln die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber den IGF1R-Inhibitoren. Zhang et al. konnten zeigen, dass die gleichzeitige Inhibition von IGF1R und p70S6K1 mit Linsitinib beziehungsweise PF-4708671, einem p70S6K1-Inhibitor, sowohl das Wachstum von Linsitinib-sensiblen als auch von Linsitinib-resistenten Zellen hemmte.

In der Zusammenschau zeigen die aktuellen Daten ein eher pessimistisches Ergebnis der Anti-IGF1R-Therapie bei malignen Tumoren. Allerdings ist es zu früh, um auszuschließen, dass ein guter Antitumoreffekt in einem ausreichend selektierten Patientenkollektiv und in einer wirkungsvollen Kombination mit anderen Therapeutika, wie zum Beispiel durch Inhibition der resistenzinduzierenden Proteinkinase p70S6K1, erreicht werden kann. Weitere noch laufenden Studien [222-225] werden dazu möglicherweise beitragen.

#### 4.3.2 Doppelmarker

Der Nutzen einer Therapiestrategie die multiple Biomarker berücksichtigt, wie sie in dieser Arbeit erprobt wurde, ist bisher (Stand Mai 2019) nur von Hara et al. für das Ösophaguskarzinom [170] publiziert worden. Viele der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten wissenschaftlichen Arbeiten gehen genau diesen Weg der gleichzeitigen Modulation oder Hemmung mehrerer Zielmoleküle um synergistische Effekte zu erzielen. Die zugrundeliegenden Zusammenhänge und Abhängigkeiten werden dabei aber nur selten in ein größeres Gesamtkonzept eingebettet. Eine solche Analyse unter Berücksichtigung mehrerer therapierbarer Zielmoleküle beim kolorektalen Karzinom und deren Abhängigkeiten untereinander wurde in dieser Form noch nicht publiziert.

Eine spannende Erkenntnis, welche die Doppelmarker ermöglichen, ist die durch Zusammenfassung zweier Biomarker entstehende Verstärkung des Signifikanzniveaus, trotz fehlender Signifikanz von mindestens einem der beteiligten Faktoren. Dieser Effekt war hauptsächlich bei den Primärtumoren zu sehen. Dabei ergab sich in den meisten Fällen nicht einfach der rechnerische Mittelwert eines signifikanten und eines nicht signifikanten P-Wertes

(( $p=0,001 + p=0,09$ ) :2 = 0,045), sondern häufig ein höheres oder zumindest gleichbleibendes Signifikanzniveau (siehe Tabelle 47). In der Pharmakologie werden synergistische Effekte beispielsweise mit dem Interaktionsindex berechnet [227]. Ein mathematisches Modell für den Effekt einer Doppelhemmungsstrategie in der Tumorthherapie ist nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht erprobt.

#### 4.4 Therapeutische Konsequenz und Ausblick

Legt man die oben zusammengefassten Studien zugrunde, zeigen sich vielfältige und vielversprechende Therapieansätze und -konzepte für das kolorektale Karzinom. Gleichzeitig treten mit neuen Erkenntnissen mindestens ebenso viele neue Probleme und Rückschläge zu Tage, die das Ziel einer effektiven individualisierten Tumorthherapie in weite Ferne rücken lassen. Es ist also weiterhin breitgefächerte Forschungsarbeit erforderlich, um Lösungen für entstehende Probleme zu finden und neue Erkenntnisse in die aktuellen Therapiekonzepte zu integrieren.

Die vorliegende Arbeit soll mit der Biomarkeranalyse an einem kleinen Patientenkollektiv dazu beitragen. Hervorzuheben ist der, im Vergleich zu anderen Studien, deutlich längere Nachsorgezeitraum und die damit verbundene Erkenntnis, dass vor allem Patienten mit Lebermetastasen von einer schnellen und radikalen Tumorthherapie profitieren könnten. Der durchgehend starke Einfluss der Biomarker MUC1 und HSP90 sowohl beim Primärtumor als auch bei den Lebermetastasen macht sie in ihrer gleichzeitigen Funktion als prognostische Marker und Zielmoleküle für die Tumorthherapie zu wichtigen Faktoren für weitere Forschungsprojekte. Dabei liegt der aktuelle Fokus für MUC1 unter anderem auf der Vakzinierung [228, 229]. Der Mangel an wirkungsvollen Inhibitoren gegen CD44v6 lässt ebenfalls noch viel Raum für neue Therapieoptionen sofern die Entwicklung weiterer Therapeutika gelingt. Andererseits gibt es Erkenntnisse, nach denen die Herunterregulation (=downregulation) von CD44v6 eine schlechtere Prognose bedeutet [148-150], womit eine Inhibition nicht zielführend wäre. Die Inhibitoren gegen die Wachstumsfaktorrezeptoren scheinen hingegen eher geringere, hauptsächlich synergistische Effekte in Kombination mit anderen, entsprechend wirkungsvollen Therapeutika zu haben.

Neben der Entwicklung neuer Therapeutika bleibt die Arbeit an den Resistenzmechanismen ein wichtiges Thema. Nur wenn die Entstehung und die Mechanismen der Resistenzen verstanden werden, kann ein wirkungsvoller Einsatz der Chemotherapeutika und Inhibitoren erfolgen. Dabei sollte nicht vergessen werden, dass die Toxizität einzelner Chemotherapeutika ebenfalls eine Rolle spielt. In manchen Fällen sind die Toxizität und die damit verbundenen Nebenwirkungen bei einem einzelnen Medikament schon so schwerwiegend, dass es zu einer Abweichung vom Therapiekonzept kommt. Ein zusätzliches Therapeutikum im Rahmen einer dualen Inhibition könnte die Toxizität erhöhen und die Therapieadhärenz noch weiter reduzieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich durch bessere Wirksamkeit im Rahmen synergistischer Effekte eine Reduktion der Dosis einzelner Medikamente des Therapieschemas erreichen lässt. Bisher gibt es zu diesem Themenkomplex keine verwertbaren Studien.

Möglicherweise kann die Bildung von Subgruppen als Vorstufe einer individualisierten Tumorthherapie die Entwicklung weiter vorantreiben. Eine solche Unterteilung findet bereits in vielen Studien statt, wenn beispielsweise KRAS-positive oder -negative Patientenkollektive untersucht werden. Die Relevanz von Subgruppen zeigt sich beispielsweise im unterschiedlichen Therapieansprechen verschiedener KRAS-Mutationen auf Cetuximab [36]. Eine interessante Subgruppe aus dem vorliegenden Kollektiv der Lebermetastasen könnten die MUC1/HSP90-positiven Patienten sein. Sie ist mit einem Anteil von ca. 5% (n=3) am Kollektiv relativ klein, sodass die Erkenntnisse dieser Gruppe nicht ohne weiteres auf das Gesamtkollektiv übertragen werden können. Allerdings zeigt sich hier ein besonders schwerer Verlauf mit einer mittleren postoperativen Überlebensdauer von 12 bis 13 Monaten. Damit sind die drei Patienten dieser Subgruppe unter den zehn Prozent der Patienten mit dem kürzesten Überleben im Kollektiv. Eine effektivere Therapie hätte hier also eine besondere Dringlichkeit, zumal bereits entsprechende Therapeutika vorhanden sind. Generell kann die Identifizierung von Subgruppen mit einem hohen medizinischen Bedarf, also mit besonders schweren Erkrankungsverläufen, eine Möglichkeit sein, die weitere Entwicklung sinnvoll zu steuern.

Es bleibt abzuwarten, ob sich, trotz der zunehmenden Komplexität, die Entwicklung einer effektiven individualisierten und damit biomarkerabhängigen Tumorthherapie letztlich als erfolgreich erweisen wird.

## 5 Anhang

### 5.1 Tabellen zur Tumorklassifikation

6. Edition (2002)	7. Edition (2010)	Definition
T <sub>is</sub>	T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	Invasion in die Submukosa
T <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	Invasion in die Muscularis propria
T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>	Invasion in die Subserosa, nicht peritonealisiertes Gewebe
T <sub>4</sub>	T <sub>4a</sub>	Invasion in das viszerale Peritoneum
	T <sub>4b</sub>	Invasion in andere Organe/Strukturen
N <sub>0</sub>	N <sub>0</sub>	Keine regionären Lymphknoten
N <sub>1</sub>	N <sub>1a</sub>	1 Lk
	N <sub>1b</sub>	2-3 Lk
N/A	N <sub>1c</sub>	Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im perikolischen Fettgewebe
N <sub>2</sub>	N <sub>2a</sub>	4-6 Lk
	N <sub>2b</sub>	>6 Lk
M <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	Keine Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	M <sub>1a</sub>	Fernmetastasen in einem Organ
	M <sub>1b</sub>	Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tabella 50: Vergleich der TNM-Klassifikation nach UICC in der 6ten und 7ten Edition

UICC-Stadien nach der 6. Edition (2002)	UICC-Stadien nach der 7. Edition (2010)	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
0	0	T <sub>1s</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
I	I	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
IIa	IIa	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
IIb	IIb	T <sub>4a</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	IIc	T <sub>4b</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
IIIa	IIIa	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
IIIc		T <sub>1</sub>	N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
IIIb	IIIb	T <sub>3</sub> , T <sub>4a</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
IIIc		T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub>	N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>	N <sub>2b</sub>	M <sub>0</sub>
	IIIc	T <sub>4a</sub>	N <sub>2a</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>3</sub> , T <sub>4a</sub>	N <sub>2b</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>4b</sub>	N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
IV	IVa	Jedes T	Jedes N	M <sub>1a</sub>
	IVb	Jedes T	Jedes N	M <sub>1b</sub>

*Tabelle 51: Vergleich der Stadiengruppierung nach UICC in der 6ten und 7ten Edition*



### 5.3 Vollständige tabellarische Auflistung der Korrelationen (Test nach Fisher)

#### 5.3.1 Tabellen: Primärtumore, Einzelmarker mit klin.-path. Faktoren

<b>CD44v6:</b>			Percent			Intensity			
Factor	Groups	n	≤ 50%	> 50%	p	n	0-1	2-3	p
Sex	male	89	19	31	0.509	89	22	28	0.272
	female		12	27			12	27	
Age (mean)	≤ 68.1	89	11	28	0.271	89	16	23	0.665
	> 68.1		20	30			18	32	
Localization*	Right	89	8	34	<b>0.004</b>	89	14	28	0.392
	Left		23	24			20	27	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	17	31	1.0	89	17	31	0.663
	> 4.7 cm		14	27			17	24	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	28	48	0.53	89	30	46	0.759
	Adenomucinous carcinoma		3	10			4	9	
Grading	G1-2	89	25	32	<b>0.021</b>	89	24	33	0.368
	G3-4		6	26			10	22	
Tumor status	pT1-2	89	6	10	0.781	89	6	10	1.0
	pT3-4		25	48			28	45	
Nodal status	pN0	89	20	37	1.0	89	24	33	0.368
	pN1-2		11	21			10	22	
Metastatic status	cM0	89	28	47	0.363	89	29	46	1.0
	cM1		3	11			5	9	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	19	34	0.825	89	22	31	0.508
	III-IV		12	24			12	24	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	16	21	0.377	55	13	24	1.0
	Present		5	13			7	11	
Vein invasion	Absent	55	19	30	1.0	55	19	30	1.0
	Present		2	4			2	4	
Perineural invasion	Absent	20	7	8	0.603	20	5	10	1.0
	Present		1	4			1	4	
Residual	R0	89	30	55	1.0	89	33	52	1.0
	R1-2		1	3			1	3	
Recurrence/Progress	No	89	25	46	1.0	89	26	45	0.593
	Yes		6	12			8	10	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	11	32	0.25	86	15	28	0.824
	> 3.4 ng/ml		17	26			17	26	

Tabelle 52: Primärtumor, CD44v6: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

<b>MUC1:</b>		Percent				Intensity			
Factor	Groups	n	negative	positive	p	n	0-1	2	p
Sex	male	89	35	15	0.266	89	43	7	0.238
	female		22	17			30	9	
Age (mean)	≤ 68.1	89	24	15	0.824	89	33	6	0.782
	> 68.1		33	17			40	10	
Localization*	Right	89	25	17	0.508	89	33	9	0.581
	Left		32	15			40	7	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	33	15	0.378	89	39	9	1.0
	> 4.7 cm		24	17			34	7	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	51	25	0.211	89	65	11	0.053
	Adenomucinous carcinoma		6	7			8	5	
Grading	G1-2	89	38	19	0.5	89	50	7	0.085
	G3-4		19	13			23	9	
Tumor status	pT1-2	89	12	4	0.396	89	14	2	0.726
	pT3-4		45	28			59	14	
Nodal status	pN0	89	42	15	<b>0.02</b>	89	51	6	<b>0.021</b>
	pN1-2		15	17			22	10	
Metastatic status	cM0	89	50	25	0.243	89	65	10	<b>0.017</b>
	cM1		7	7			8	6	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	39	14	<b>0.027</b>	89	47	6	0.055
	III-IV		18	18			26	10	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	24	13	0.382	55	34	3	<b>0.01</b>
	Present		9	9			11	7	
Vein invasion	Absent	55	30	19	1.0	55	42	7	0.251
	Present		4	2			4	2	
Perineural invasion	Absent	20	10	5	1.0	20	15	0	0.053
	Present		3	2			3	2	
Residual	R0	89	54	31	1.0	89	70	15	0.554
	R1-2		3	1			3	1	
Recurrence/Progress	No	89	46	25	0.789	89	60	11	0.301
	Yes		11	7			13	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	31	12	0.118	86	39	4	<b>0.05</b>
	> 3.4 ng/ml		23	20			31	12	

Tabelle 53: Primärtumor, MUC1: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

<b>HSP90:</b>			Percent			Intensity			
Factor	Groups	n	≤ 50%	> 50%	p	n	0-1	2-3	p
Sex	male	89	36	14	0.466	89	43	7	0.771
	female		31	8			32	7	
Age (mean)	≤ 68.1	89	28	11	0.622	89	36	3	0.83
	> 68.1		39	11			39	11	
Localization*	Right	89	32	10	1.0	89	36	6	0.778
	Left		35	12			39	8	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	37	11	0.806	89	41	7	0.778
	> 4.7 cm		30	11			34	7	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	58	18	0.728	89	62	14	0.208
	Adenomucinous carcinoma		9	4			13	0	
Grading	G1-2	89	46	11	0.131	89	50	7	0.243
	G3-4		21	11			25	7	
Tumor status	pT1-2	89	11	5	0.53	89	15	1	0.45
	pT3-4		56	17			60	13	
Nodal status	pN0	89	42	15	0.799	89	50	7	0.243
	pN1-2		25	7			25	7	
Metastatic status	cM0	89	57	18	0.741	89	64	11	0.689
	cM1		10	4			11	3	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	39	14	0.803	89	47	6	0.236
	III-IV		28	8			28	8	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	31	6	0.177	55	35	2	0.082
	Present		12	6			14	4	
Vein invasion	Absent	55	42	7	0.066	55	45	4	0.452
	Present		3	3			5	1	
Perineural invasion	Absent	20	15	0	0.25	20	15	0	0.25
	Present		4	1			4	1	
Residual	R0	89	64	21	1.0	89	72	13	0.502
	R1-2		3	1			3	1	
Recurrence/Progress	No	89	55	16	0.368	89	60	11	1.0
	Yes		12	6			15	3	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	31	12	0.805	86	36	7	1.0
	> 3.4 ng/ml		33	10			37	6	

Tabelle 54: Primärtumor, HSP90: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

<b>HGFR:</b>		Percent				Intensity			
Factor	Groups	n	≤ 80%	> 80%	p	n	0-2	3	p
Sex	male	89	13	37	0.808	89	41	9	0.569
	female		9	30			34	5	
Age (mean)	≤ 68.1	89	7	32	0.223	89	32	7	0.771
	> 68.1		15	35			43	7	
Localization*	Right	89	11	31	0.809	89	34	8	0.562
	Left		11	36			41	6	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	15	33	0.145	89	38	10	0.243
	> 4.7 cm		7	34			37	4	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	19	57	1.0	89	63	13	0.683
	Adenomucinous carcinoma		3	10			12	1	
Grading	G1-2	89	14	43	1.0	89	50	7	0.243
	G3-4		8	24			25	7	
Tumor status	pT1-2	89	4	12	1.0	89	13	3	0.711
	pT3-4		18	55			62	11	
Nodal status	pN0	89	14	43	1.0	89	50	7	0.243
	pN1-2		8	24			25	7	
Metastatic status	cM0	89	19	56	1.0	89	65	10	0.223
	cM1		3	11			10	4	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	14	39	0.803	89	46	7	0.555
	III-IV		8	28			29	7	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	12	25	1.0	55	34	3	<b>0.046</b>
	Present		5	13			12	6	
Vein invasion	Absent	55	15	34	1.0	55	43	6	0.206
	Present		2	4			4	2	
Perineural invasion	Absent	20	5	10	1.0	20	13	2	1.0
	Present		2	3			5	0	
Residual	R0	89	20	65	0.254	89	72	13	0.502
	R1-2		2	2			3	1	
Recurrence/Progress	No	89	19	52	0.543	89	62	9	0.147
	Yes		3	15			13	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	11	32	1.0	86	36	7	1.0
	> 3.4 ng/ml		10	33			37	6	

Tabelle 55: Primärtumor, HGFR: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

<b>IGF1R:</b>		Percent				Intensity			
Factor	Groups	n	≤ 80%	> 80%	p	n	0-1	2-3	p
Sex	male	89	17	33	0.279	89	11	39	0.622
	female		18	21			11	28	
Age (mean)	≤ 68.1	89	18	21	0.279	89	9	30	0.808
	> 68.1		17	33			13	37	
Localization*	Right	89	21	21	0.081	89	17	25	<b>0.001</b>
	Left		14	33			2	42	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	18	30	0.828	89	9	39	0.218
	> 4.7 cm		17	24			13	28	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	27	49	0.122	89	15	61	<b>0.015</b>
	Adenomucinous carcinoma		8	5			7	6	
Grading	G1-2	89	22	35	1.0	89	11	46	0.131
	G3-4		13	19			11	21	
Tumor status	pT1-2	89	6	10	1.0	89	4	12	1.0
	pT3-4		29	44			18	55	
Nodal status	pN0	89	22	35	1.0	89	16	41	0.444
	pN1-2		13	19			6	26	
Metastatic status	cM0	89	31	44	0.553	89	20	55	0.503
	cM1		4	10			2	12	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	21	32	1.0	89	16	37	0.211
	III-IV		14	22			6	30	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	20	17	<b>0.042</b>	55	11	26	0.749
	Present		4	14			4	14	
Vein invasion	Absent	55	24	25	0.204	55	16	33	0.165
	Present		1	5			0	6	
Perineural invasion	Absent	20	8	7	1.0	20	3	12	1.0
	Present		2	3			1	4	
Residual	R0	89	34	51	1.0	89	22	63	0.568
	R1-2		1	3			0	4	
Recurrence/Progress	No	89	29	42	0.602	89	18	53	1.0
	Yes		6	12			4	14	
CEA präoperativ	< 3.4 ng/ml	86	16	27	1.0	86	14	29	0.072
	> 3.4 ng/ml		17	26			6	37	

Tabelle 56: Primärtumor, IGF1R: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

<b>rpS6-Kinase:</b>		Percent				Intensity			
Factor	Groups	n	negative	positive	p	n	0-1	2-3	p
Sex	male	89	27	23	1.0	89	41	9	0.31
	female		21	18			28	11	
Age (mean)	≤ 68.1	89	21	18	1.0	89	32	7	0.447
	> 68.1		27	23			37	13	
Localization*	Right	89	25	17	0.395	89	32	10	0.804
	Left		23	24			37	10	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	25	23	0.831	89	39	9	0.448
	> 4.7 cm		23	18			30	11	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	41	35	1.0	89	60	16	0.478
	Adenomucinous carcinoma		7	6			9	4	
Grading	G1-2	89	29	28	0.510	89	44	13	1.0
	G3-4		19	13			25	7	
Tumor status	pT1-2	89	11	5	0.269	89	12	4	0.75
	pT3-4		37	36			57	16	
Nodal status	pN0	89	32	25	0.66	89	43	14	0.605
	pN1-2		16	16			26	6	
Metastatic status	cM0	89	41	34	0.778	89	58	17	1.0
	cM1		7	7			11	3	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	30	23	0.665	89	41	12	1.0
	III-IV		18	18			28	8	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	19	18	0.775	55	28	9	0.307
	Present		8	10			16	2	
Vein invasion	Absent	55	25	24	0.669	55	39	10	0.579
	Present		2	4			6	0	
Perineural invasion	Absent	20	7	8	0.603	20	11	4	1.0
	Present		1	4			4	1	
Residual	R0	89	48	37	<b>0.041</b>	89	66	19	1.0
	R1-2		0	4			3	1	
Recurrence/Progress	No	89	41	30	0.19	89	56	15	0.54
	Yes		7	11			13	5	
CEA präoperativ	< 3.4 ng/ml	86	22	21	1.0	86	30	13	0.201
	> 3.4 ng/ml		23	20			36	7	

Tabelle 57: Primärtumor, rpS6K: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

5.3.2 Tabellen: Primärtumore, Einzelmarker mit tumorbiologischen Faktoren

**CD44v6:**

Factor	n	Percent			Intensity				
		Groups	≤ 50%	> 50%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	89	≤ 50%		entfällt		0-1		entfällt	
		> 50%				2-3			
MUC1	89	0%	21	36	0.649	0-1	29	44	0.583
		≥ 1%	10	22		2-3	5	11	
HGFR	89	≤ 80%	7	15	0.801	0-2	29	46	1.0
		> 80%	24	43		3	5	9	
IGF1R	89	≤ 80%	11	24	0.653	0-1	9	13	0.804
		> 80%	20	34		2-3	25	42	
EGFR	89	≤ 50%	18	23	0.12	0-1	27	28	<b>0.008</b>
		> 50%	13	35		2-3	7	27	
KI67 LI (Labeling Index)	89	≤ 30%	16	18	0.069	≤ 30%	15	19	0.38
		> 30%	15	40		> 30%	19	36	
HSP90	89	≤ 50%	27	40	0.073	0-1	28	47	0.768
		> 50%	4	18		2-3	6	8	
rpS6-Kinase	89	0%	17	31	1.0	0-1	26	43	1.0
		≥ 1%	14	27		2-3	8	12	
CD45 on connective tissue	89	1-2	17	34	0.823	1-2	21	30	0.519
		3	14	24		3	13	25	
HLADR	89	0%	14	26	1.0	0-1	17	28	1.0
		≥ 1%	17	32		2-3	17	27	
BRAF	89	Wt	29	50	0.484	Wt	31	48	0.736
		Mut	2	8		Mut	3	7	
KRAS	89	Wt	21	37	0.817	Wt	22	36	1.0
		Mut	10	21		Mut	12	19	

Tabelle 58: Primärtumor, CD44v6: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**MUC1:**

Factor	n	Percent			Intensity				
		Groups	0%	> 1%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	89	≤ 50%	21	10	0.649	0-1	29	5	0.583
		> 50%	36	22		2-3	44	11	
MUC1	89	0%	entfällt			0-1	entfällt		
HGFR	89	≥ 1%				2-3			
		≤ 80%	13	9	0.615	0-2	62	13	0.711
> 80%	44	23	3	11		3			
IGF1R	89	≤ 80%	17	18	<b>0.023</b>	0-1	17	5	0.53
		> 80%	40	14		2-3	56	11	
EGFR	89	≤ 50%	28	13	0.51	0-1	45	10	1.0
		> 50%	29	19		2-3	28	6	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	19	15	0.258	≤ 30%	28	6	1.0
		> 30%	38	17		> 30%	45	10	
HSP90	89	≤ 50%	43	24	1.0	0-1	61	14	1.0
		> 50%	14	8		2-3	12	2	
rpS6-Kinase	89	0%	29	19	0.51	0-1	55	14	0.508
		≥ 1%	28	13		2-3	18	2	
CD45 on connective tissue	89	1-2	32	19	0.826	1-2	42	9	1.0
		3	25	13		3	31	7	
HLADR	89	0%	28	12	0.375	0-1	39	6	0.281
		≥ 1%	29	20		2-3	34	10	
BRAF	89	Wt	52	27	0.485	Wt	65	14	1.0
		Mut	5	5		Mut	8	2	
KRAS	89	Wt	38	20	0.817	Wt	49	9	0.404
		Mut	19	12		Mut	24	7	

Tabelle 59: Primärtumor, MUC1: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**HSP90:**

Factor	n	Percent			p	Intensity			p
		Groups	≤ 50%	> 50%		Groups	0-1	2-3	
CD44v6	89	≤ 50%	27	4	0.073	0-1	28	6	0.768
		> 50%	40	18		2-3	47	8	
MUC1	89	0%	43	14	1.0	0-1	61	12	1.0
		≥ 1%	24	8		2-3	14	2	
HGFR	89	≤ 80%	21	1	<b>0.01</b>	0-2	64	11	0.689
		> 80%	46	21		3	11	3	
IGF1R	89	≤ 80%	27	8	0.806	0-1	18	4	0.741
		> 80%	40	14		2-3	57	10	
EGFR	89	≤ 50%	33	8	0.333	0-1	45	10	0.554
		> 50%	34	14		2-3	30	4	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	27	7	0.615	≤ 30%	32	2	0.07
		> 30%	40	15		> 30%	43	12	
HSP90	89	≤ 50%	entfällt			0-1	entfällt		
		> 50%				2-3			
rpS6-Kinase	89	0%	35	13	0.629	0-1	59	10	0.508
		≥ 1%	32	9		2-3	16	4	
CD45 on connective tissue	89	1-2	38	13	1.0	1-2	42	9	0.77
		3	29	9		3	33	5	
HLADR	89	0%	30	10	1.0	0-1	37	8	0.772
		≥ 1%	37	12		2-3	38	6	
BRAF	89	Wt	62	17	0.112	Wt	67	12	0.654
		Mut	5	5		Mut	8	2	
KRAS	89	Wt	42	16	0.449	Wt	49	9	1.0
		Mut	25	6		Mut	26	5	

Tabelle 60: Primärtumor, HSP90: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**HGFR:**

Factor	n	Percent			p	Intensity			p
		Groups	≤ 80%	> 80%		Groups	0-2	3	
CD44v6	89	≤ 50%	7	24	0.801	0-1	29	5	1.0
		> 50%	15	43		2-3	46	9	
MUC1	89	0%	13	44	0.615	0-1	62	11	0.711
		≥ 1%	9	23		2-3	13	3	
HGFR	89	≤ 80%	entfällt			0-2	entfällt		
		> 80%				3			
IGF1R	89	≤ 80%	9	26	1.0	0-1	18	4	0.741
		> 80%	13	41		2-3	57	10	
EGFR	89	≤ 50%	12	29	0.461	0-1	47	8	0.768
		> 50%	10	38		2-3	28	6	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	8	26	1.0	≤ 30%	28	6	0.768
		> 30%	14	41		> 30%	47	8	
HSP90	89	≤ 50%	21	46	<b>0.01</b>	0-1	64	11	0.689
		> 50%	1	21		2-3	11	3	
rpS6-Kinase	89	0%	15	33	0.145	0-1	56	13	0.177
		≥ 1%	7	34		2-3	19	1	
CD45 on connective tissue	89	1-2	13	38	1.0	1-2	43	8	1.0
		3	9	29		3	32	6	
HLADR	89	0%	12	28	0.331	0-1	39	6	0.573
		≥ 1%	10	39		2-3	36	8	
BRAF	89	Wt	20	59	1.0	Wt	69	10	<b>0.047</b>
		Mut	2	8		Mut	6	4	
KRAS	89	Wt	17	41	0.205	Wt	46	12	0.125
		Mut	5	26		Mut	29	2	

Tabelle 61: Primärtumor, HGFR: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**IGF1R:**

Factor	n	Percent			p	Intesity			p
		Groups	≤ 80%	> 80%		Groups	0-1	2-3	
CD44v6	89	≤ 50%	11	20	0.653	0-1	9	25	0.804
		> 50%	24	34		2-3	13	42	
MUC1	89	0%	17	40	<b>0.023</b>	0-1	17	56	0.53
		≥ 1%	18	14		2-3	5	11	
HGFR	89	≤ 80%	9	13	1.0	0-2	18	57	0.741
		> 80%	26	41		3	4	10	
IGF1R	89	≤ 80%	entfällt			0-1	entfällt		
		> 80%				2-3			
EGFR	89	≤ 50%	17	24	0.828	0-1	13	42	0.804
		> 50%	18	30		2-3	9	25	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	12	22	0.656	≤ 30%	10	24	0.456
		> 30%	23	32		> 30%	12	43	
HSP90	89	≤ 50%	27	40	0.806	0-1	18	57	0.741
		> 50%	8	14		2-3	4	10	
rpS6-Kinase	89	0%	21	27	0.391	0-1	15	54	0.248
		≥ 1%	14	27		2-3	7	13	
CD45 on connective tissue	89	1-2	24	27	0.124	1-2	17	34	<b>0.046</b>
		3	11	27		3	5	33	
HLADR	89	0%	15	25	0.829	0-1	11	34	1.0
		≥ 1%	20	29		2-3	11	33	
BRAF	89	Wt	30	49	0.506	Wt	18	61	0.255
		Mut	5	5		Mut	4	6	
KRAS	89	Wt	18	40	<b>0.04</b>	Wt	16	42	0.449
		Mut	17	14		Mut	6	25	

Tabelle 62: Primärtumor, IGF1R: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**rpS6-Kinase:**

Factor	n	Percent			Intensity				
		Groups	0%	≥ 1%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	89	≤ 50%	17	14	1.0	0-1	26	8	1.0
		> 50%	31	27		2-3	43	12	
MUC1	89	0%	29	28	0.51	0-1	55	18	0.508
		≥ 1%	19	13		2-3	14	2	
HGFR	89	≤ 80%	15	7	0.145	0-2	56	19	0.177
		> 80%	33	34		3	13	1	
IGF1R	89	≤ 80%	21	14	0.391	0-1	15	7	0.248
		> 80%	27	27		2-3	54	13	
EGFR	89	≤ 50%	28	13	<b>0.019</b>	0-1	45	10	0.296
		> 50%	20	28		2-3	24	10	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	19	15	0.829	≤ 30%	26	8	1.0
		> 30%	29	26		> 30%	43	12	
HSP90	89	≤ 50%	35	32	0.629	0-1	59	16	0.508
		> 50%	13	9		2-3	10	4	
rpS6-Kinase	89	0%	entfällt			0-1	entfällt		
CD45 on connective tissue	89	≥ 1%				2-3			
		1-2	27	24	1.0	1-2	39	12	1.0
3	21	17	3	30		8			
HLADR	89	0%	20	20	0.528	0-1	35	10	1.0
		≥ 1%	28	21		2-3	34	10	
BRAF	89	Wt	42	37	0.748	Wt	60	19	0.446
		Mut	6	4		Mut	9	1	
KRAS	89	Wt	34	24	0.268	Wt	50	8	<b>0.015</b>
		Mut	14	17		Mut	19	12	

*Tabelle 63: Primärtumor, rpS6K: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.*

5.3.3 Tabellen: Lebermetastasen, Einzelmarker mit klin.-path. Faktoren

**CD44v6:**

Factor	Groups	n	Percent		p	n	Intensity		p
			≤ 50%	> 50%			0-1	2-3	
Sex	male	59	16	21	0.288	59	16	21	0.785
	female		13	9			8	14	
Age (mean)	≤ 62.6	59	13	12	0.795	59	11	14	0.79
	> 62.6		16	18			13	21	
Number of LM	1	56	9	9	1.0	56	9	9	0.394
	> 1		19	19			14	21	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	22	13	<b>0.026</b>	56	15	20	0.785
	> 3.93 cm		6	15			8	13	
Localization Primarius*	Right	53	8	8	1.0	53	7	9	1.0
	Left		19	18			16	21	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	7	5	0.532	59	5	4	0.464
	Yes		22	25			19	31	
Extrahepatic metastasis	No	59	21	14	0.064	59	16	19	0.423
	Yes		8	16			8	16	
Recurrence/Progress	No	59	12	9	0.422	59	11	10	0.268
	Yes		17	21			13	25	
Grading LM	G2	55	20	16	0.259	55	12	24	0.247
	G3		7	12			10	9	
Histological type	Adenocarcinoma	58	27	25	0.67	58	22	30	0.386
	Mucinous adenocarcinoma		2	4			1	5	
Residual	R0	59	25	22	0.333	59	19	28	1.0
	R1-2		4	8			5	7	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	5	8	0.532	56	5	8	1.0
	> 3.4 ng/ml		22	21			18	25	

Tabelle 64: Lebermetastasen, CD44v6: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**MUC1:**

Factor	Groups	Percent			Intensity				
		n	negative	positive	p	n	0-1	2-3	p
Sex	male	59	27	10	0.537	59	35	2	0.351
	female		18	4			19	3	
Age (mean)	≤ 62.6	59	22	3	0.12	59	23	2	1.0
	> 62.6		23	11			31	3	
Number of LM	1	56	16	2	0.186	56	17	1	1.0
	> 1		27	11			35	3	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	28	7	0.343	56	33	2	0.352
	> 3.93 cm		14	7			18	3	
Localization Primarius*	Right	53	14	2	0.471	53	15	1	1.0
	Left		28	9			34	3	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	5	4	0.195	59	8	1	0.577
	Yes		40	10			46	4	
Extrahepatic metastasis	No	59	27	8	1.0	59	32	3	1.0
	Yes		18	6			22	2	
Recurrence/Progress	No	59	17	4	0.751	59	20	1	0.646
	Yes		28	10			34	4	
Grading LM	G2	55	29	7	0.336	55	33	3	1.0
	G3		13	6			18	1	
Histological type	Adenocarcinoma	58	39	13	1.0	58	48	4	0.433
	Mucinous adenocarcinoma		5	1			5	1	
Residual	R0	59	37	10	0.453	59	44	3	0.266
	R1-2		8	4			10	2	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	10	3	1.0	56	12	1	1.0
	> 3.4 ng/ml		32	11			39	4	

Tabelle 65: Lebermetastasen, MUC1: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**HSP90:**

Factor	Groups	Percent			Intensity				
		n	negative	positive	p	n	0-1	2	P
Sex	male	59	26	11	0.774	59	32	5	<b>0.026</b>
	female		14	8			13	9	
Age (mean)	≤ 62.6	59	17	8	1.0	59	19	6	1.0
	> 62.6		23	11			26	8	
Number of LM	1	56	11	7	0.366	56	12	6	0.31
	> 1		28	10			31	7	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	24	11	1.0	56	29	6	0.73
	> 3.93 cm		15	6			16	5	
Localization Primarius*	Right	53	10	6	0.759	53	10	6	0.15
	Left		25	12			31	6	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	9	0	<b>0.046</b>	59	8	1	0.671
	Yes		31	19			37	13	
Extrahepatic metastasis	No	59	28	7	<b>0.023</b>	59	28	7	0.536
	Yes		12	12			17	7	
Recurrence/Progress	No	59	17	4	0.149	59	17	4	0.751
	Yes		23	15			28	10	
Grading LM	G2	55	29	7	<b>0.006</b>	55	29	7	0.336
	G3		8	11			13	6	
Histological type	Adenocarcinoma	58	38	14	0.068	58	42	10	0.119
	Mucinous adenocarcinoma		2	4			3	3	
Residual	R0	59	34	13	0.174	59	37	10	0.453
	R1-2		6	6			8	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	9	4	1.0	56	9	4	0.717
	> 3.4 ng/ml		29	14			33	10	

Tabelle 66: Lebermetastasen, HSP90: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren..

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (&gt; 10cm ab ano)

**HGFR:**

Factor	Groups	n	Percent		p	n	Intensity		p
			≤ 80%	> 80%			0-1	2-3	
Sex	male	59	10	27	0.767	59	28	9	0.506
	female		5	17			19	3	
Age (mean)	≤ 62.6	59	6	19	1.0	59	19	6	0.745
	> 62.6		9	25			28	6	
Number of LM	1	56	3	15	0.514	56	14	4	0.711
	> 1		10	28			32	6	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	8	27	0.752	56	26	9	0.503
	> 3.93 cm		6	15			18	3	
Localization Primarius*	Right	53	3	13	0.508	53	12	4	1.0
	Left		12	25			29	8	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	2	7	1.0	59	8	1	0.67
	Yes		13	37			39	11	
Extrahepatic metastasis	No	59	11	24	0.238	59	28	7	1.0
	Yes		4	20			19	5	
Recurrence/Progress	No	59	8	13	0.124	59	5	16	0.119
	Yes		7	31			3	35	
Grading LM	G2	55	9	27	1.0	55	26	10	0.183
	G3		4	15			17	2	
Histological type	Adenocarcinoma	58	13	39	1.0	58	41	11	1.0
	Mucinous adenocarcinoma		1	5			5	1	
Residual	R0	59	11	36	0.479	59	37	10	1.0
	R1-2		4	8			10	2	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	2	11	0.711	56	11	2	1.0
	> 3.4 ng/ml		10	33			34	9	

Tabelle 67: Lebermetastasen, HGFR: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (&gt; 10cm ab ano)

**IGF1R:**

Factor	Groups	n	Percent		p	n	Intensity		P
			≤ 80%	> 80%			0-1	2-3	
Sex	male	59	8	29	0.754	59	5	32	1.0
	female		6	16			3	19	
Age (mean)	≤ 62.6	59	7	18	0.549	59	5	20	0.265
	> 62.6		7	27			3	31	
Number of LM	1	56	4	14	1.0	56	1	17	0.409
	> 1		9	29			6	32	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	5	30	0.298	56	3	32	0.406
	> 3.93 cm		6	15			4	17	
Localization Primarius*	Right	53	3	13	0.51	53	2	14	1.0
	Left		11	26			6	31	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	2	7	1.0	59	1	8	1.0
	Yes		12	38			7	43	
Extrahepatic metastasis	No	59	9	26	0.762	59	6	29	0.453
	Yes		5	19			2	22	
Recurrence/Progress	No	59	4	17	0.751	59	2	19	0.699
	Yes		10	28			6	32	
Grading LM	G2	55	9	27	0.511	55	5	31	0.653
	G3		3	16			1	18	
Histological type	Adenocarcinoma	58	13	39	0.32	58	7	45	1.0
	Mucinous adenocarcinoma		0	6			0	6	
Residual	R0	59	10	37	0.453	59	5	42	0.34
	R1-2		4	8			3	9	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	2	11	0.48	56	0	13	0.177
	> 3.4 ng/ml		12	31			8	35	

Tabelle 68: Lebermetastasen, IGF1R: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (&gt; 10cm ab ano)

**rpS6-Kinase:**

Factor	Groups	Percent			p	Intensity			
		n	negative	positive		n	0-1	2	P
Sex	male	59	15	22	0.789	59	22	15	1.0
	female		8	14			13	9	
Age (mean)	≤ 62.6	59	11	14	0.592	59	16	9	0.598
	> 62.6		12	22			19	15	
Number of LM	1	56	7	11	1.0	56	9	9	0.566
	> 1		14	24			23	15	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	13	22	0.78	56	19	16	0.412
	> 3.93 cm		9	12			14	7	
Localization Primarius*	Right	53	7	9	1.0	53	9	7	0.556
	Left		15	22			24	13	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	4	5	1.0	59	5	4	0.727
	Yes		19	28			29	18	
Extrahepatic metastasis	No	59	14	21	1.0	59	19	16	0.423
	Yes		9	15			16	8	
Recurrence/Progress	No	59	8	13	1.0	59	12	9	1.0
	Yes		15	23			23	15	
Grading LM	G2	55	12	24	0.566	55	20	16	1.0
	G3		8	11			11	8	
Histological type	Adenocarcinoma	58	22	30	0.386	58	31	21	0.684
	Mucinous adenocarcinoma		1	5			3	3	
Residual	R0	59	17	30	0.51	59	27	20	0.745
	R1-2		6	6			8	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	4	9	0.747	56	6	7	0.524
	> 3.4 ng/ml		17	26			26	17	

Tabelle 69: Lebermetastasen, rpS6K: Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

5.3.4 Tabellen: Lebermetastasen, Einzelmarker mit tumorbiologischen Faktoren

**CD44v6:**

Factor	n	Percent				Intensity			
		Groups	≤ 50%	> 50%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	59	≤ 50%		entfällt		0-1		entfällt	
		> 50%				2-3			
MUC1	59	0%	26	19	<b>0.03</b>	0-1	24	30	0.073
		≥ 1%	3	11		2-3	0	5	
HGFR	59	≤ 80%	10	5	0.143	0-2	20	27	0.745
		> 80%	19	25		3	4	8	
IGF1R	59	≤ 80%	7	7	1.0	0-1	4	4	0.704
		> 80%	22	23		2-3	20	31	
EGFR	59	≤ 50%	12	11	0.792	0-1	16	18	0.291
		> 50%	17	19		2-3	8	17	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	13	7	0.103	≤ 30%	10	10	0.402
		> 30%	16	23		> 30%	14	25	
HSP90	59	≤ 50%	23	17	0.095	0-1	19	26	0.762
		> 50%	6	13		2-3	5	9	
rpS6-Kinase	59	0%	9	14	0.288	0-1	12	23	0.285
		≥ 1%	20	16		2-3	12	12	
CD45 on connective tissue	59	1-2	21	24	0.552	1-2	22	23	<b>0.029</b>
		3	8	6		3	2	12	
HLADR	59	0%	20	21	1.0	0-1	17	27	0.762
		≥ 1%	9	9		2-3	7	8	
BRAF	58	Wt	28	29	1.0	Wt	23	34	1.0
		Mut	0	1		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	16	21	0.414	Wt	12	25	0.168
		Mut	12	9		Mut	11	10	

Tabelle 70: Lebermetastasen, CD44v6: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**MUC1:**

Factor	n	Percent			Intensity				
		Groups	0%	≥ 1%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	59	≤ 50%	26	3	<b>0.03</b>	0-1	24	0	0.073
		> 50%	19	11		2-3	30	5	
MUC1	59	0%	entfällt			0-1	entfällt		
		≥ 1%				2-3			
HGFR	59	≤ 80%	15	0	<b>0.013</b>	0-2	43	4	1.0
		> 80%	30	14		3	11	1	
IGF1R	59	≤ 80%	12	2	0.482	0-1	6	2	0.131
		> 80%	33	12		2-3	48	3	
EGFR	59	≤ 50%	19	4	0.532	0-1	31	3	1.0
		> 50%	26	10		2-3	23	2	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	17	3	0.342	≤ 30%	18	2	1.0
		> 30%	28	11		> 30%	36	3	
HSP90	59	≤ 50%	29	11	0.514	0-1	42	3	0.583
		> 50%	16	3		2-3	12	2	
rpS6-Kinase	59	0%	14	9	<b>0.033</b>	0-1	31	4	0.639
		≥ 1%	31	5		2-3	23	1	
CD45 on connective tissue	59	1-2	33	12	0.482	1-2	41	4	1.0
		3	12	2		3	13	1	
HLADR	59	0%	35	6	<b>0.021</b>	0-1	41	3	0.593
		≥ 1%	10	8		2-3	13	2	
BRAF	58	Wt	44	13	0.241	Wt	53	4	0.086
		Mut	0	1		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	31	6	0.108	Wt	34	3	1.0
		Mut	13	8		Mut	19	2	

Tabelle 71: Lebermetastasen, MUC1: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**HSP90:**

Factor	n	Percent			p	Intensity			p
		Groups	≤ 50%	> 50%		Groups	0-1	2-3	
CD44v6	59	≤ 50%	23	6	0.095	0-1	19	5	0.762
		> 50%	17	13		2-3	26	9	
MUC1	59	0%	29	16	0.514	0-1	42	12	0.583
		≥ 1%	11	3		2-3	3	2	
HGFR	59	≤ 80%	10	5	1.0	0-2	34	13	0.26
		> 80%	30	14		3	11	1	
IGF1R	59	≤ 80%	10	4	1.0	0-1	6	2	1.0
		> 80%	30	15		2-3	39	12	
EGFR	59	≤ 50%	18	5	0.254	0-1	25	9	0.758
		> 50%	22	14		2-3	20	5	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	16	4	0.239	≤ 30%	17	3	0.342
		> 30%	24	15		> 30%	28	11	
HSP90	59	≤ 50%	entfällt			0-1	entfällt		
rpS6-Kinase	59	> 50%				2-3			
		0%	16	7	1.0	0-1	30	5	0.061
≥ 1%	24	12	2-3	15		9			
CD45 on connective tissue	59	1-2	27	18	<b>0.024</b>	1-2	31	14	<b>0.026</b>
		3	13	1		3	14	0	
HLADR	59	0%	26	15	0.37	0-1	33	11	1.0
		≥ 1%	14	4		2-3	12	3	
BRAF	58	Wt	39	18	0.328	Wt	43	14	1.0
		Mut	0	1		Mut	1	0	
KRAS	58	Wt	26	11	0.569	Wt	31	6	0.108
		Mut	13	8		Mut	13	8	

Tabelle 72: Lebermetastasen, HSP90: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**HGFR:**

Factor	n	Percent			p	Intensity			p
		Groups	≤ 80%	> 80%		Groups	0-2	3	
CD44v6	59	≤ 50%	10	19	0.143	0-1	20	4	0.745
		> 50%	5	25		2-3	27	8	
MUC1	59	0%	15	30	<b>0.013</b>	0-1	43	11	1.0
		≥ 1%	0	14		2-3	4	1	
HGFR	59	≤ 80%	entfällt			0-2	entfällt		
		> 80%				3			
IGF1R	59	≤ 80%	5	9	0.316	0-1	7	1	1.0
		> 80%	10	35		2-3	40	11	
EGFR	59	≤ 50%	9	14	0.07	0-1	28	6	0.745
		> 50%	6	30		2-3	19	6	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	6	14	0.753	≤ 30%	15	5	0.518
		> 30%	9	30		> 30%	32	7	
HSP90	59	≤ 50%	10	30	1.0	0-1	34	11	0.26
		> 50%	5	14		2-3	13	1	
rpS6-Kinase	59	0%	4	19	0.361	0-1	27	8	0.745
		≥ 1%	11	25		2-3	20	4	
CD45 on connective tissue	59	1-2	11	34	0.738	1-2	35	10	0.712
		3	4	10		3	12	2	
HLADR	59	0%	11	30	1.0	0-1	36	8	0.479
		≥ 1%	4	14		2-3	11	4	
BRAF	58	Wt	14	43	1.0	Wt	46	11	0.207
		Mut	0	1		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	10	27	0.544	Wt	31	6	0.32
		Mut	4	17		Mut	15	6	

Tabelle 73: Lebermetastasen, HGFR: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**IGF1R:**

Factor	n	Percent			p	Intensity			p
		Groups	≤ 80%	> 80%		Groups	0-1	2-3	
CD44v6	59	≤ 50%	7	22	1.0	0-1	4	20	0.704
		> 50%	7	23		2-3	4	31	
MUC1	59	0%	12	33	0.482	0-1	6	48	0.131
		≥ 1%	2	12		2-3	2	3	
HGFR	59	≤ 80%	5	10	0.316	0-2	7	40	1.0
		> 80%	9	35		3	1	11	
IGF1R	59	≤ 80%	entfällt			0-1	entfällt		
		> 80%				2-3			
EGFR	59	≤ 50%	10	13	<b>0.01</b>	0-1	4	30	0.711
		> 50%	4	32		2-3	4	21	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	5	15	1.0	≤ 30%	3	17	1.0
		> 30%	9	30		> 30%	5	34	
HSP90	59	≤ 50%	10	30	1.0	0-1	6	39	1.0
		> 50%	4	15		2-3	2	12	
rpS6-Kinase	59	0%	6	17	0.762	0-1	5	30	1.0
		≥ 1%	8	28		2-3	3	21	
CD45 on connective tissue	59	1-2	12	33	0.482	1-2	7	38	0.666
		3	2	12		3	1	13	
HLADR	59	0%	11	30	0.516	0-1	5	39	0.407
		≥ 1%	3	15		2-3	3	12	
BRAF	58	Wt	14	43	1.0	Wt	8	49	1.0
		Mut	0	1		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	11	26	0.22	Wt	6	31	0.698
		Mut	3	18		Mut	2	19	

Tabelle 74: Lebermetastasen, IGF1R: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

**rpS6-Kinase:**

Factor	n	Percent			Intensity				
		Groups	0%	≥ 1%	p	Groups	0-1	2-3	p
CD44v6	59	≤ 50%	9	20	0.288	0-1	12	12	0.285
		> 50%	14	16		2-3	23	12	
MUC1	59	0%	14	31	<b>0.033</b>	0-1	31	23	0.639
		≥ 1%	9	5		2-3	4	1	
HGFR	59	≤ 80%	4	11	0.361	0-2	27	20	0.745
		> 80%	19	25		3	8	4	
IGF1R	59	≤ 80%	6	8	0.762	0-1	5	3	1.0
		> 80%	17	28		2-3	30	21	
EGFR	59	≤ 50%	10	13	0.596	0-1	22	12	0.423
		> 50%	13	23		2-3	13	12	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	9	11	0.578	≤ 30%	14	6	0.273
		> 30%	14	25		> 30%	21	18	
HSP90	59	≤ 50%	16	24	1.0	0-1	30	15	0.061
		> 50%	7	12		2-3	5	9	
rpS6-Kinase	59	0%	entfällt			0-1	entfällt		
CD45 on connective tissue	59	≥ 1%				2-3			
		1-2	18	27	1.0	1-2	26	19	0.762
3	5	9	3	9		5			
HLADR	59	0%	14	27	0.265	0-1	26	18	1.0
		≥ 1%	9	9		2-3	9	6	
BRAF	58	Wt	21	36	0.379	Wt	33	24	1.0
		Mut	1	0		Mut	1	0	
KRAS	58	Wt	14	23	1.0	Wt	22	15	1.0
		Mut	8	13		Mut	12	9	

Tabelle 75: Lebermetastasen, rpS6K: Korrelationen mit tumorbiologischen Faktoren.

5.3.5 Tabellen: Primärtumoren, Doppelmarker mit klin.-pat. Faktoren

**CD44v6 >50% and MUC1 positive:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	41	9	0.137
	female		26	13	
Age (mean)	≤ 68.1	89	27	12	0.323
	> 68.1		40	10	
Localization*	Right	89	28	14	0.089
	Left		39	8	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	36	12	1.0
	> 4.7 cm		31	10	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	60	16	0.079
	Adenomucinous carcinoma		7	6	
Grading	G1-2	89	46	11	0.131
	G3-4		21	11	
Tumor status	pT1-2	89	13	3	0.751
	pT3-4		54	19	
Nodal status	pN0	89	48	9	<b>0.012</b>
	pN1-2		19	13	
Metastatic status	cM0	89	58	17	0.322
	cM1		9	5	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	44	9	<b>0.048</b>
	III-IV		23	13	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	31	6	<b>0.045</b>
	Present		10	8	
Vein invasion	Absent	55	38	11	0.619
	Present		4	2	
Perineural invasion	Absent	20	13	2	0.249
	Present		3	2	
Residual	R0	89	64	21	1.0
	R1-2		3	1	
Recurrence/Progress	No	89	54	17	0.764
	Yes		13	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	33	10	0.805
	> 3.4 ng/ml		31	12	

Tabelle 76: Primärtumor, CD44v6/MUC1: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.  
\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50% and HGFR >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	28	22	0.398
	female		18	21	
Age (mean)	≤ 68.1	89	16	23	0.09
	> 68.1		30	20	
Localization*	Right	89	17	25	0.057
	Left		29	18	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	27	21	0.399
	> 4.7 cm		19	22	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	41	35	0.375
	Adenomucinous carcinoma		5	8	
Grading	G1-2	89	34	23	0.051
	G3-4		12	20	
Tumor status	pT1-2	89	8	8	1.0
	pT3-4		38	35	
Nodal status	pN0	89	30	27	0.829
	pN1-2		16	16	
Metastatic status	cM0	89	40	35	0.566
	cM1		6	8	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	29	24	0.523
	III-IV		17	19	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	23	14	0.561
	Present		9	9	
Vein invasion	Absent	55	28	21	1.0
	Present		4	2	
Residual	R0	89	43	42	0.617
	R1-2		3	1	
Recurrence/Progress	No	89	38	33	0.6
	Yes		8	10	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	19	24	0.388
	> 3.4 ng/ml		24	19	

Tabelle 77: Primärtumor, CD44v6/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.  
 \*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50 and IGF1R >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	30	20	0.826
	female		25	14	
Age (mean)	≤ 68.1	89	24	15	1.0
	> 68.1		31	19	
Localization*	Right	89	24	18	0.513
	Left		31	16	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	29	19	0.829
	> 4.7 cm		26	15	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	46	30	0.759
	Adenomucinous carcinoma		9	4	
Grading	G1-2	89	38	19	0.258
	G3-4		17	15	
Tumor status	pT1-2	89	12	4	0.269
	pT3-4		43	30	
Nodal status	pN0	89	35	22	1.0
	pN1-2		20	12	
Metastatic status	cM0	89	49	26	0.139
	cM1		8	6	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	33	20	1.0
	III-IV		22	14	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	28	9	0.072
	Present		9	9	
Vein invasion	Absent	55	35	14	0.082
	Present		2	4	
Residual	R0	89	54	31	0.154
	R1-2		1	3	
Recurrence/Progress	No	89	46	25	0.285
	Yes		9	9	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	25	18	0.826
	> 3.4 ng/ml		27	16	

Tabelle 78: Primärtumor, CD44v6/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50 and HSP90 >50%**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	39	11	0.792
	female		32	7	
Age (mean)	≤ 68.1	89	30	9	0.602
	> 68.1		41	9	
Localization*	Right	89	33	9	0.798
	Left		38	9	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	40	8	0.432
	> 4.7 cm		31	10	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	62	14	0.289
	Adenomucinous carcinoma		9	4	
Grading	G1-2	89	50	7	<b>0.026</b>
	G3-4		21	11	
Tumor status	pT1-2	89	13	3	1.0
	pT3-4		58	15	
Nodal status	pN0	89	45	12	1.0
	pN1-2		26	6	
Metastatic status	cM0	89	61	14	0.47
	cM1		10	4	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	42	11	1.0
	III-IV		29	7	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	33	4	0.063
	Present		12	6	
Vein invasion	Absent	55	43	6	<b>0.049</b>
	Present		3	3	
Perineural invasion	Absent	20	15	0	0.25
	Present		4	1	
Residual	R0	89	68	17	1.0
	R1-2		3	1	
Recurrence/Progress	No	89	59	12	0.185
	Yes		12	6	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	35	8	0.792
	> 3.4 ng/ml		33	10	

Tabelle 79: Primärtumor, CD44v6/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**MUC1 positive and HGFR >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	39	11	0.465
	female		27	12	
Age (mean)	≤ 68.1	89	27	12	0.465
	> 68.1		39	11	
Localization*	Right	89	30	12	0.633
	Left		36	11	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	41	7	<b>0.014</b>
	> 4.7 cm		25	16	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	58	18	0.308
	Adenomucinous carcinoma		8	5	
Grading	G1-2	89	44	13	0.452
	G3-4		22	10	
Tumor status	pT1-2	89	14	2	0.222
	pT3-4		52	21	
Nodal status	pN0	89	48	9	<b>0.006</b>
	pN1-2		18	14	
Metastatic status	cM0	89	57	18	0.506
	cM1		9	5	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	45	8	<b>0.007</b>
	III-IV		21	15	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	28	9	0.529
	Present		12	6	
Vein invasion	Absent	55	36	13	1.0
	Present		5	1	
Perineural invasion	Absent	20	11	4	0.53
	Present		5	0	
Residual	R0	89	62	23	0.569
	R1-2		4	0	
Recurrence/Progress	No	89	54	17	0.547
	Yes		12	6	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	37	6	<b>0.014</b>
	> 3.4 ng/ml		26	17	

Tabelle 80: Primärtumor, MUC1/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**MUC1 positive and IGF1R >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	42	8	1.0
	female		33	6	
Age (mean)	≤ 68.1	89	33	6	1.0
	> 68.1		42	8	
Localization*	Right	89	37	5	0.396
	Left		38	9	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	41	7	0.778
	> 4.7 cm		34	7	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	64	12	1.0
	Adenomucinous carcinoma		11	2	
Grading	G1-2	89	48	9	1.0
	G3-4		27	5	
Tumor status	pT1-2	89	15	1	0.45
	pT3-4		60	13	
Nodal status	pN0	89	52	5	<b>0.031</b>
	pN1-2		23	9	
Metastatic status	cM0	89	66	9	<b>0.041</b>
	cM1		9	5	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	49	4	<b>0.016</b>
	III-IV		26	10	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	32	5	0.268
	Present		13	5	
Vein invasion	Absent	55	42	7	0.251
	Present		4	2	
Perineural invasion	Absent	20	13	2	1.0
	Present		4	1	
Residual	R0	89	72	13	0.502
	R1-2		3	1	
Recurrence/Progress	No	89	62	9	0.147
	Yes		13	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	39	4	0.142
	> 3.4 ng/ml		33	10	

*Tabelle 81: Primärtumor, MUC1/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.  
\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)*

**MUC1 positive and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	46	4	0.726
	female		35	4	
Age (mean)	≤ 68.1	89	35	4	0.726
	> 68.1		46	4	
Localization*	Right	89	36	6	0.142
	Left		45	2	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	47	1	<b>0.022</b>
	> 4.7 cm		34	7	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	71	5	0.089
	Adenomucinous carcinoma		10	3	
Grading	G1-2	89	54	3	0.13
	G3-4		27	5	
Tumor status	pT1-2	89	15	1	1.0
	pT3-4		66	7	
Nodal status	pN0	89	54	3	0.13
	pN1-2		27	5	
Metastatic status	cM0	89	69	6	0.607
	cM1		12	2	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	50	3	0.261
	III-IV		31	5	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	36	1	<b>0.035</b>
	Present		14	4	
Vein invasion	Absent	55	46	3	0.379
	Present		5	1	
Perineural invasion	Absent	20	Werte nicht ausreichend		
	Present				
Residual	R0	89	77	8	1.0
	R1-2		4	0	
Recurrence/Progress	No	89	67	4	<b>0.05</b>
	Yes		14	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	41	2	0.265
	> 3.4 ng/ml		37	6	

Tabelle 82: Primärtumor, MUC1/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**HGFR >80% and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	37	13	0.62
	female		31	8	
Age (mean)	≤ 68.1	89	29	10	0.803
	> 68.1		39	11	
Localization*	Right	89	33	9	0.803
	Left		35	12	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	38	10	0.618
	> 4.7 cm		30	11	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	59	17	0.496
	Adenomucinous carcinoma		9	4	
Grading	G1-2	89	46	11	0.298
	G3-4		22	10	
Tumor status	pT1-2	89	11	5	0.517
	pT3-4		57	16	
Nodal status	pN0	89	42	15	0.604
	pN1-2		26	6	
Metastatic status	cM0	89	57	18	1.0
	cM1		11	3	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	39	14	0.612
	III-IV		29	7	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	31	6	0.473
	Present		13	5	
Vein invasion	Absent	55	42	7	0.251
	Present		4	2	
Residual	R0	89	64	21	0.569
	R1-2		4	0	
Recurrence/Progress	No	89	55	16	0.757
	Yes		13	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	31	12	0.616
	> 3.4 ng/ml		34	9	

Tabelle 83: Primärtumor, HGFR/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**IGF1R >80% and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	89	39	11	0.083
	female		36	3	
Age (mean)	≤ 68.1	89	32	7	0.771
	> 68.1		43	7	
Localization*	Right	89	37	5	0.396
	Left		38	9	
Tumor size (mean)	≤ 4.7 cm	89	40	8	1.0
	> 4.7 cm		35	6	
Histological typ	Adenocarcinoma	89	63	13	0.683
	Adenomucinous carcinoma		12	1	
Grading	G1-2	89	49	8	0.559
	G3-4		26	6	
Tumor status	pT1-2	89	14	2	1.0
	pT3-4		61	12	
Nodal status	pN0	89	47	10	0.763
	pN1-2		28	4	
Metastatic status	cM0	89	64	11	0.689
	cM1		11	3	
Cancer stage (UICC)	I-II	89	43	10	0.386
	III-IV		32	4	
Lymphangiosis carcinomatosa	Absent	55	33	4	0.416
	Present		14	4	
Vein invasion	Absent	55	46	3	<b>0.013</b>
	Present		3	3	
Residual	R0	89	72	13	0.502
	R1-2		3	1	
Recurrence/Progress	No	89	60	11	1.0
	Yes		15	3	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	86	35	8	0.771
	> 3.4 ng/ml		37	6	

Tabelle 84: Primärtumor, IGF1R/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.  
 \*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

### 5.3.6 Tabellen: Primärtumoren, Doppelmarker mit tumorbiologischen Faktoren

#### **CD44v6 >50% and MUC1 positive:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	89	0%		entfällt	
		≥ 1%			
HGFR	89	≤ 80%	14	8	0.162
		> 80%	53	14	
IGF1R	89	≤ 80%	21	14	<b>0.011</b>
		> 80%	46	8	
EGFR	89	≤ 50%	33	8	0.333
		> 50%	34	14	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	26	8	1.0
		> 30%	41	14	
HSP90	89	≤ 50%	53	14	0.162
		> 50%	14	8	
rpS6-Kinase	89	0%	34	14	0.333
		≥ 1%	33	8	
CD45 on connective tissue	89	1-2	39	12	0.807
		3	28	10	
HLADR	89	0%	32	8	0.46
		≥ 1%	35	14	
BRAF	89	Wt	62	17	0.112
		Mut	5	5	
KRAS	89	Wt	43	15	0.801
		Mut	24	7	

Tabelle 85: Primärtumor, CD44v6/MUC1: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.

**CD44v6 >50% and HGFR >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	89	0%	28	29	0.659
		≥ 1%	18	14	
HGFR	89	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
IGF1R	89	≤ 80%	17	18	0.669
		> 80%	29	25	
EGFR	89	≤ 50%	25	16	0.137
		> 50%	21	27	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	20	14	0.383
		> 30%	26	29	
HSP90	89	≤ 50%	41	26	<b>0.003</b>
		> 50%	5	17	
rpS6-Kinase	89	0%	26	22	0.673
		≥ 1%	20	21	
CD45 on connective tissue	89	1-2	26	25	1.0
		3	20	18	
HLADR	89	0%	23	17	0.395
		≥ 1%	23	26	
BRAF	89	Wt	43	36	0.188
		Mut	3	7	
KRAS	89	Wt	33	25	0.191
		Mut	13	18	

*Tabelle 86: Primärtumor, CD44v6/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**CD44v6 >50% and IGF1R >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	89	0%	31	26	0.07
		≥ 1%	24	8	
HGFR	89	≤ 80%	13	9	0.804
		> 80%	42	25	
IGF1R	89	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
EGFR	89	≤ 50%	28	13	0.279
		> 50%	27	21	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	22	12	0.823
		> 30%	33	22	
HSP90	89	≤ 50%	43	24	0.456
		> 50%	12	10	
rpS6-Kinase	89	0%	32	16	0.383
		≥ 1%	23	18	
CD45 on connective tissue	89	1-2	33	18	0.66
		3	22	16	
HLADR	89	0%	24	16	0.828
		≥ 1%	31	18	
BRAF	89	Wt	50	29	0.497
		Mut	5	5	
KRAS	89	Wt	34	24	0.494
		Mut	21	10	

*Tabelle 87: Primärtumor, CD44v6/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**CD44v6 >50% and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	89	0%	47	10	0.421
		≥ 1%	24	8	
HGFR	89	≤ 80%	21	1	<b>0.036</b>
		> 80%	50	17	
IGF1R	89	≤ 80%	27	8	0.788
		> 80%	44	10	
EGFR	89	≤ 50%	35	6	0.293
		> 50%	36	12	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	30	4	0.175
		> 30%	41	14	
HSP90	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	89	0%	38	10	1.0
		≥ 1%	33	8	
CD45 on connective tissue	89	1-2	40	11	0.794
		3	31	7	
HLADR	89	0%	32	8	1.0
		≥ 1%	39	10	
BRAF	89	Wt	66	13	<b>0.026</b>
		Mut	5	5	
KRAS	89	Wt	45	13	0.586
		Mut	26	5	

*Tabelle 88: Primärtumor, CD44v6/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**MUC1 positive and HGFR >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%	22	9	0.621
		> 50%	44	14	
MUC1	89	0%		entfällt	
HGFR	89	≥ 1%			entfällt
		≤ 80%			
IGF1R	89	> 80%	22	13	0.081
		≤ 80%	44	10	
EGFR	89	≤ 50%	32	9	0.476
		> 50%	34	14	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	22	12	0.137
		> 30%	44	11	
HSP90	89	≤ 50%	52	15	0.261
		> 50%	14	8	
rpS6-Kinase	89	0%	34	14	0.476
		≥ 1%	32	9	
CD45 on connective tissue	89	1-2	36	15	0.466
		3	30	8	
HLADR	89	0%	32	8	0.332
		≥ 1%	34	15	
BRAF	89	Wt	61	18	0.117
		Mut	5	5	
KRAS	89	Wt	45	13	0.322
		Mut	21	10	

*Tabelle 89: Primärtumor, MUC1/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**MUC1 positive and IGF1R >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%	25	6	0.548
		> 50%	50	8	
MUC1	89	0% ≥ 1%		entfällt	
HGFR	89	≤ 80%	18	4	0.741
		> 80%	57	10	
IGF1R	89	≤ 80% > 80%		entfällt	
EGFR	89	≤ 50%	36	5	0.561
		> 50%	39	9	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	28	6	0.768
		> 30%	47	8	
HSP90	89	≤ 50%	56	11	1.0
		> 50%	19	3	
rpS6-Kinase	89	0% ≥ 1%	40 35	8 6	1.0
CD45 on connective tissue	89	1-2	46	5	0.087
		3	29	9	
HLADR	89	0% ≥ 1%	36 39	4 10	0.245
BRAF	89	Wt Mut	67 8	12 2	0.654
KRAS	89	Wt	48	10	0.763
		Mut	27	4	

*Tabelle 90: Primärtumor, MUC1/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**MUC1 positive and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%	31	0	<b>0.047</b>
		> 50%	50	8	
MUC1	89	0% ≥ 1%		entfällt	
HGFR	89	≤ 80%	22	0	0.192
		> 80%	59	8	
IGF1R	89	≤ 80%	30	5	0.255
		> 80%	51	3	
EGFR	89	≤ 50%	39	2	0.279
		> 50%	42	6	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	32	2	0.705
		> 30%	49	6	
HSP90	89	≤ 50% > 50%		entfällt	
rpS6-Kinase	89	0% ≥ 1%	43 38	5 3	0.721
CD45 on connective tissue	89	1-2 3	46 35	5 3	1.0
HLADR	89	0% ≥ 1%	38 43	2 6	0.287
BRAF	89	Wt Mut	74 7	5 3	<b>0.043</b>
KRAS	89	Wt Mut	52 29	6 2	0.708

Tabelle 91: Primärtumor, MUC1/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.

**HGFR >80% and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%	27	4	0.116
		> 50%	41	17	
MUC1	89	0%	44	13	0.801
		≥ 1%	24	8	
HGFR	89	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
IGF1R	89	≤ 80%	27	8	1.0
		> 80%	41	13	
EGFR	89	≤ 50%	33	8	0.46
		> 50%	35	13	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	27	7	0.798
		> 30%	41	14	
HSP90	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	89	0%	35	13	0.46
		≥ 1%	33	8	
CD45 on connective tissue	89	1-2	38	13	0.801
		3	30	8	
HLADR	89	0%	30	10	0.806
		≥ 1%	38	11	
BRAF	89	Wt	62	17	0.238
		Mut	6	4	
KRAS	89	Wt	43	15	0.604
		Mut	25	6	

*Tabelle 92: Primärtumor, HGFR/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**IGF1R >80% and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	89	≤ 50%	27	4	0.763
		> 50%	48	10	
MUC1	89	0%	46	11	0.363
		≥ 1%	29	3	
HGFR	89	≤ 80%	21	1	0.174
		> 80%	54	13	
IGF1R	89	≤ 80%		entfällt	
EGFR	89	≤ 50%	35	6	1.0
		> 50%	40	8	
KI67 LI (Labeling index)	89	≤ 30%	28	6	0.768
		> 30%	47	8	
HSP90	89	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	89	0%	41	7	0.778
		≥ 1%	34	7	
CD45 on connective tissue	89	1-2	44	7	0.57
		3	31	7	
HLADR	89	0%	34	6	1.0
		≥ 1%	41	8	
BRAF	89	Wt	68	11	0.189
		Mut	7	3	
KRAS	89	Wt	47	11	0.363
		Mut	28	3	

*Tabelle 93: Primärtumor, IGF1R/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

5.3.7 Tabellen: Lebermetastasen, Doppelmarker mit klin.-path. Faktoren

**CD44v6 >50% and MUC1 positive:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	29	8	0.512
	female		19	3	
Age (mean)	≤ 62.6	59	23	2	0.097
	> 62.6		25	9	
Number of LM	1	56	16	2	0.474
	> 1		30	8	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	30	5	0.298
	> 3.93 cm		15	6	
Lokalization PT*	Right	53	14	2	1.0
	Left		31	6	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	10	2	1.0
	Yes		38	9	
Extrahepatic metastasis	No	59	30	5	0.382
	Yes		18	6	
Recurrence/Progress	No	59	19	3	0.512
	Yes		29	8	
Grading LM	G2	55	30	6	0.723
	G3		15	4	
Histological type	Adenocarcinoma	58	42	10	1.0
	Mucinous adenocarcinoma		5	1	
Residual	R0	59	40	7	0.209
	R1-2		8	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	10	3	0.705
	> 3.4 ng/ml		35	8	

Tabelle 94: Lebermetastasen, CD44v6/MUC1: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.  
 \*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50% and HGFR >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	19	18	0.278
	female		15	7	
Age (mean)	≤ 62.6	59	15	10	0.795
	> 62.6		19	15	
Number of LM	1	56	9	9	0.566
	> 1		23	15	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	22	13	0.282
	> 3.93 cm		10	11	
Lokalization PT*	Right	53	8	8	0.368
	Left		24	13	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	6	3	0.72
	Yes		28	22	
Extrahepatic metastasis	No	59	23	12	0.181
	Yes		11	13	
Recurrence/Progress	No	59	15	7	0.278
	Yes		19	18	
Grading LM	G2	55	22	14	0.397
	G3		9	10	
Histological type	Adenocarcinoma	58	31	21	0.387
	Mucinous adenocarcinoma		2	4	
Residual	R0	59	27	20	1.0
	R1-2		7	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	5	8	0.21
	> 3.4 ng/ml		26	17	

Tabelle 95: Lebermetastasen, CD44v6/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50% and IGF1R >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	19	18	0.058
	female		17	5	
Age (mean)	≤ 62.6	59	16	9	0.79
	> 62.6		20	14	
Number of LM	1	56	11	7	1.0
	> 1		23	15	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	22	13	0.576
	> 3.93 cm		11	10	
Lokalization PT*	Right	53	10	6	1.0
	Left		24	13	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	7	2	0.46
	Yes		29	21	
Extrahepatic metastasis	No	59	25	10	0.061
	Yes		11	13	
Recurrence/Progress	No	59	15	7	0.422
	Yes		21	16	
Grading LM	G2	55	24	12	0.247
	G3		9	10	
Histological type	Adenocarcinoma	58	33	19	0.202
	Mucinous adenocarcinoma		2	4	
Residual	R0	59	29	18	1.0
	R1-2		7	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	6	7	0.332
	> 3.4 ng/ml		28	15	

Tabelle 96: Lebermetastasen, CD44v6/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transversal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**CD44v6 >50% and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	28	9	0.749
	female		18	4	
Age (mean)	≤ 62.6	59	19	6	0.762
	> 62.6		27	7	
Number of LM	1	56	15	3	1.0
	> 1		30	8	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	29	6	0.73
	> 3.93 cm		16	5	
Lokalization PT*	Right	53	12	4	1.0
	Left		29	8	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	9	0	0.185
	Yes		37	13	
Extrahepatic metastasis	No	59	32	3	<b>0.004</b>
	Yes		14	10	
Recurrence/Progress	No	59	20	2	0.104
	Yes		26	11	
Grading LM	G2	55	32	4	<b>0.015</b>
	G3		11	8	
Histological type	Adenocarcinoma	58	42	10	0.594
	Mucinous adenocarcinoma		4	2	
Residual	R0	59	39	8	0.113
	R1-2		7	5	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	11	2	0.711
	> 3.4 ng/ml		33	10	

Tabelle 97: Lebermetastasen, CD44v6/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.

\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)

**MUC1 positive and IGF1R >80%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	27	10	0.179
	female		20	2	
Age (mean)	≤ 62.6	59	22	3	0.207
	> 62.6		25	9	
Number of LM	1	56	16	2	0.473
	> 1		29	9	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	28	7	0.748
	> 3.93 cm		16	5	
Lokalization PT*	Right	53	15	1	0.248
	Left		29	8	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	6	3	0.369
	Yes		41	9	
Extrahepatic metastasis	No	59	28	7	1.0
	Yes		19	5	
Recurrence/Progress	No	59	18	4	1.0
	Yes		29	8	
Grading LM	G2	55	31	5	0.161
	G3		13	6	
Histological type	Adenocarcinoma	58	41	11	1.0
	Mucinous adenocarcinoma		5	1	
Residual	R0	59	39	8	0.24
	R1-2		8	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	10	3	1.0
	> 3.4 ng/ml		34	9	

*Tabelle 98: Lebermetastasen, MUC1/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.*

*\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)*

**HGFR >80% and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	28	9	1.0
	female		17	5	
Age (mean)	≤ 62.6	59	20	5	0.758
	> 62.6		25	9	
Number of LM	1	56	13	5	0.736
	> 1		30	8	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	26	9	0.747
	> 3.93 cm		17	4	
Lokalization PT*	Right	53	11	5	0.499
	Left		29	8	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	9	0	0.098
	Yes		36	14	
Extrahepatic metastasis	No	59	31	4	<b>0.012</b>
	Yes		14	10	
Recurrence/Progress	No	59	20	2	0.058
	Yes		25	12	
Grading LM	G2	55	31	5	<b>0.01</b>
	G3		10	9	
Histological type	Adenocarcinoma	58	41	11	0.145
	Mucinous adenocarcinoma		3	3	
Residual	R0	59	37	10	0.453
	R1-2		8	4	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	11	2	0.48
	> 3.4 ng/ml		31	12	

*Tabelle 99: Lebermetastasen, HGFR/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.*

*\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)*

**IGF1R >80% and HSP90 >50%:**

Factor	Groups	n	No	Yes	p
Sex	male	59	27	10	0.767
	female		17	5	
Age (mean)	≤ 62.6	59	19	6	1.0
	> 62.6		25	9	
Number of LM	1	56	13	5	0.751
	> 1		29	9	
Tumor size (mean)	≤ 3.93 cm	56	25	10	0.764
	> 3.93 cm		16	5	
Lokalization PT*	Right	53	11	5	0.736
	Left		28	9	
Neoadjuvant chemotherapy	No	59	9	0	0.095
	Yes		35	15	
Extrahepatic metastasis	No	59	31	4	<b>0.005</b>
	Yes		13	11	
Recurrence/Progress	No	59	18	4	0.372
	Yes		26	11	
Grading LM	G2	55	30	6	<b>0.025</b>
	G3		10	9	
Histological type	Adenocarcinoma	58	41	11	<b>0.034</b>
	Mucinous adenocarcinoma		2	4	
Residual	R0	59	35	12	1.0
	R1-2		9	3	
CEA before surgery	< 3.4 ng/ml	56	10	3	1.0
	> 3.4 ng/ml		32	11	

*Tabelle 100: Lebermetastasen, IGF1R/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit klinisch-pathologischen Faktoren.*

*\*Right = caecum, right and transvesal colon; Left = left colon, sigmoid, rectum (> 10cm ab ano)*

**Hinweis:**

Die Tabellen mit den Korrelationen der Doppelmarker MUC1/HGFR sowie MUC1/HSP90 werden nicht gezeigt, da durch Überschneidungen (MUC1 positive entsprechen den HGFR >80% exprimierenden Gewebeproben) beziehungsweise kleine Fallzahlen keine neuen Ergebnisse demonstriert werden können.

5.3.8 Tabellen: Lebermetastasen, Doppelmarker mit tumorbiologischen Faktoren

**CD44v6 >50% and MUC1 positive:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	59	0%		entfällt	
		≥ 1%			
HGFR	59	≤ 80%	15	0	<b>0.05</b>
		> 80%	33	11	
IGF1R	59	≤ 80%	12	2	1.0
		> 80%	36	9	
EGFR	59	≤ 50%	20	3	0.502
		> 50%	28	8	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	19	1	0.079
		> 30%	29	10	
HSP90	59	≤ 50%	32	8	1.0
		> 50%	16	3	
rpS6-Kinase	59	0%	16	7	0.089
		≥ 1%	32	4	
CD45 on connecting tissue	59	1-2	35	10	0.269
		3	13	1	
HLADR	59	0%	37	4	<b>0.025</b>
		≥ 1%	11	7	
BRAF	58	Wt	47	10	0.19
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	31	6	0.504
		Mut	16	5	

*Tabelle 101: Lebermetastasen, CD44v6/MUC1: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**CD44v6 >50% and HGFR >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	59	0%	31	14	<b>0.004</b>
		≥ 1%	3	11	
HGFR	59	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
IGF1R	59	≤ 80%	10	4	0.354
		> 80%	24	21	
EGFR	59	≤ 50%	17	6	0.06
		> 50%	17	19	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	15	5	0.094
		> 30%	19	20	
HSP90	59	≤ 50%	25	15	0.398
		> 50%	9	10	
rpS6-Kinase	59	0%	10	13	0.107
		≥ 1%	24	12	
CD45 on connective tissue	59	1-2	26	19	1.0
		3	8	6	
HLADR	59	0%	25	16	0.569
		≥ 1%	9	9	
BRAF	58	Wt	33	24	0.431
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	20	17	0.594
		Mut	13	8	

Tabelle 102: Lebermetastasen, CD44v6/HGFR: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.

**CD44v6 >50% and IGF1R >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	59	0%	31	14	<b>0.033</b>
		≥ 1%	5	9	
HGFR	59	≤ 80%	13	2	<b>0.03</b>
		> 80%	23	21	
IGF1R	59	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
EGFR	59	≤ 50%	18	5	0.054
		> 50%	18	18	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	15	5	0.161
		> 30%	21	18	
HSP90	59	≤ 50%	27	13	0.163
		> 50%	9	10	
rpS6-Kinase	59	0%	14	9	1.0
		≥ 1%	22	14	
CD45 on connective tissue	59	1-2	28	17	0.762
		3	8	6	
HLADR	59	0%	25	16	1.0
		≥ 1%	11	7	
BRAF	58	Wt	35	22	0.397
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	21	16	0.579
		Mut	14	7	

*Tabelle 103: Lebermetastasen, CD44v6/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**CD44v6 >50% and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
MUC1	59	0%	35	10	1.0
		≥ 1%	11	3	
HGFR	59	≤ 80%	12	3	1.0
		> 80%	34	10	
IGF1R	59	≤ 80%	11	3	1.0
		> 80%	35	10	
EGFR	59	≤ 50%	19	4	0.54
		> 50%	27	9	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	19	1	<b>0.043</b>
		> 30%	27	12	
HSP90	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	59	0%	17	6	0.748
		≥ 1%	29	7	
CD45 on connective tissue	59	1-2	33	12	0.159
		3	13	1	
HLADR	59	0%	31	10	0.735
		≥ 1%	15	3	
BRAF	58	Wt	45	12	0.224
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	29	8	1.0
		Mut	16	5	

*Tabelle 104: Lebermetastasen, CD44v6/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**MUC1 positive and IGF1R >80%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%	26	3	0.104
		> 50%	21	9	
MUC1	59	0%		entfällt	
		≥ 1%			
HGFR	59	≤ 80%	15	0	<b>0.026</b>
		> 80%	32	12	
IGF1R	59	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
EGFR	59	≤ 50%	21	2	0.103
		> 50%	26	10	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	17	3	0.734
		> 30%	30	9	
HSP90	59	≤ 50%	31	9	0.734
		> 50%	16	3	
rpS6-Kinase	59	0%	16	7	0.185
		≥ 1%	31	5	
CD45 on connective tissue	59	1-2	35	10	0.712
		3	12	2	
HLADR	59	0%	35	6	0.158
		≥ 1%	12	6	
BRAF	58	Wt	46	11	0.207
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	32	5	0.097
		Mut	14	7	

*Tabelle 105: Lebermetastasen, MUC1/IGF1R: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**MUC1 positive and HSP90 >50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%	29	0	0.237
		> 50%	27	3	
MUC1	59	0%		entfällt	
		≥ 1%			
HGFR	59	≤ 80%	15	0	0.564
		> 80%	41	3	
IGF1R	59	≤ 80%	14	0	1.0
		> 80%	42	3	
EGFR	59	≤ 50%	23	0	0.274
		> 50%	33	3	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	20	0	0.544
		> 30%	36	3	
HSP90	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	59	0%	21	2	0.554
		≥ 1%	35	1	
CD45 on connective tissue	59	1-2	42	3	1.0
		3	14	0	
HLADR	59	0%	40	1	0.218
		≥ 1%	16	2	
BRAF	58	Wt	55	2	0.052
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	35	2	1.0
		Mut	20	1	

*Tabelle 106: Lebermetastasen, MUC1/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**HGFR > 80% and HSP90 > 50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%	25	4	0.125
		> 50%	20	10	
MUC1	59	0%	34	11	1.0
		≥ 1%	11	3	
HGFR	59	≤ 80%		entfällt	
		> 80%			
IGF1R	59	≤ 80%	11	3	1.0
		> 80%	34	11	
EGFR	59	≤ 50%	22	1	<b>0.005</b>
		> 50%	23	13	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	18	2	0.109
		> 30%	27	12	
HSP90	59	≤ 50%		entfällt	
		> 50%			
rpS6-Kinase	59	0%	16	7	0.363
		≥ 1%	29	7	
CD45 on connective tissue	59	1-2	32	13	0.152
		3	13	1	
HLADR	59	0%	31	10	1.0
		≥ 1%	14	4	
BRAF	58	Wt	4	13	0.241
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	29	8	0.75
		Mut	15	6	

*Tabelle 107: Lebermetastasen, HGFR/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

**IGF1R > 80% and HSP90 > 50%:**

Factor	n	Groups	No	Yes	p
CD44v6	59	≤ 50%	24	5	0.233
		> 50%	20	10	
MUC1	59	0%	33	12	1.0
		≥ 1%	11	3	
HGFR	59	≤ 80%	11	4	1.0
		> 80%	33	11	
IGF1R	59	≤ 80%		entfällt	
EGFR	59	≤ 50%	20	3	0.126
		> 50%	24	12	
KI67 LI (Labeling index)	59	≤ 30%	18	2	0.064
		> 30%	26	13	
HSP90	59	≤ 50%		entfällt	
rpS6-Kinase	59	> 50%			
		0%	18	5	0.762
≥ 1%	26	10			
CD45 on connective tissue	59	1-2	31	14	0.09
		3	13	1	
HLADR	59	0%	30	11	1.0
		≥ 1%	14	4	
BRAF	58	Wt	43	14	0.259
		Mut	0	1	
KRAS	58	Wt	29	8	0.363
		Mut	14	7	

*Tabelle 108: Lebermetastasen, IGF1R/HSP90: Korrelationen des Doppelmarkers mit tumorbiologischen Faktoren.*

### 5.3.9 Tabellen: Überlebensanalysen

Faktor	Primärtumor			Lebermetastasen		
	Gruppen	n	Prozent p	Gruppen	n	Prozent p
Geschlecht	m / w	89	0.388	m / w	59	0.163
Alter (mean in Jahren)	≤ 68.1	89	0.148	≤ 62.6	59	0.254
Lokalisation PT	rechts / links	89	0.157	rechts / links	53	0.071
Tumordurchmesser (mean)	≤ 4.7 cm	89	0.931	≤ 3.93 cm	56	0.158
Histologie	AdenoCa	89	0.235	AdenoCa	58	0.429
Grading	G1-2 / 3-4	89	0.127	G2 / G3	55	0.008
T - Status	T1-2 / 3-4	89	0.031	--	--	---
N-Status	N0 / 1-2	89	0.001	--	--	---
M-Status	M0 / 1	89	<0.001	--	--	---
UICC	I-II / II-IV	89	<0.001	--	--	---
L-Status	L0 / 1	55	0.002	--	--	---
V-Status	V0 / 1	55	<0.001	--	--	---
Pn-Status	Pn0 / 1	20	0.03	--	--	---
R-Status	R0 / 1-2	89	<0.001	59	59	0.63
CEA präoperativ	< 3.4 ng/ml	86	0.004	56	56	0.819
Fernmetastasen im Verlauf (ohne Lk)	Ja / Nein	89	<0.001	--	--	--
Extrahepatische Fernmetastasen	--	--	--	Ja / Nein	59	0.001
Anzahl Lebermetastasen	--	--	--	1 / >1	56	0.493
Präoperative Chemotherapie	--	--	--	Ja / Nein	56	0.367
KRAS	wt / mut	89	0.86	wt / mut	58	0.534
BRAF	wt / mut	89	<0.001	wt / mut	58	--

Tabelle 109: Primärtumor und Lebermetastasen: Log-Rank-Test der klinisch-pathologischen Faktoren nach Gruppen.

Faktor	Gruppen	n	Primärtumor		Lebermetastasen		
			Log-Rank p	Wilcoxon p	n	Log-Rank p	Wilcoxon p
CD44v6	≤ 50%	89	0.109	0.133	59	0.054	0.006
MUC1	- / +	89	0.917	0.946	59	0.019	0.007
HGFR	≤ 80%	89	0.212	0.313	59	0.584	0.396
IGF1-R	≤ 80%	89	0.752	0.603	59	0.462	0.55
EGFR	≤ 50%	89	0.014	0.018	59	0.56	0.46
HSP90	≤ 50%	89	0.151	0.148	59	0.018	0.019
rpS6K	- / +	89	0.268	0.511	59	0.838	0.653
CD44v6/MUC1	Positiv	89	0.335	0.298	59	0.011	0.002
CD44v6/HGFR	Positiv	89	0.048	0.095	59	0.087	0.008
CD44v6/IGF1R	Positiv	89	0.053	0.039	59	0.098	0.017
CD44v6/rpS6	Positiv	89	0.299	0.601	59	0.319	0.186
CD44v6/HSP90	Positiv	89	0.031	0.036	59	<0.001	<0.001
MUC1/HGFR	Positiv	89	0.795	0.829	59	0.019	0.007
MUC1/IGF1R	Positiv	89	0.791	0.482	59	0.069	0.018
MUC1/rpS6	Positiv	89	0.602	0.45	59	0.038	0.024
MUC1/HSP90	Positiv	89	0.034	0.015	59	<0.001	<0.001
HGFR/IGF1R	Positiv	89	0.614	0.606	59	0.289	0.262
HGFR/rpS6	Positiv	89	0.477	0.943	59	0.735	0.926
HGFR/HSP90	Positiv	89	0.367	0.423	59	0.016	0.007
IGF1R/rpS6	Positiv	89	0.291	0.366	59	0.313	0.695
IGF1R/HSP90	Positiv	89	0.466	0.395	59	0.003	0.011

*Tabelle 110: Primärtumoren und Lebermetastasen: Gegenüberstellung Log-Rank-Test und Wilcoxon-Test bei der Überlebensanalyse nach prozentualer Expression der tumorbiologischen Faktoren.*

Faktor	Gruppen	Primärtumoren		Lebermetastasen	
		n	p	n	p
CD44v6	0-1 / 2-3	89	0.249	59	0.856
MUC1	0-1 / 2	89	0.567	59	0.049
HGFR	0-2 / 3	89	0.211	59	0.598
IGF1-R	0-1 / 2-3	89	0.845	59	0.445
EGFR	0-1 / 2-3	89	0.049	59	0.774
HSP90	0-1 / 2-3	89	0.598	59	0.083
rpS6K	0-1 / 2	89	0.793	59	0.681

*Tabelle 111: Primärtumoren und Lebermetastasen: Log-Rank-Test der Intensität des Expressionsmusters der tumorbiologischen Faktoren.*

### 5.3.10 Tabellen: Subgruppenanalysen

#### Subgruppe Primärtumore: KRAS mutiert (n=31)

Faktor	Korrelationen (Exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	mit Grading 3-4: p=0.032	0.832
MUC1	ns	0.036
HSP90	ns	0.868
HGFR	mit rpS6 >50%: p=0.012	0.302
IGF1-R	ns	0.935
EGFR	ns	0.328
rpS6	mit HGFR >80%: p=0.012	0.682
CD44v6/MUC1	ns	0.149
CD44v6/HGFR	ns	0.8
CD44v6/IGF1-R	mit MUC1 pos: p=0.046	0.528
CD44v6/HSP90	ns	0.986
CD44v6/rpS6	ns	0.526
MUC1/HGFR	ns	0.062
MUC1/IGF1-R	ns	0.284
MUC1/HSP90	ns	0.402
MUC1/rpS6	ns	0.196
HGFR/IGF1-R	ns	0.948
HGFR/HSP90	ns	0.868
HGFR/rpS6	ns	0.682
IGF1-R/HSP90	ns	0.392
IGF1-R/rpS6	ns	0.815
BRAF	--	--
KRAS	--	--

Tabelle 112: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe KRAS-mutierter Tumoren. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe Primärtumore: Rechtsseitiges Kolonkarzinom (n=42)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	ns	0.524
MUC1	mit Geschlecht: p=0.027	0.715
HSP90	ns	0.04
HGFR	Tu-Durchmesser >4,7cm: p=0.032	0.228
IGF1-R	ns	0.873
EGFR	ns	0.029
rpS6	ns	0.179
CD44v6/MUC1	mit Geschlecht: p=0.019	0.94
CD44v6/HGFR	ns	0.191
CD44v6/IGF1-R	ns	0.577
CD44v6/HSP90	mit L1: p=0.023	0.023
CD44v6/rpS6	ns	0.311
MUC1/HGFR	mit Alter (mean): p=0.026 und HSP90 >50%: p=0.02	0.682
MUC1/IGF1-R	ns	0.83
MUC1/HSP90	ns	0.252
MUC1/rpS6	ns	0.672
HGFR/IGF1-R	ns	0.605
HGFR/HSP90	ns	0.171
HGFR/rpS6	ns	0.346
IGF1-R/HSP90	ns	0.303
IGF1-R/rpS6	ns	0.141
BRAF	ns	0.007
KRAS	ns	0.876

Tabelle 113: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit ausschließlich linksseitigen Primärtumoren. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe Primärtumore: Linksseitiges Kolonkarzinom (n=47)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	mit Alter (mean): p=0.041 und KI67 LI >30%: p=0.03	0.259
MUC1	mit N1-2: p=0.027 (und UICC p=0.024)	0.978
HSP90	mit HGFR >80%: p=0.044	0.968
HGFR	mit HSP90 >50%: p=0.044	0.62
IGF1-R	ns	0.4
EGFR	ns	0.418
rpS6	ns	0.807
CD44v6/MUC1	mit N1-2: p=0.019 (und UICC p=0.047)	0.286
CD44v6/HGFR	ns	0.296
CD44v6/IGF1-R	ns	0.028
CD44v6/HSP90	mit G 3-4: p=0.013 und BRAF mut: p=0.033	0.568
CD44v6/rpS6	ns	0.953
MUC1/HGFR	ns	0.636
MUC1/IGF1-R	ns	0.401
MUC1/HSP90	ns	0.142
MUC1/rpS6	ns	0.794
HGFR/IGF1-R	ns	0.483
HGFR/HSP90	ns	0.986
HGFR/rpS6	ns	0.971
IGF1-R/HSP90	ns	0.628
IGF1-R/rpS6	ns	0.801
BRAF	ns	0.142
KRAS	ns	0.805

Tabelle 114: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit ausschließlich rechtsseitigen Primärtumoren. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe Primärtumore: junge Patienten bis 60 Jahre (n=22)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	ns	0.516
MUC1	ns	0.839
HSP90	ns	0.09
HGFR	ns	0.469
IGF1-R	ns	0.14
EGFR	ns	0.469
rpS6	ns	0.98
CD44v6/MUC1	mit N1-2: p=0.035 und UICC: p=0.04 mit BRAF mut: p=0.024	0.729
CD44v6/HGFR	ns	0.489
CD44v6/IGF1-R	mit M1: p=0.039	0.042
CD44v6/HSP90	ns	0.033
CD44v6/rpS6	ns	0.717
MUC1/HGFR	ns	0.773
MUC1/IGF1-R	ns	0.982
MUC1/HSP90	ns	0.002
MUC1/rpS6	ns	0.226
HGFR/IGF1-R	ns	0.134
HGFR/HSP90	ns	0.443
HGFR/rpS6	ns	0.777
IGF1-R/HSP90	ns	0.023
IGF1-R/rpS6	ns	0.375
BRAF	mit G3-4: p=0.005 mit L1: p=0.029	0.007
KRAS	ns	0.799

Tabelle 115: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit Patienten die zum Zeitpunkt der initialen Tumorresektion maximal 60 Jahre alt waren. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe Primärtumore: ältere Patienten ab 75 Jahre (n=17)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	ns	0.895
MUC1	ns	0.195
HSP90	ns	0.783
HGFR	mit KRAS mut: p=0.044	0.225
IGF1-R	mit KRAS mut: p=0.004 mit KI67 LI >30%: p=0.015	0.5
EGFR	ns	0.293
rpS6	ns	0.4
CD44v6/MUC1	ns	0.25
CD44v6/HGFR	ns	0.413
CD44v6/IGF1-R	ns	0.875
CD44v6/HSP90	ns	0.783
CD44v6/rpS6	ns	0.542
MUC1/HGFR	ns	0.312
MUC1/IGF1-R	mit KI67 LI >30%: p=0.029	0.646
MUC1/HSP90	ns	0.405
MUC1/rpS6	ns	0.333
HGFR/IGF1-R	ns	0.875
HGFR/HSP90	ns	0.783
HGFR/rpS6	ns	0.202
IGF1-R/HSP90	ns	0.646
IGF1-R/rpS6	ns	0.468
BRAF	ns	0.061
KRAS	ns	0.168
<b>Überlebensanalyse junge vs. ältere Patienten</b>		<b>0.618</b>

Tabelle 116: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit Patienten die zum Zeitpunkt der initialen Tumorresektion über 75 Jahre alt waren. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe Primärtumore: Schlecht differenzierte Tumoren G3-4 (n=32)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	ns	0.584
MUC1	ns	0.259
HSP90	ns	0.056
HGFR	ns	0.29
IGF1-R	ns	0.533
EGFR	ns	0.025
rpS6	ns	0.415
CD44v6/MUC1	ns	0.118
CD44v6/HGFR	ns	0.309
CD44v6/IGF1-R	ns	0.498
CD44v6/HSP90	ns	0.056
CD44v6/rpS6	ns	0.602
MUC1/HGFR	ns	0.066
MUC1/IGF1-R	ns	0.309
MUC1/HSP90	ns	0.001
MUC1/rpS6	ns	0.953
HGFR/IGF1-R	ns	0.599
HGFR/HSP90	ns	0.212
HGFR/rpS6	ns	0.679
IGF1-R/HSP90	ns	0.057
IGF1-R/rpS6	ns	0.496
BRAF	ns	0.012
KRAS	ns	0.234

Tabelle 117: Primärtumore: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit ausschließlich schlecht differenzierten Primärtumoren (G 3 und G4). Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

Subgruppe multiplen Lebermetastasen (n=30)

Faktor	Korrelationen (exakter Test nach Fisher)	Überlebensanalyse (Log-Rank, P-Wert)
CD44v6	mit HSP90 >50%: p=0.031	0.262
MUC1	mit rpS6 pos: p=0.028 mit HLADR pos: p=0.034	0.065
HSP90	mit extrahep. Metastasierung: p=0.004 mit G3-4: p=0.008 mit CD44v6 >50%: p=0.031	0.018
HGFR	ns	0.218
IGF1-R	mit EGFR >50%: p=0.004	0.752
EGFR	mit IGF1-R >80%: p=0.004	0.416
rpS6	mit MUC1 pos: p=0.028	0.639
CD44v6/MUC1	mit HLADR pos: p=0.006 mit rpS6 pos: p=0.047	0.03
CD44v6/HGFR	ns	0.173
CD44v6/IGF1-R	mit HSP90 >50%: p=0.004 mit EGFR >50%: p=0.023	0.315
CD44v6/HSP90	mit extrahep. Metastasierung: p=0.016 mit G3-4: p=0.033	0.002
CD44v6/rpS6	ns	0.624
MUC1/HGFR	siehe MUC1	0.065
MUC1/IGF1-R	ns	0.275
MUC1/HSP90	ns	<0.001
MUC1/rpS6	ns	0.048
HGFR/IGF1-R	ns	0.515
HGFR/HSP90	mit extrahep. Metastasierung: p=0.016 mit G3-4: p=0.003	0.035
HGFR/rpS6	ns	0.704
IGF1-R/HSP90	mit extrahep. Metastasierung: p=0.004 mit G3-4: p=0.008 mit CD44v6 >50%: p=0.031	0.018
IGF1-R/rpS6	ns	0.629
BRAF	--	--
KRAS	ns	0.232

Tabelle 118: Lebermetastasen: Signifikante Korrelationen des Exakten Test nach Fisher und Log-Rank-Test in der Subgruppe mit ausschließlich R0-resezierten multiplen Lebermetastasen. Die P-Werte der Korrelationen berechnen sich aus dem Faktor/Biomarker in Spalte 1 und der jeweils in der 2. Spalte aufgeführten Variable. ns= nicht signifikant

## 6 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
2. WHO, *Leading causes of death in Europe - Fact Sheet*. <http://www.euro.who.int/>, 2016.
3. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. RKI Berlin, 2016.
4. Brenner, H., et al., *Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies*. Gut, 2007. **56**(11): p. 1585-9.
5. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
6. Levine, A.J., et al., *Cancer risks for the relatives of colorectal cancer cases with a methylated MLH1 promoter region: data from the Colorectal Cancer Family Registry*. Cancer Prev Res (Phila), 2012. **5**(2): p. 328-35.
7. Foulkes, W.D., *A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome*. QJM, 1995. **88**(12): p. 853-63.
8. Vasen, H.F., et al., *Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families*. The International Collaborative Group on HNPCC. Dis Colon Rectum, 1993. **36**(1): p. 1-4.
9. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and D. Krebshilfe), *S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2014*, AWMF.
10. Fielding, L.P., et al., *Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT)*. J Gastroenterol Hepatol, 1991. **6**(4): p. 325-44.
11. Søreide O., N.J., Fielding L.P., Silen W., *International Standardization and Documentation of the Treatment of Rectal Cancer*. Rectal Cancer Surgery. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997.
12. Nelson, H., et al., *Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(8): p. 583-96.
13. Kato, T., et al., *Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions*. Dis Colon Rectum, 2003. **46**(10 Suppl): p. S22-31.
14. Scheele, J., et al., *[Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection?]*. Chirurg, 2001. **72**(5): p. 547-60.
15. Fong, Y., et al., *Liver resection for colorectal metastases*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 938-46.
16. Nordlinger, B., et al., *Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients*. Association Francaise de Chirurgie. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1254-62.
17. Andre, T., 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**(19): p. 3109-16.
18. Kuebler, J.P., et al., *Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07*. J Clin Oncol, 2007. **25**(16): p. 2198-204.
19. Andre, T., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2343-51.
20. Quasar Collaborative, G., et al., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study*. Lancet, 2007. **370**(9604): p. 2020-9.
21. Gill, S., 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**(10): p. 1797-806.

22. Giacchetti, S., et al., *Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 136-47.
23. de Gramont, A., et al., *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2938-47.
24. Van Cutsem, E., et al., *Oral capecitabine vs intravenous 5-fluorouracil and leucovorin: integrated efficacy data and novel analyses from two large, randomised, phase III trials*. Br J Cancer, 2004. **90**(6): p. 1190-7.
25. Parks, R., et al., *Adjuvant chemotherapy improves survival after resection of hepatic colorectal metastases: analysis of data from two continents*. J Am Coll Surg, 2007. **204**(5): p. 753-61; discussion 761-3.
26. Falcone, A., et al., *Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest*. J Clin Oncol, 2007. **25**(13): p. 1670-6.
27. Van Cutsem E., M.N., I. Lang, S. Cascinu, I. Shchepotin, J. Maurel, P. Rougier, D. Cunningham, J. Nippgen, C. Köhne, *Randomized phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): The CRYSTAL trial*. J Clin Oncol, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007.
28. E. Van Cutsem, I.L., G. D'haens, V. Moiseyenko, J. Zaluski, G. Folprecht, S. Tejpar, O. Kisker, C. Stroh, P. Rougier, *KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience*. J Clin Oncol, 2008. **26**.
29. Heinemann, V., et al., *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(10): p. 1065-75.
30. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803*. J Clin Oncol, 2007. **25**(23): p. 3456-61.
31. Van Cutsem E., R.L., D. Hossfeld, G. Bodoky, A. Roth, E. Aranda, B. Nordlinger, S. Assadourian, K. Wang, D. Cunningham, PETACC 3, *Randomized phase III trial comparing infused irinotecan / 5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (IF) versus 5-FU/FA (F) in stage III colon cancer patients (pts). (PETACC 3)*. Journal of Clinical Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, 2005. **23**(16S, Part I of II (June 1 Supplement))
32. Saltz, L.B., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
33. Di Fiore, F., et al., *Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy*. Br J Cancer, 2007. **96**(8): p. 1166-9.
34. Lievre, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
35. Inno, A., et al., *Is there a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer?* Clin Colorectal Cancer, 2011. **10**(4): p. 325-32.
36. De Roock, W., et al., *Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. JAMA, 2010. **304**(16): p. 1812-20.
37. Ogino, S., et al., *KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7322-9.
38. Loupakis, F., et al., *KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(4): p. 715-21.

39. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study*. Br J Cancer, 2001. **85**(5): p. 692-6.
40. Rauen, K.A., *Cardiofaciocutaneous Syndrome*, in *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
41. Tie, J. and J. Desai, *Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies*. Target Oncol, 2015. **10**(2): p. 179-88.
42. Pietrantonio, F., et al., *Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis*. Eur J Cancer, 2015. **51**(5): p. 587-94.
43. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
44. Seetharam, R.N., et al., *Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells*. Anticancer Res, 2010. **30**(7): p. 2531-8.
45. Viguier, J., et al., *ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6212-7.
46. Arango, D., et al., *Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells*. Br J Cancer, 2004. **91**(11): p. 1931-46.
47. Shen, M.R., I.M. Jones, and H. Mohrenweiser, *Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 604-8.
48. Park DJ, S.J., Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz H-J., *ERCC1 polymorphism is associated with differential ERCC1 gene expression*. ASCO Proceedings, 2002.
49. Todaro, M., et al., *CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(3): p. 342-56.
50. Tolg, C., et al., *Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(5): p. 1225-9.
51. Herrlich, P., S. Pals, and H. Ponta, *CD44 in colon cancer*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(7-8): p. 1110-2.
52. Tremmel, M., et al., *A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis*. Blood, 2009. **114**(25): p. 5236-44.
53. E. Cavallo, P.A., M. de Miguel, C. Jungels, P Nunciforo, P. Ehmer, K. Bender, K. Dembowski, *A Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Dose Escalation and Expansion, Phase I/Ib Study of AMC303 as Monotherapy in Patients With Advanced or Metastatic, Malignant Solid Tumour of Epithelial Origin*. Clinical Trials Register NCT01186861, 2017. **Poster**: [https://amcure.com/wp-content/uploads/ESMO-2017-Poster\\_Final.jpg](https://amcure.com/wp-content/uploads/ESMO-2017-Poster_Final.jpg).
54. Kufe, D.W., *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(12): p. 874-85.
55. Rodon, J., et al., *Cantuzumab mertansine in a three-times a week schedule: a phase I and pharmacokinetic study*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **62**(5): p. 911-9.
56. Saeland, E., et al., *Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 117-28.
57. Pedersen, J.W., et al., *Cancer-associated autoantibodies to MUC1 and MUC4--a blinded case-control study of colorectal cancer in UK collaborative trial of ovarian cancer screening*. Int J Cancer, 2014. **134**(9): p. 2180-88.
58. Comoglio, P.M., S. Giordano, and L. Trusolino, *Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(6): p. 504-16.
59. Abounader, R., et al., *Regulation of c-Met-dependent gene expression by PTEN*. Oncogene, 2004. **23**(57): p. 9173-82.

60. Huang, F., L.A. Xu, and S. Khambata-Ford, *Correlation between gene expression of IGF-1R pathway markers and cetuximab benefit in metastatic colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(4): p. 1156-66.
61. Shiratsuchi, I., et al., *Expression of IGF-1 and IGF-1R and their relation to clinicopathological factors in colorectal cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(7): p. 2541-5.
62. Takahari, D., et al., *Relationships of insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor expression to clinical outcomes in patients with colorectal cancer*. Oncology, 2009. **76**(1): p. 42-8.
63. Bertrand, F.E., et al., *Synergy between an IGF-1R antibody and Raf/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in suppressing IGF-1R-mediated growth in hematopoietic cells*. Leukemia, 2006. **20**(7): p. 1254-60.
64. Vincent, A.M. and E.L. Feldman, *Control of cell survival by IGF signaling pathways*. Growth Horm IGF Res, 2002. **12**(4): p. 193-7.
65. Qu, X., et al., *Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy*. Oncotarget, 2017. **8**(17): p. 29501-29518.
66. Singh, P., J.M. Alex, and F. Bast, *Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer*. Med Oncol, 2014. **31**(1): p. 805.
67. Moser, C., et al., *Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(11): p. 2868-78.
68. Caino, M.C., et al., *Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2907-20.
69. Solarova, Z., J. Mojzis, and P. Solar, *Hsp90 inhibitor as a sensitizer of cancer cells to different therapies (review)*. Int J Oncol, 2015. **46**(3): p. 907-26.
70. Proia, D.A. and R.C. Bates, *Ganetespib and HSP90: translating preclinical hypotheses into clinical promise*. Cancer Res, 2014. **74**(5): p. 1294-300.
71. McClellan, A.J., et al., *Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches*. Cell, 2007. **131**(1): p. 121-35.
72. Tavares, M.R., et al., *The S6K protein family in health and disease*. Life Sci, 2015. **131**: p. 1-10.
73. Doscas, M.E., et al., *Inhibition of p70 S6 kinase (S6K1) activity by A77 1726 and its effect on cell proliferation and cell cycle progress*. Neoplasia, 2014. **16**(10): p. 824-34.
74. Bahrami, B.F., et al., *p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update*. J Clin Pathol, 2014. **67**(12): p. 1019-25.
75. Pearce, L.R., et al., *Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1)*. Biochem J, 2010. **431**(2): p. 245-55.
76. Zarcos-Pedrinaci, I., et al., *Factors that influence treatment delay in patients with colorectal cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(22): p. 36728-36742.
77. Maurer, C.A., et al., *Prospective multicenter registration study of colorectal cancer: significant variations in radicality and oncosurgical quality-Swiss Group for Clinical Cancer Research Protocol SAKK 40/00*. Int J Colorectal Dis, 2017. **32**(1): p. 57-74.
78. Patel, A., et al., *Risk factors for metachronous adenoma in the residual colon of patients undergoing curative surgery for colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2017.
79. Rolff, H.C., et al., *The Prognostic and Predictive Value of Soluble Type IV Collagen in Colorectal Cancer: A Retrospective Multicenter Study*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(10): p. 2427-34.
80. Tarpgaard, L.S., et al., *Intact and cleaved plasma soluble urokinase receptor in patients with metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin with or without cetuximab*. Int J Cancer, 2015. **137**(10): p. 2470-7.
81. Lenzi, J., et al., *Impact of procedure volumes and focused practice on short-term outcomes of elective and urgent colon cancer resection in Italy*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64245.

82. Benedix, F., et al., *Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival*. *Dis Colon Rectum*, 2010. **53**(1): p. 57-64.
83. Zlobec, I., et al., *Prognostic and predictive value of TOPK stratified by KRAS and BRAF gene alterations in sporadic, hereditary and metastatic colorectal cancer patients*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(1): p. 151-61.
84. Compton, C.C., Byrd, D.R., Garcia-Aguilar, J., Kurtzman, S.H., Olawaiye, A., Washington, M.K. , *AJCC Cancer Staging Manual - 7th Edition*. American Joint Committee on Cancer, 2010.
85. Green F, P.D., Fleming I, Fritz A, Balch C, Halle D, Morrow M, *AJCC Cancer staging manual 6th edition*. 2002.
86. Musella, V., et al., *Effects of warm ischemic time on gene expression profiling in colorectal cancer tissues and normal mucosa*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53406.
87. McElroy, H.H., M.S. Shih, and A.M. Parfitt, *Producing frozen sections of calcified bone*. *Biotech Histochem*, 1993. **68**(1): p. 50-5.
88. Went, P.T., et al., *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas*. *Hum Pathol*, 2004. **35**(1): p. 122-8.
89. Winter, M.J., et al., *The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2139-48.
90. Melling, N., et al., *High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer*. *J Clin Pathol*, 2016. **69**(3): p. 209-14.
91. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
92. Pernot, S., et al., *Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(14): p. 3738-50.
93. Walsh, M.D., et al., *HLA-DR expression is associated with better prognosis in sporadic Australian clinicopathological Stage C colorectal cancers*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(5): p. 1231-7.
94. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 259-93.
95. Spaulding, D.C. and B.O. Spaulding, *Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors*. *Semin Oncol*, 2002. **29**(5 Suppl 14): p. 45-54.
96. McKay, J.A., et al., *Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(17): p. 2258-64.
97. Spano, J.P., et al., *Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(1): p. 102-8.
98. Chung, K.Y., et al., *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(9): p. 1803-10.
99. Scartozzi, M., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(23): p. 4772-8.
100. Saltz, L.B., et al., *Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(7): p. 1201-8.
101. Spittle, C., et al., *Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma*. *J Mol Diagn*, 2007. **9**(4): p. 464-71.
102. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing*. *J Mol Diagn*, 2005. **7**(3): p. 413-21.
103. Poehlmann, A., et al., *K-ras mutation detection in colorectal cancer using the Pyrosequencing technique*. *Pathol Res Pract*, 2007. **203**(7): p. 489-97.
104. Chang, P.M., et al., *ERCC1 codon 118 C->T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(2): p. 278-83.

105. Ruzzo, A., et al., *Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy*. J Clin Oncol, 2007. **25**(10): p. 1247-54.
106. Stoecklacher, J., et al., *A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 344-54.
107. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
108. Kamikozuru, H., et al., *ERCC1 codon 118 polymorphism is a useful prognostic marker in patients with pancreatic cancer treated with platinum-based chemotherapy*. Int J Oncol, 2008. **32**(5): p. 1091-6.
109. Giorno, R., *A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction*. Diagn Immunol, 1984. **2**(3): p. 161-6.
110. Mayer, B., et al., *Expression of leukocyte cell adhesion molecules on gastric carcinomas: possible involvement of LFA-3 expression in the development of distant metastases*. Int J Cancer, 1995. **64**(6): p. 415-23.
111. *Abbildung: Avidin-Biotin-Komplex (ABC)* <http://ihcgroup2.wikispaces.com/Protocol> (creative commons license).
112. Mengel, M., et al., *Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial*. J Pathol, 2002. **198**(3): p. 292-9.
113. *Qiagen: QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook - EN*. <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=67893a91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en>.
114. *Life Technologies Corporation: Manual for TRIzol® LS Reagent* [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_ls\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf), 2010.
115. Chomczynski, P., *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques, 1993. **15**(3): p. 532-4, 536-7.
116. *New England BioLabs: Optimizing Restriction Endonuclease Reactions*. <https://www.neb.com/protocols/2012/12/07/optimizing-restriction-endonuclease-reactions?device=pdf>.
117. *New England BioLabs: BsrDI - Datasheet*. <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/EA8FA05810194BFEA22CD31018820644/Datacards%20or%20Manuals/R0574Data-sheet-Lot0081206.pdf>.
118. Chen, D.C., et al., *Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping*. J Mol Diagn, 2003. **5**(4): p. 243-9.
119. Fakhrai-Rad, H., N. Pourmand, and M. Ronaghi, *Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms*. Hum Mutat, 2002. **19**(5): p. 479-85.
120. Ronaghi, M., *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing*. Genome Res, 2001. **11**(1): p. 3-11.
121. *Qiagen: Pyrosequencing Technology Handbook*. <https://www.qiagen.com/de/shop/automated-solutions/pyrosequencing/pyromark-q24/#resources>, 2010.
122. *National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).
123. Leslie H. Sobin (Editor), M.K.G.E., Christian Wittekind (Editor), *The TNM Classification of Malignant Tumours 7th edition*. [www.uicc.org](http://www.uicc.org), 2009.
124. Zhang, S., et al., *Technical reproducibility of single-nucleotide and size-based DNA biomarker assessment using DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. J Mol Diagn, 2015. **17**(3): p. 242-50.
125. Quach, N., M.F. Goodman, and D. Shibata, *In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR*. BMC Clin Pathol, 2004. **4**(1): p. 1.

126. Marchetti, A., L. Felicioni, and F. Buttitta, *Assessing EGFR mutations*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(5): p. 526-8; author reply 526-8.
127. Li, W.Q., et al., *BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 2.
128. Petaccia de Macedo, M., et al., *KRAS mutation status is highly homogeneous between areas of the primary tumor and the corresponding metastasis of colorectal adenocarcinomas: one less problem in patient care*. *Am J Cancer Res*, 2017. **7**(9): p. 1978-1989.
129. Mao, C., et al., *Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8065.
130. Slessor, A.A., et al., *The tumour biology of synchronous and metachronous colorectal liver metastases: a systematic review*. *Clin Exp Metastasis*, 2013. **30**(4): p. 457-70.
131. Eckardt, V.F., Bernhard, G., *Nachsorge beim kolorektalen Karzinom: Eine Analyse von Effektivität und Kosten*. *Dt Arztebl*, 1997. **94**: p. A-456-462.
132. Wichmann, M.W., et al., *Results of long-term follow-up after curative resection of Dukes A colorectal cancer*. *World J Surg*, 2002. **26**(6): p. 732-6.
133. Jeffery, G.M., B.E. Hickey, and P. Hider, *Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002(1): p. CD002200.
134. Kievit, J., *Colorectal cancer follow-up: a reassessment of empirical evidence on effectiveness*. *Eur J Surg Oncol*, 2000. **26**(4): p. 322-8.
135. Hermanek, P., Jr., et al., *[Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group]*. *Chirurg*, 1994. **65**(4): p. 287-97.
136. Enblad, P., et al., *The risk of subsequent primary malignant diseases after cancers of the colon and rectum. A nationwide cohort study*. *Cancer*, 1990. **65**(9): p. 2091-100.
137. Chen, W., et al., *Dual Targeting of Insulin Receptor and KIT in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors*. *Cancer Res*, 2017. **77**(18): p. 5107-5117.
138. Apicella, M., et al., *Dual MET/EGFR therapy leads to complete response and resistance prevention in a MET-amplified gastroesophageal xenopatient cohort*. *Oncogene*, 2017. **36**(9): p. 1200-1210.
139. Zhu, Y., et al., *Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 exerts extensive antitumor activity in HER2-positive gastric cancer*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 894.
140. Leto, S.M., et al., *Sustained Inhibition of HER3 and EGFR Is Necessary to Induce Regression of HER2-Amplified Gastrointestinal Carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(24): p. 5519-31.
141. Zhang, C., et al., *The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 enhances nab-paclitaxel antitumor response in experimental gastric cancer*. *Int J Oncol*, 2013. **43**(5): p. 1627-35.
142. Compton, C., et al., *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group*. *Cancer*, 2000. **88**(7): p. 1739-57.
143. Cerottini, J.P., et al., *Prognostic factors in colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 1999. **6**(2): p. 409-14.
144. Zlobec, I., 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**(5): p. 793-800.
145. Peters, G., et al., *IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer*. *Virchows Arch*, 2003. **443**(2): p. 139-45.
146. Gelsomino, F., et al., *Targeting the MET gene for the treatment of non-small-cell lung cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014. **89**(2): p. 284-99.
147. Gisterek, I., et al., *Prognostic role of c-met expression in breast cancer patients*. *Rep Pract Oncol Radiother*, 2011. **16**(5): p. 173-7.
148. Qu, J., et al., *Prognostic Value of E-cadherin-, CD44-, and MSH2-associated Nomograms in Patients With Stage II and III Colorectal Cancer*. *Transl Oncol*, 2017. **10**(2): p. 121-131.
149. Wang, L., et al., *CD44v6 down-regulation is an independent prognostic factor for poor outcome of colorectal carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(11): p. 14283-93.

150. Ngan, C.Y., et al., *A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer*. *J Surg Oncol*, 2007. **95**(8): p. 652-62.
151. Ozawa, M., et al., *Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(2): p. 365-74.
152. Saini, J. and P.K. Sharma, *Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer*. *Curr Drug Targets*, 2018. **19**(13): p. 1478-1490.
153. Dimas, D.T., et al., *The Prognostic Significance of Hsp70/Hsp90 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Anticancer Res*, 2018. **38**(3): p. 1551-1562.
154. Kim, S.H., et al., *High-level expression of Hsp90beta is associated with poor survival in resectable non-small-cell lung cancer patients*. *Histopathology*, 2015. **67**(4): p. 509-19.
155. Wang, J., et al., *High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e62876.
156. Lugli, A., et al., *Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(5): p. 534-9.
157. Khanh do, T., et al., *Transmembrane mucin MUC1 overexpression and its association with CD10(+) myeloid cells, transforming growth factor-beta1 expression, and tumor budding grade in colorectal cancer*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(7): p. 958-64.
158. Catalano, V., et al., *Mucinous histology predicts for poor response rate and overall survival of patients with colorectal cancer and treated with first-line oxaliplatin- and/or irinotecan-based chemotherapy*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(6): p. 881-7.
159. Lakshmanan, I., et al., *Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications*. *J Thorac Oncol*, 2015. **10**(1): p. 19-27.
160. Kamikawa, Y., et al., *Combination of MUC1 and MUC4 expression predicts clinical outcome in patients with oral squamous cell carcinoma*. *Int J Clin Oncol*, 2015. **20**(2): p. 298-307.
161. Sinn, B.V., et al., *Evaluation of Mucin-1 protein and mRNA expression as prognostic and predictive markers after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(9): p. 2316-24.
162. Sandiumenge, A., et al., *Therapy of ventilator-associated pneumonia. A patient-based approach based on the ten rules of "The Tarragona Strategy"*. *Intensive Care Med*, 2003. **29**(6): p. 876-883.
163. Jones, H.E., et al., *Inhibition of insulin receptor isoform-A signalling restores sensitivity to gefitinib in previously de novo resistant colon cancer cells*. *Br J Cancer*, 2006. **95**(2): p. 172-80.
164. Martinelli, E., et al., *Antitumor activity of pimasertib, a selective MEK 1/2 inhibitor, in combination with PI3K/mTOR inhibitors or with multi-targeted kinase inhibitors in pimasertib-resistant human lung and colorectal cancer cells*. *Int J Cancer*, 2013. **133**(9): p. 2089-101.
165. Garcia-Garcia, C., et al., *MEK plus PI3K/mTORC1/2 Therapeutic Efficacy Is Impacted by TP53 Mutation in Preclinical Models of Colorectal Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(24): p. 5499-510.
166. Do, K., et al., *Biomarker-driven phase 2 study of MK-2206 and selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with colorectal cancer*. *Invest New Drugs*, 2015. **33**(3): p. 720-8.
167. Beale, G., et al., *Combined PI3K and CDK2 inhibition induces cell death and enhances in vivo antitumour activity in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2016. **115**(6): p. 682-90.
168. Rupp, U., et al., *Safety and pharmacokinetics of bivatuzumab mertansine in patients with CD44v6-positive metastatic breast cancer: final results of a phase I study*. *Anticancer Drugs*, 2007. **18**(4): p. 477-85.
169. Sauter, A., et al., *Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(4): p. 927-35.
170. Hara, T., et al., *Effect of c-Met and CD44v6 Expression in Resistance to Chemotherapy in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2019. **26**(3): p. 899-906.

171. Fiedler, W., et al., *A phase I study of PankoMab-GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas*. Eur J Cancer, 2016. **63**: p. 55-63.
172. Heublein, S., et al., *Immunoreactivity of the fully humanized therapeutic antibody PankoMab-GEX is an independent prognostic marker for breast cancer patients*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**: p. 50.
173. Li, J., C.A. Sullivan, and L. Harris, *Where do we place PankoMab in the reagents used to study the MUC1 superfamily?* Onkologie, 2009. **32**(5): p. 235-7.
174. Lohmueller, J.J., et al., *Antibodies elicited by the first non-viral prophylactic cancer vaccine show tumor-specificity and immunotherapeutic potential*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31740.
175. *Clinical Trials Register: NCT02134925. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of MUC1 Vaccine in Patients With Newly Diagnosed Advanced Adenomas*. National Cancer Institute (NCI), 2014.
176. Kimura, T., et al., *MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study*. Cancer Prev Res (Phila), 2013. **6**(1): p. 18-26.
177. Hendriks, L.E.L. and A.C. Dingemans, *Heat shock protein antagonists in early stage clinical trials for NSCLC*. Expert Opin Investig Drugs, 2017. **26**(5): p. 541-550.
178. Cardin, D.B., et al., *A Phase II Study of Ganetespib as Second-line or Third-line Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer*. Am J Clin Oncol, 2017.
179. Nagaraju, G.P., et al., *Epigenetic effects of inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) in human pancreatic and colon cancer*. Cancer Lett, 2017. **402**: p. 110-116.
180. Nagaraju, G.P., et al., *Targeting the Janus-activated kinase-2-STAT3 signalling pathway in pancreatic cancer using the HSP90 inhibitor ganetespib*. Eur J Cancer, 2016. **52**: p. 109-19.
181. Nagaraju, G.P., et al., *HSP90 inhibition downregulates thymidylate synthase and sensitizes colorectal cancer cell lines to the effect of 5FU-based chemotherapy*. Oncotarget, 2014. **5**(20): p. 9980-91.
182. Nagaraju, G.P., et al., *Antiangiogenic effects of ganetespib in colorectal cancer mediated through inhibition of HIF-1alpha and STAT-3*. Angiogenesis, 2013. **16**(4): p. 903-17.
183. Cercek, A., et al., *Ganetespib, a novel Hsp90 inhibitor in patients with KRAS mutated and wild type, refractory metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2014. **13**(4): p. 207-12.
184. He, S., et al., *The HSP90 inhibitor ganetespib has chemosensitizer and radiosensitizer activity in colorectal cancer*. Invest New Drugs, 2014. **32**(4): p. 577-86.
185. Landmann, H., et al., *UDP glucuronosyltransferase 1A expression levels determine the response of colorectal cancer cells to the heat shock protein 90 inhibitor ganetespib*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1411.
186. Rouhi, A., et al., *Prospective identification of resistance mechanisms to HSP90 inhibition in KRAS mutant cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(5): p. 7678-7690.
187. Courtin, A., et al., *Emergence of resistance to tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer can be delayed by an upfront combination with the HSP90 inhibitor onalespib*. Br J Cancer, 2016. **115**(9): p. 1069-1077.
188. Miyajima, N., et al., *The HSP90 inhibitor ganetespib synergizes with the MET kinase inhibitor crizotinib in both crizotinib-sensitive and -resistant MET-driven tumor models*. Cancer Res, 2013. **73**(23): p. 7022-33.
189. Van Cutsem, E., et al., *Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(16): p. 4240-50.
190. Tarhini, A.A., et al., *Phase 1/2 study of rilotumumab (AMG 102), a hepatocyte growth factor inhibitor, and erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer*. Cancer, 2017. **123**(15): p. 2936-2944.
191. Glisson, B., et al., *A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 1b/2 Study of Rilotumumab or Ganitumab in Combination With Platinum-Based Chemotherapy as First-Line Treatment for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer*. Clin Lung Cancer, 2017.

192. Pothula, S.P., et al., *Hepatocyte growth factor inhibition: a novel therapeutic approach in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2016. **114**(3): p. 269-80.
193. Zhu, M., et al., *Exposure-response analysis of rilotumumab in gastric cancer: the role of tumour MET expression*. Br J Cancer, 2015. **112**(3): p. 429-37.
194. Doshi, S., et al., *Rilotumumab exposure-response relationship in patients with advanced or metastatic gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(11): p. 2453-61.
195. Pant, S., et al., *A Phase II Study of the c-Met Inhibitor Tivantinib in Combination with FOLFOX for the Treatment of Patients with Previously Untreated Metastatic Adenocarcinoma of the Distal Esophagus, Gastroesophageal Junction, or Stomach*. Cancer Invest, 2017: p. 1-10.
196. Kyriakopoulos, C.E., et al., *A phase I study of tivantinib in combination with temsirolimus in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2017. **35**(3): p. 290-297.
197. Eng, C., et al., *A randomized, placebo-controlled, phase 1/2 study of tivantinib (ARQ 197) in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with wild-type KRAS who have received first-line systemic therapy*. Int J Cancer, 2016. **139**(1): p. 177-86.
198. Bendell, J.C., et al., *A Phase II Randomized Trial (GO27827) of First-Line FOLFOX Plus Bevacizumab with or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer*. Oncologist, 2017. **22**(3): p. 264-271.
199. Brower, V., *Onartuzumab ineffective in non-small-cell lung cancer*. Lancet Oncol, 2017. **18**(2): p. e66.
200. Shah, M.A., et al., *A Randomized Phase II Study of FOLFOX With or Without the MET Inhibitor Onartuzumab in Advanced Adenocarcinoma of the Stomach and Gastroesophageal Junction*. Oncologist, 2016. **21**(9): p. 1085-90.
201. Spigel, D.R., et al., *Results From the Phase III Randomized Trial of Onartuzumab Plus Erlotinib Versus Erlotinib in Previously Treated Stage IIIB or IV Non-Small-Cell Lung Cancer: METLung*. J Clin Oncol, 2017. **35**(4): p. 412-420.
202. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2385-94.
203. Solomon, B.J., et al., *First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(23): p. 2167-77.
204. Funakoshi, Y., et al., *Excessive MET signaling causes acquired resistance and addiction to MET inhibitors in the MKN45 gastric cancer cell line*. Invest New Drugs, 2013. **31**(5): p. 1158-68.
205. Qi, J., et al., *Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors*. Cancer Res, 2011. **71**(3): p. 1081-91.
206. Iams, W.T. and C.M. Lovly, *Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(19): p. 4270-7.
207. Brana, I., et al., *A parallel-arm phase I trial of the humanised anti-IGF-1R antibody dalotuzumab in combination with the AKT inhibitor MK-2206, the mTOR inhibitor ridaforolimus, or the NOTCH inhibitor MK-0752, in patients with advanced solid tumours*. Br J Cancer, 2014. **111**(10): p. 1932-44.
208. Di Cosimo, S., et al., *Combination of the mTOR inhibitor ridaforolimus and the anti-IGF1R monoclonal antibody dalotuzumab: preclinical characterization and phase I clinical trial*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 49-59.
209. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *IGF-1R and mTOR Blockade: Novel Resistance Mechanisms and Synergistic Drug Combinations for Ewing Sarcoma*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(12).
210. Moran, T., et al., *Activity of dalotuzumab, a selective anti-IGF1R antibody, in combination with erlotinib in unselected patients with Non-small-cell lung cancer: a phase I/II randomized trial*. Exp Hematol Oncol, 2014. **3**(1): p. 26.
211. Huang, C.H., et al., *Impact Study: MK-0646 (Dalotuzumab), Insulin Growth Factor 1 Receptor Antibody Combined with Pemetrexed and Cisplatin in Stage IV Metastatic Non-squamous Lung Cancer*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 301.

212. Sclafani, F., et al., *A Randomized Phase II/III Study of Dalotuzumab in Combination With Cetuximab and Irinotecan in Chemorefractory, KRAS Wild-Type, Metastatic Colorectal Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(12): p. djv258.
213. Sclafani, F., et al., *Dalotuzumab in chemorefractory KRAS exon 2 mutant colorectal cancer: Results from a randomised phase II/III trial*. Int J Cancer, 2017. **140**(2): p. 431-439.
214. Puzanov, I., et al., *A phase I study of continuous oral dosing of OSI-906, a dual inhibitor of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors, in patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 701-11.
215. Bendell, J.C., et al., *A phase Ib study of linsitinib (OSI-906), a dual inhibitor of IGF-1R and IR tyrosine kinase, in combination with everolimus as treatment for patients with refractory metastatic colorectal cancer*. Invest New Drugs, 2015. **33**(1): p. 187-93.
216. Cohn, A.L., et al., *A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2013. **24**(7): p. 1777-85.
217. Tabernero, J., et al., *Anticancer activity of the type I insulin-like growth factor receptor antagonist, ganitumab, in combination with the death receptor 5 agonist, conatumumab*. Target Oncol, 2015. **10**(1): p. 65-76.
218. Leighl, N.B., et al., *Phase 2 Study of Erlotinib in Combination With Linsitinib (OSI-906) or Placebo in Chemotherapy-Naive Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer and Activating Epidermal Growth Factor Receptor Mutations*. Clin Lung Cancer, 2017. **18**(1): p. 34-42 e2.
219. Chiappori, A.A., et al., *A Randomized Phase II Study of Linsitinib (OSI-906) Versus Topotecan in Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer*. Oncologist, 2016. **21**(10): p. 1163-1164.
220. *Clinical Trials Register NCT01221077. A Randomized, Double-Blind, Phase 2 Study of Erlotinib (Tarceva®) in Combination With OSI-906 or Placebo in Chemonaive Patients With Advanced NSCLC With Activating Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2010.
221. *Clinical Trials Register NCT01186861. Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Phase 2 Study of Maintenance OSI-906 Plus Erlotinib (Tarceva®), or Erlotinib Plus Placebo in Patients With Nonprogression Following Four Cycles of 1st-line Platinum-based Chemotherapy for Advanced NSCLC*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2010.
222. *Clinical Trials Register: NCT01327612. A Phase 2 Open Label Extension Study of Conatumumab and AMG 479*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2011.
223. *Clinical Trials Register: NCT01708161. A Phase Ib/II Study of the Combination of BYL719 Plus AMG 479 in Adult Patients With Selected Solid Tumors*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2012.
224. *Clinical Trials Register: NCT01609231. A Phase IIA Open Label, Adaptive, Randomized Clinical Trial of Dalotuzumab (MK-0646) Treatment in Combination With Irinotecan Versus Cetuximab and Irinotecan for Patients With Metastatic Rectal Cancers (mRC) Expressing High IGF-1/Low IGF-2 Levels*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2012.
225. *Clinical Trials Register: NCT02057380. A Phase II Open-label Rollover Study for Subjects That Have Participated in an Astellas Sponsored Linsitinib Trial*. Available from: <http://www.clinicaltrials.gov>, 2014.
226. Zhang, Y., et al., *Inhibition of p70S6K1 Activation by Pdc4 Overcomes the Resistance to an IGF-1R/IR Inhibitor in Colon Carcinoma Cells*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(3): p. 799-809.
227. Tallarida, R.J., *The interaction index: a measure of drug synergism*. Pain, 2002. **98**(1-2): p. 163-8.
228. Guo, M., C. You, and J. Dou, *Role of transmembrane glycoprotein mucin 1 (MUC1) in various types of colorectal cancer and therapies: Current research status and updates*. Biomed Pharmacother, 2018. **107**: p. 1318-1325.
229. Lakshminarayanan, V., et al., *MUC1 Vaccines, Comprised of Glycosylated or Non-Glycosylated Peptides or Tumor-Derived MUC1, Can Circumvent Immunoediting to Control Tumor Growth in MUC1 Transgenic Mice*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0145920.