

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Einfluss von Chemotherapie auf onkogene
Signalwege und zielgerichtete Therapien beim
Kolonkarzinom**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christoph Spartalis

aus Wien

2020

**Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. David Horst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Manfred Gross
Prof. Dr. Frank Kolligs
Priv. Doz. Dr. Jutta Nagel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Meinen Eltern

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Christoph Spartalis

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Einfluss von Chemotherapie auf onkogene Signalwege und
zielgerichtete Therapien beim Kolonkarzinom“**

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

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

Hamburg, den 18.12.2020

Christoph Spartalis

INHALTVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Kolonkarzinome	1
1.2. Genese von Kolonkarzinomen und deren Genetik.....	2
1.3 Signalwege in Kolonkarzinomen	5
1.3.1 Der WNT Signalweg	6
1.3.2 MAPK Signalwege	8
1.3.3 Der NOTCH Signalweg.....	10
1.3.4 Detektion von Signalwegen und deren Verteilung in Kolonkarzinomen	12
1.4. Stadien von Kolonkarzinomen	14
1.5. Therapie von Kolonkarzinomen	17
1.5.1. Chirurgische Therapie	17
1.5.2. Systemische Therapie.....	19
1.5.2.1. Chemotherapie.....	19
1.5.2.2. Zielgerichtete Therapie und deren Kombination mit Chemotherapie	20
1.5.3 Effektivität von systemischen Therapien	21
2. Zielsetzung	23
3. Materialien	24
3.1. Chemikalien und Reagenzien	24
3.2. Kits	25
3.3. Antikörper.....	25
3.4. Lösungen	26
3.5. Laborausrüstung.....	26
3.6. Computersoftware	28
4. Methoden.....	29
4.1. Zellkultur.....	29
4.2. STR-Analyse.....	30
4.3. Xenotransplantate und in vivo Behandlung	33
4.4. Chemotherapie und Inhibitor- Behandlung.....	33
4.5. Immunhistochemie.....	34
4.6. Statistische Analysen	35
5. Ergebnisse.....	36

5.1. Begrenzte Effekte von Chemotherapie auf Signalwegaktivitäten in Kolonkarzinomen	36
5.1.1. Effekte von Kurzzeit- Chemotherapie auf die WNT Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.....	37
5.1.2. Der Einfluss von Kurzzeit-Chemotherapie auf die MAPK Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.....	40
5.1.3. Wirkung von Kurzzeit Chemotherapie auf die NOTCH Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.....	42
5.2. Kombination zielgerichteter MAPK und NOTCH Therapie mit 5-FU Chemotherapie	45
5.3. Auswirkung von 5-FU, MAPK und NOTCH Inhibition auf Proliferation und Apoptose	50
5.4. Effekte von 5-FU, MAPK und NOTCH Inhibition auf die Expression von Thymidylat-Synthase	53
6. Diskussion	55
6.1. Effekte von Chemotherapie auf Signalwegaktivitäten in Kolonkarzinomen	56
6.2. Kombination zielgerichteter MAPK und NOTCH Therapie mit 5-FU Chemotherapie	58
6.3 Ausblick.....	61
7. Zusammenfassung.....	63
8. Abkürzungsverzeichnis	64
9. Literaturverzeichnis	65
10. Veröffentlichungen	75
11. Danksagung	76

1. Einleitung

1.1. Kolonkarzinome

Krebs stellt eine der größten gesellschaftlichen Belastungen im Gesundheitssektor dar und war 2015, nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Torre u. a., 2015; Wang u. a., 2016). Es erlagen über 8.6 Millionen Menschen verschiedenen Krebserkrankungen und die Zahl der Todesopfer ist in den Jahren von 2005 bis 2015 um 17% gestiegen (Wang u. a., 2016). Kolonkarzinome gehören mit rund 1.7 Millionen Fällen und 832.000 Sterbefällen im Jahr 2015 zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit (Fitzmaurice u. a., 2017). In den USA werden für das Jahr 2019 51.690 Neuerkrankungen bei Männern und 49.730 bei Frauen erwartet (Siegel u. a., 2019). Weltweit, sowie in Deutschland ist es die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen (Abbildung 1.1) (Robert-Koch-Institut und E.V., 2017; Torre u. a., 2015), die höchste Inzidenz ist in Australien, Nordamerika und Europa zu finden (Torre u. a., 2015). Das Risiko in seinem Leben an Darmkrebs zu erkranken beträgt in den USA etwa 4-5% (Siegel u. a., 2017) und wird durch Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes oder dem Genuss von viel rohem Fleisch mitbestimmt (Huxley u. a., 2009). Trotz eines Rückgangs der Mortalität von Kolonkarzinomen in einer großen Anzahl von Ländern, welcher auf Screening, Reduzierung von Risikofaktoren und/ oder verbesserte Therapie zurückzuführen ist, steigt die Inzidenz in bestimmten Ländern, wie zum Beispiel in Westasien und Osteuropa (Torre u. a., 2015). Daher ist weitere wissenschaftliche Arbeit und Forschung unbedingt nötig, um neue Therapieansätze und Strategien zu entwickeln um damit letztlich Prognose und Heilungschancen zu verbessern.

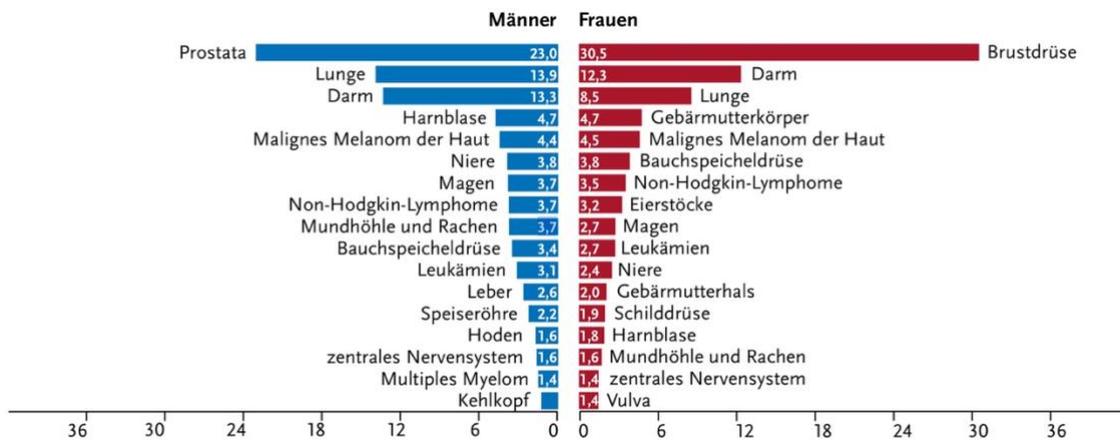


Abbildung 1.1 Häufigkeit von Darmkrebs. Prozentualer Anteil von Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014. Abbildung von Robert-Koch-Institut und E.V., 2017.

1.2. Genese von Kolonkarzinomen und deren Genetik

In den letzten Jahrzehnten konnten die Genetik und Molekularbiologie von Kolonkarzinomen detailliert aufgeklärt werden (Raskov u. a., 2014). Die Entstehung von Krebs und so auch von Kolonkarzinomen ist ein mehrstufiger, länger andauernder Prozess bei dem aus gesunden Gewebezellen Tumorzellen entstehen (Hanahan und Weinberg, 2011). Jeglicher Krebs wird von somatischen Mutationen verursacht die durch endogene Prozesse wie beispielsweise fehlerhafte DNA Reparatur oder exogene Faktoren wie Tabakkonsum entstehen können (Alexandrov u. a., 2013; Stratton u. a., 2009). Ein typischer Tumor beherbergt zwei bis acht durch solche Mutationen veränderte Gene, die sich über einen Zeitraum von 20-30 Jahren entwickeln. Insgesamt wurden rund 140 solcher Tumorgenese fördernden Gene entdeckt (Vogelstein u. a., 2013). Bei Kolonkarzinomen sind für die Entstehung einer malignen Tumorzelle aus einer gesunden Darmepithelzelle mindestens vier bis fünf solche, durch Mutationen veränderter Gene, auch „Driver-Gene“ genannt, notwendig (Fearon und Vogelstein, 1990; Vogelstein u. a., 2013). Diese, durch genetische

Veränderungen entstandene Tumorzellen, weisen verschiedene spezifische Kennzeichen auf, die von Hanahan und Weinberg (2011) als „*Hallmarks of Cancer*“ definiert wurden. Hierbei handelt es sich um sechs erworbene Fähigkeiten, die Tumorzellen während der mehrstufigen Entwicklung von Tumoren erwerben. Diese Fähigkeiten beinhalten das Erhalten von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, invasives Wachstum und Metastasierung, uneingeschränktes Proliferieren, nachhaltige Angiogenese und Verhinderung von Apoptose (Abbildung 1.2).

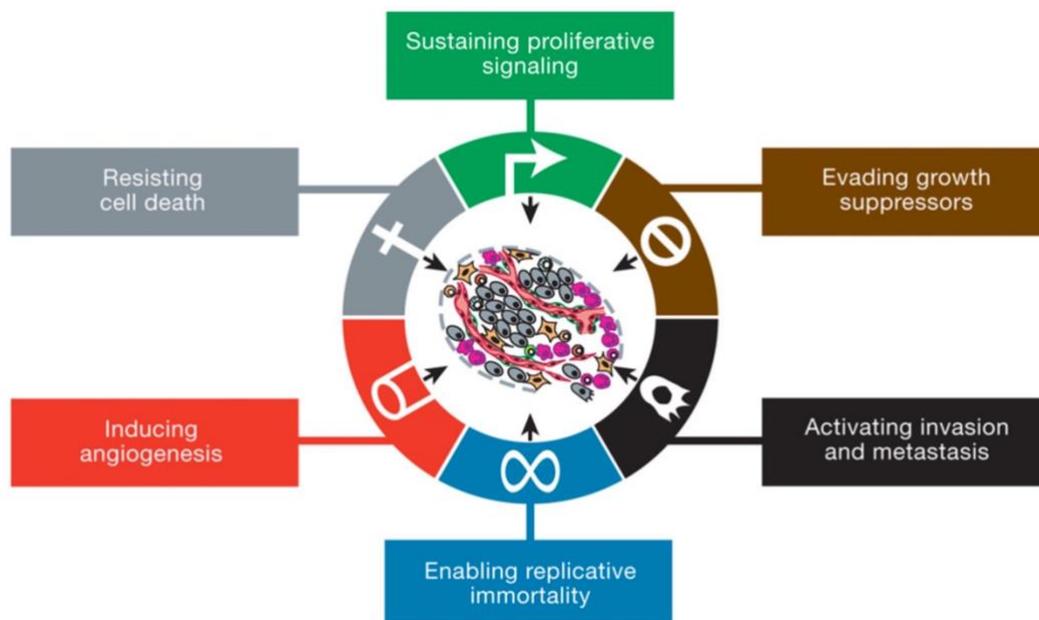


Abbildung 1.2: „*Hallmarks of Cancer*“. Fähigkeiten, die Tumorzellen während des mehrstufigen Prozesses der Tumorbildung entwickeln. Abbildung aus Hanahan und Weinberg, 2011.

Zu diesen Tumorzellen führen spezifische Mutationen von Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen (Hanahan und Weinberg, 2011), und die Mehrheit sporadisch vorkommender Kolonkarzinome ist mit derartigen Mutationen assoziiert (Pancione u. a., 2012). Bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen sind diese Mutationen in dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Abbildung 1.3)

von Fearon und Vogelstein (1990) beschrieben worden. Genauer handelt es sich bei den von Mutationen betroffenen Tumorsuppressor- und Protoonkogenen unter anderen um APC, KRAS, SMAD4 und TP53 (Network u. a., 2012). In mehreren Schritten führen Mutationen der beteiligten Gene zum Voranschreiten des Tumorentstehungsprozesses. Ein frühzeitiger Schlüsselschritt sind Mutationen des APC Tumorsuppressorgens, welche zur Inaktivierung eines Allels führen (Kinzler und Vogelstein, 1996; Rowan u. a., 2000). Der Verlust der Heterozygotie (Loss of heterozygosity, LOH) gilt als ein wichtiger Mechanismus bei der Inaktivierung von einem Allel von bestimmten Tumorsuppressorgenen (Fearon und Vogelstein, 1990). Oft kommt es durch den Verlust der Heterozygotie zur Inaktivierung des zweiten Allels des APC Tumorsuppressorgens (Fearon und Vogelstein, 1990) und dadurch zu einer Überaktivierung des WNT Signalwegs (Müller u. a., 2016). Dies führt zur Entstehung von Adenomen, die ein vermehrt proliferierendes Epithel und leichte Kernatypien aufweisen (Abbildung 1.3) (Jen u. a., 1994). Auch KRAS Mutationen sind eine der frühesten Geschehnisse bei der Entstehung von Kolonkarzinomen und sind bereits in histologisch unauffälligem Epithel nachweisbar (Coppedè u. a., 2014). Solche KRAS Mutationen werden in ca. 40% der Kolonkarzinome gefunden und tragen ebenfalls zur Entstehung von kolorektalen Adenomen bei (Abbildung 1.3), sie sind jedoch nicht zwingend für die Initiation erforderlich (Fearon, 2011). Weiter führt wiederum der LOH Mechanismus zum Funktionsverlust von Gen SMAD4 und so zu einem Voranschreiten des Adenoms in Richtung Karzinom. Auch der Funktionsverlust von TP53 wird dem LOH Mechanismus zugeschrieben (Fearon, 2011). Die Mutation von TP53 führt schließlich dazu, dass die Tumorzellen maligne

Eigenschaften erwerben und ein invasives Karzinom entstehen kann (Abbildung 1.3) (Raskov u. a., 2014; Suppiah und Greenman, 2013). Es wird also deutlich, dass die Entstehung von Kolonkarzinomen ein komplexer Prozess von mehreren Abläufen ist, bei dem verschiedene Gene, damit Proteine und letztlich Signalwege wie zum Beispiel der WNT Signalweg beteiligt sind (Phelps u. a., 2010).

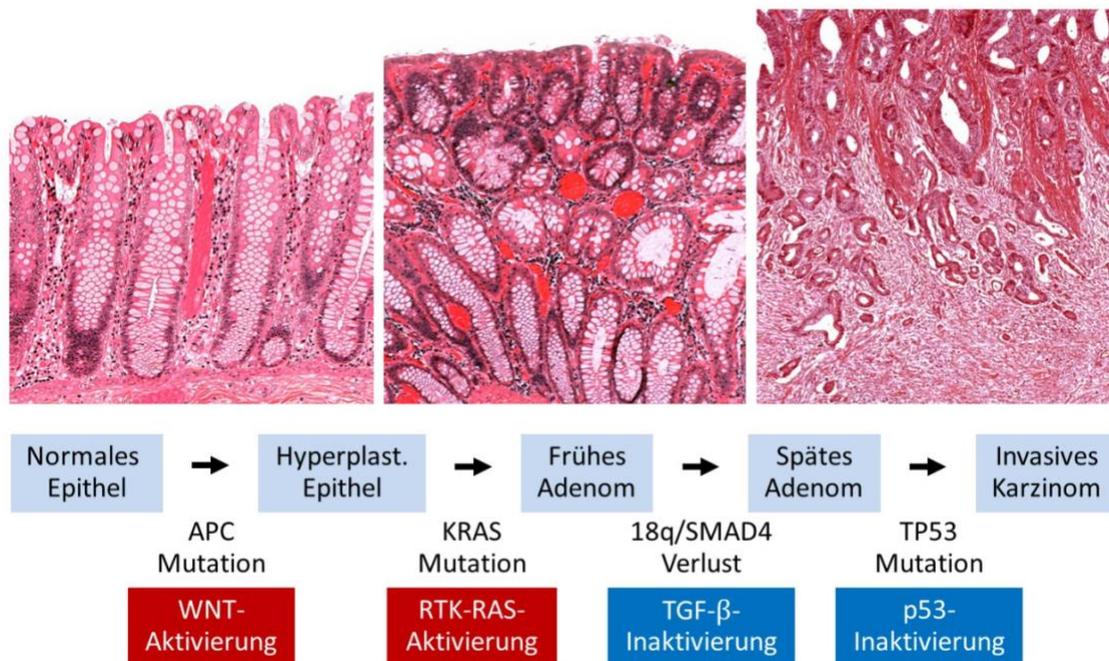


Abbildung 1.3: Entstehung eines Invasiven Karzinoms aus gesundem Kolonepithel: Die Adenom Karzinom Sequenz. Zu sehen sind Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte von gesundem Kolonepithel, einem Adenom und einem invasiven Kolonkarzinom. Darunter sind die Schritte der Mutationen in den unterschiedlichen Tumorsuppressor- und Protoonkogenen dargestellt. In Anlehnung an Fearon und Vogelstein, 1990.

1.3 Signalwege in Kolonkarzinomen

Es gibt viele Signalwege in Kolonkarzinomen, die bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen mitwirken (Van Es u. a., 2005; Rajagopalan u. a., 2002; Segditsas und Tomlinson, 2006). Dabei sind die Proteine der in 1.2 erwähnten Gene, wie das APC Protein oder das G-Protein Ras Bestandteile solcher

Signalwege (siehe auch Abbildung 1.3) (Clevers und Nusse, 2012; Kim und Choi, 2015). Diese Signalwege regulieren Zellproliferation und Differenzierungsprozesse über Zielgene und deren Transkription (Angers und Moon, 2009; Kume, 2009). Im Folgenden soll der Bezug dreier Signalwege zu dem komplexen Prozess der Kolonkarzinomentstehung genauer besprochen werden, weil sie Angriffspunkte zielgerichteter Therapie sein können und außerdem zum Verständnis der durchgeführten Experimente bedeutsam sind. Zudem soll anschließend ein kurzer Überblick über die Möglichkeiten der Analyse der drei Signalwege, sowie deren Eigenschaften gegeben werden.

1.3.1 Der WNT Signalweg

Bei invasiven Kolonkarzinomen sind in über 90% Mutationen von Komponenten des WNT Signalwegs zu finden, welche zu einer Überaktivierung des Signalwegs führen und damit entscheidende Rollen in der Genese von Kolonkarzinomen spielen (Ilyas u. a., 1997; Silva u. a., 2014). Das Schlüsselprotein beim Kolonkarzinom ist das APC Protein, welches in nicht stimulierten Zellen einen Komplex („Destruction-Komplex“) mit Axin, der Proteinkinase GSK3 und Caseinkinase ($CK1\alpha$) bildet und so den proteasomalen Abbau von dem WNT Effektor-Protein β -Catenin fördert (Abbildung 1.4 links) (Bienz und Clevers, 2000). Bei Stimulierung bindet zu Beginn des Signalwegs ein WNT-Signalprotein an den in der Zellmembran sitzenden Rezeptor Frizzled und den Co-Rezeptor LRP in der zu stimulierenden Zelle, das Protein Dishevelled wird rekrutiert und bildet einen Komplex mit Axin. Dadurch wird der Abbau von β -Catenin gehemmt und es akkumuliert (Abbildung 1.4 rechts) (Zhan u. a., 2017). Dabei ist β -Catenin das entscheidende Protein, das letztlich, wenn es im Zellkern angekommen ist, zusammen mit Proteinen der TCF/LEF Familie einen Protein-Komplex ausbildet

und so zur Aktivierung von Transkription führt (Abbildung 1.4 rechts) (Behrens u. a., 1996; Morin u. a., 1997). Bei einer LOH von beiden APC Allelen kann das APC Protein seine Fähigkeit der Regulation, im Speziellen die Beteiligung am Abbau von β -Catenin nicht mehr gewährleisten (Polakis, 2012) und die Möglichkeit für eine Tumorentstehung via Überaktivierung des WNT-Signalwegs ist gegeben (Korinek u. a., 1997; Zhan u. a., 2017).

Viele der beim WNT Signalweg beteiligten Proteine stellen mögliche Ziele für eine spezifische Therapie dar (Sebio u. a., 2014), allerdings stellt der WNT Signalweg eine Herausforderung für eine zielgerichtete Therapie dar und es ist bislang schwierig, hier anzusetzen (Kahn, 2015).

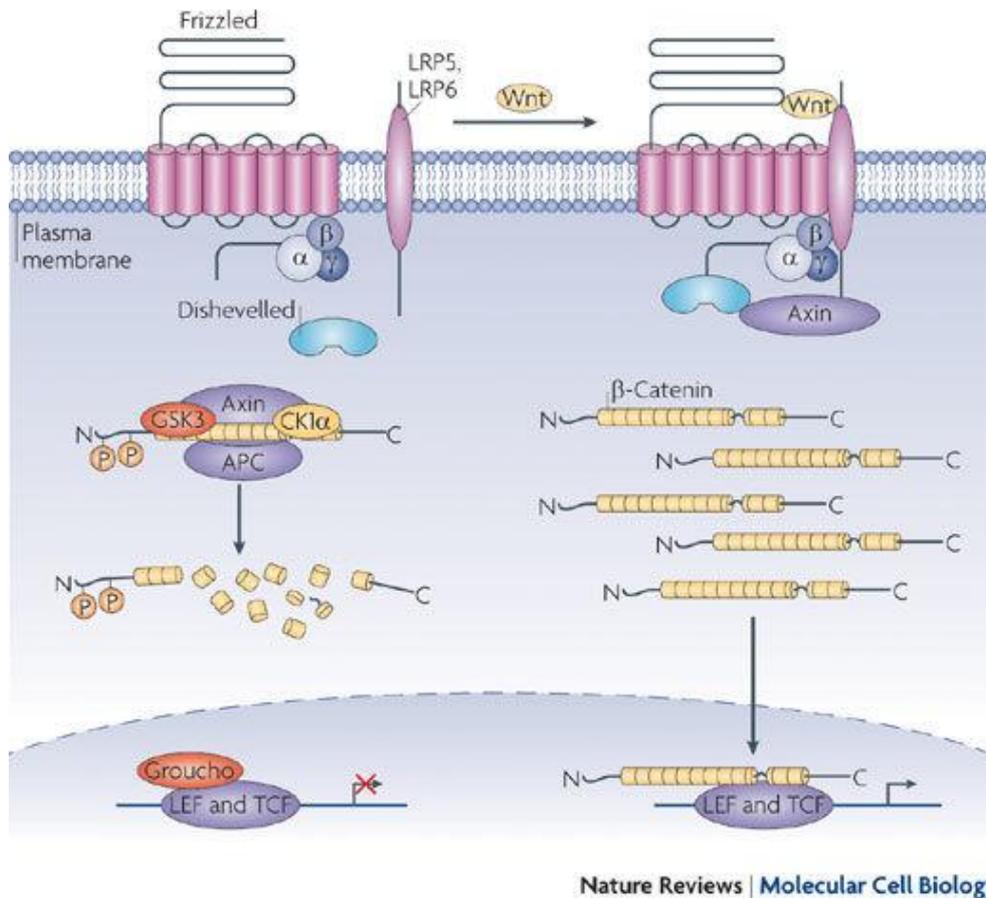


Abbildung 1.4: Darstellung des WNT Signalwegs: (Links) Ohne die Aktivierung des Signalwegs durch WNT wird β -Catenin proteasomal mithilfe des „Destruction-Komplex“ abgebaut. **(Rechts)** Bei der Bindung von WNT-Signalproteinen an deren Rezeptor bildet Axin einen Komplex mit dem Protein Dishevelled und dadurch der Abbau von β gehemmt. Im Zellkern angekommen bindet das akkumulierte β -Catenin an die Faktoren TCF/LEF und die Transkription von Zielgenen wird aktiviert. Die Abbildung wurde übernommen von Angers und Moon, 2009.

1.3.2 MAPK Signalwege

MAPKs (engl.: mitogen-aktiviert protein kinases) sind Serin/Threonin-Kinasen, die unterschiedliche Zellaktivitäten wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (Pearson G u. a., 2001). Durch diese zentralen Eigenschaften spielen sie Schlüsselrollen in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie auch dem Kolonkarzinom (Kim und Choi, 2015). MAPK Signalwege bestehen generell aus mindestens drei hierarchisch hintereinander

geschalteten Kinasen: Einer MAP3K, einer MAP2K und einer MAPK. MAP3K phosphorylieren und aktivieren damit MAP2K und diese wiederum phosphoryliert und aktiviert die MAPK wodurch dann verschiedene Proteine wie Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Abbildung 1.5) (Kim und Choi, 2015; Peti und Page, 2013). Des Weiteren gilt es drei verschiedene Signalwege zu unterscheiden: Den RAS–RAF–MEK–ERK Signalweg (auch ERK1/ERK2 Signalweg) und die beiden durch Stress aktivierten MAPK Signalwege JNK und p38 (Sabio und Davis, 2014). Der RAS–RAF–MEK–ERK Signalweg ist ein zentraler Faktor in der Entwicklung von Krebs durch die Stimulation der Proliferation und das sichern des Überlebens von Tumorzellen (Das Thakur und Stuart, 2014). Anders als beim WNT Signalweg gibt es bei den MAPK Signalwegen bereits gute und effektiv Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie wie zum Beispiel die Hemmung von EGFR mit Antikörpern. Das führt zu einer Inhibition des RAS-RAF-MEK-ERK Signalwegs, einem der drei MAPK Signalwege (Miyamoto u. a., 2017). Trotz bereits bestehender Inhibitionsmöglichkeiten bietet die Komplexität dieser Signalwege eine Reihe von weiteren Therapieansätzen, die Gegenstand aktueller Forschung und teilweise auch der vorliegenden Arbeit sind. Beispielsweise sind hier die Hemmung von MEK oder ERK mit spezifischen Inhibitoren zu nennen, oder aber auch kombinierte Inhibitionen verschiedener Signalwegkomponenten (Gonga u. a., 2018; Liu u. a., 2018).

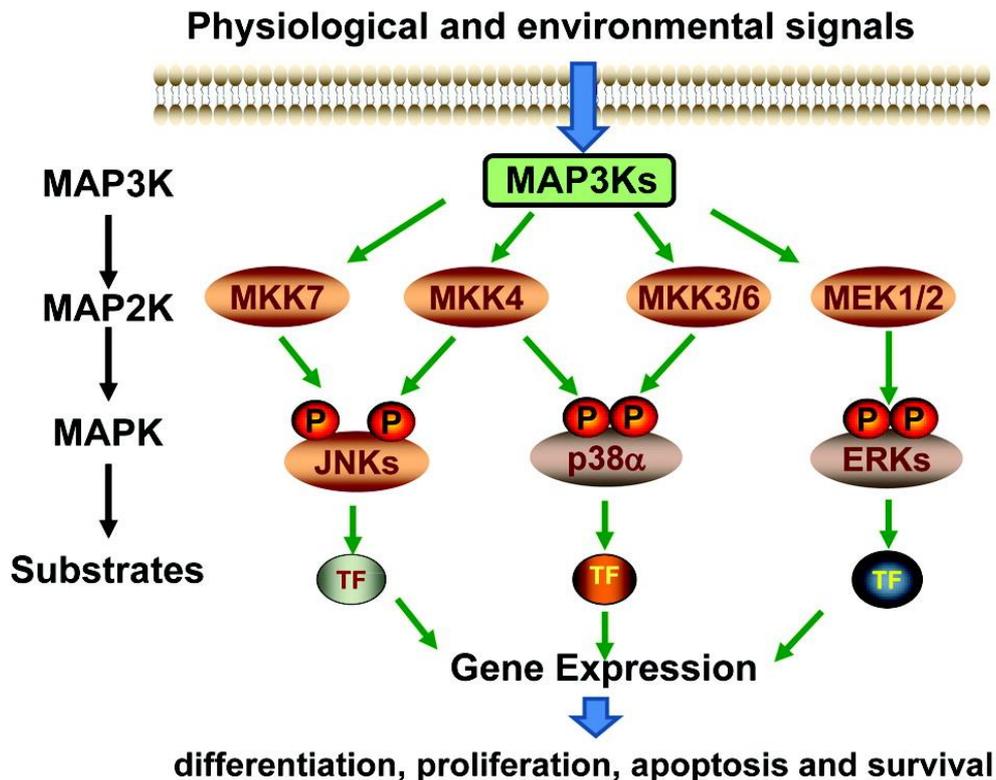


Abbildung 1.5: Darstellung der MAPK Signalwege: (Links) Schema der hierarchisch hintereinander geschalteten MAPK (Rechts) Visualisierung der drei zu unterscheidenden MAPK Signalwege: RAS-RAF-MEK-ERK Signalweg (rechts) JNK Signalweg (links) und p38 Signalweg (Mitte). Abbildung übernommen von Wang und Xia, 2012.

1.3.3 Der NOTCH Signalweg

Auch die Aktivierung von NOTCH Signalwegen konnte in Kolonkarzinomen beobachtet werden (Reedijk u. a., 2008). Es handelt sich dabei um einen hoch konservierten Signalweg, der unter anderem Einfluss auf Proliferation und Apoptose von Zellen nimmt; Proliferation und Inhibierung von Apoptose wiederum stellen essentielle Schritte bei der Tumorgenese dar (Ranganathan u. a., 2011; Takebe u. a., 2014). Genauer handelt es sich bei NOTCH um einen Membranrezeptor (Abbildung 1.6) (Bray, 2006). Bindet sich eine Zelle mit dem Liganden Delta an eine Zelle mit dem NOTCH Rezeptor so wird dieser zweimal

proteolytisch gespalten. Der Proteinkomplex γ -Sekretase führt die zweite proteolytische Spaltung durch, wodurch dann die intrazelluläre Domäne des Rezeptors NICD (Notch intracellular Domain) freigesetzt wird, welche mit DNA bindenden Proteinen interagiert und es schließlich zur Transkription von Zielgenen kommt (Abbildung 1.6) (Bray, 2006; Kume, 2009). Zur Hemmung des NOTCH Signalwegs können γ -Sekretase Inhibitoren oder monoklonale Antikörper gegen den Rezeptor eingesetzt werden, welche auch aktuell in klinischer Erprobung sind, allerdings konnten die Ergebnisse bis jetzt keinen Rückgang des Tumorwachstums oder eine deutliche Verzögerung der Progression zeigen (Strosberg u. a., 2012; Takebe u. a., 2014). Gerade deshalb, weil bis jetzt die zielgerichtete Therapie mit Inhibitoren des NOTCH Signalwegs keinen klinischen Nutzen brachte, muss hier in Wissenschaft und Forschung angesetzt werden um bessere Therapiestrategien zu entwickeln.

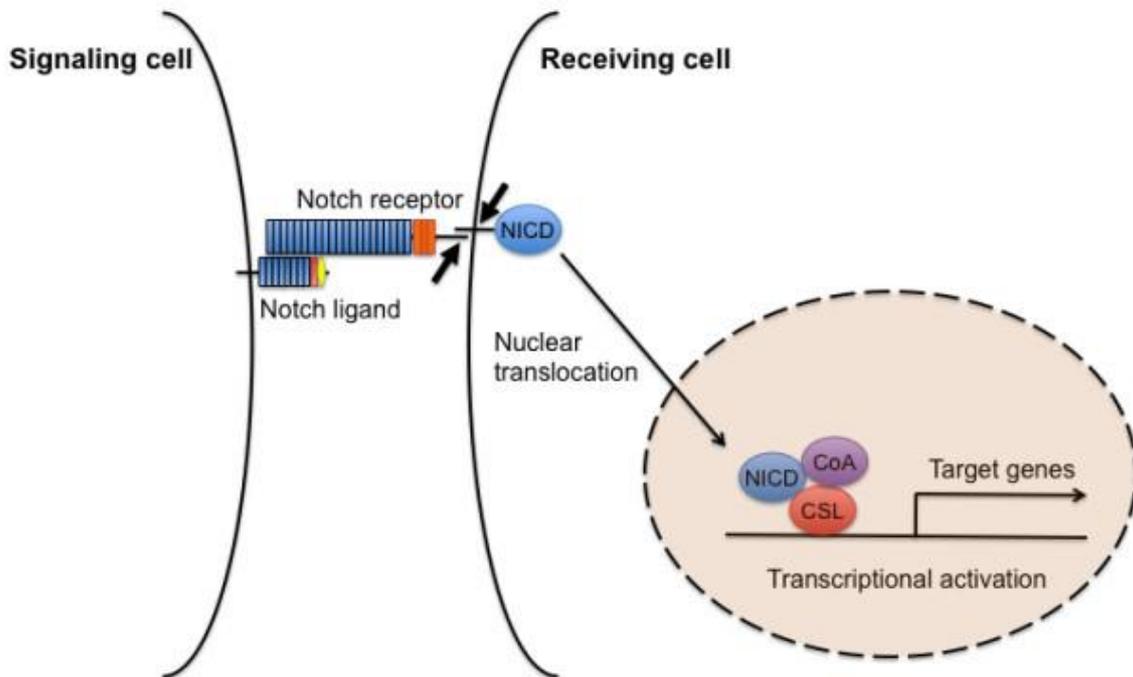


Abbildung 1.6: Vereinfachtes Schema des NOTCH Signalwegs: Die Abbildung zeigt die Hauptkomponenten des NOTCH Signalwegs. Zunächst bindet ein Ligand an den Notch Rezeptor, dann folgt die proteolytische Spaltung des Rezeptors (Pfeile) und NICD wird freigesetzt. Im Kern angekommen bildet NICD (Notch intracellular Domain) mit DNA bindenden Proteinen (CSL) und Koaktivatoren (CoA) einen Komplex und die Transkription von Zielgenen wird aktiviert. Die Abbildung wurde übernommen von Kume, 2009.

1.3.4 Detektion von Signalwegen und deren Verteilung in Kolonkarzinomen

Der WNT Signalweg zählt ebenso wie der MAPK und NOTCH Signalweg zu den Signalwegen, bei denen Mutationen zu einer vermehrten Aktivität des Signalwegs führen können und dadurch eine wichtige Rolle bei der Karzinomentstehung spielen (Colussi u. a., 2013). Wichtig für Therapie und Forschung ist es, solche Signalwege detektierenden zu können, um es etwa zu ermöglichen gegen diese speziellen Signalwege zielgerichtete Therapeutika zu entwickeln und zu testen (Tiwari u. a., 2018). Der WNT Signalweg kann durch das Effektor-Protein β -Catenin detektiert werden. Die Anreicherung von β -Catenin im Zellkern zeigt zudem die Aktivität dieses Signalwegs an, da es hier

als Teil eines WNT-gesteuerten Transkriptionsfaktorkomplexes fungiert und je nach WNT-Aktivität vermindert oder vermehrt detektiert werden kann (Barker und Born, 2009). Die Menge von β -Catenin in den Tumorzellkernen ist außerdem mit der Prognose bei Kolonkarzinompatienten assoziiert (Chuen u. a., 2004).

Bei den MAPK Signalwegen ist es möglich über das Protein FRA1 deren Aktivität zu bestimmen (Blaj u. a., 2017). Eine deutliche Erhöhung von FRA 1 in Kolonkarzinomen ist beschrieben (Wanghai Zhang u. a., 2005). FRA1 ist Teil des AP1 Transkriptionsfaktorkomplexes und eine hohe Expression in den Tumorzellkernen deutet auf eine hohe MAPK-Signalwegaktivität hin.

Die NICD (Notch intracellular Domain) ist wie in 1.3.3 beschrieben ein wichtiges Schlüsselprotein des NOTCH Signalwegs und kann wiederum verwendet werden um immunhistochemisch NOTCH Signalwegaktivität in Tumorzellen zu detektieren (Haifeng u. a., 2018). Die Bestimmung der einzelnen Marker für diese drei Signalwege ermöglicht es, genaue Analysen über deren Aktivität oder auch deren Verteilung durchzuführen.

Durch solche Analysen konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Aktivität der drei erwähnten Signalwege in Kolonkarzinomen heterogen ist. Es zeigten sich verschiedene Tumorzellsubpopulationen mit unterschiedlicher Signalwegaktivität (Schmidt u. a., 2018). Während MAPK und WNT Signalwegaktivität am Tumorrand stark ausgeprägt ist (Blaj u. a., 2017), finden sich Tumorzellen mit hoher NOTCH Aktivität im Zentrum des Tumors (Schmidt u. a., 2018). Diese Informationen sind deshalb wichtig, weil den unterschiedlichen Subpopulationen unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen zugeschrieben werden. MAPK und WNT sind für die Invasion des Karzinoms verantwortlich (Blaj u. a., 2017; Lemieux u. a., 2009), wohingegen

Subpopulationen mit hoher NOTCH Signalwegaktivität hohe proliferationsraten zeigen (Schmidt u. a., 2018).

Des Weiteren ist hier aufzuzeigen, dass den Tumorzellsubpopulationen mit hoher WNT und MAPK Signalwegaktivität Stammzeleigenschaften zugeschrieben werden und diese Stammzeleigenschaften möglicherweise auch für die Tumorinitiation und Therapielimitationen von Kolonkarzinomen verantwortlich sind (Blaj u. a., 2017; Fodde und Brabletz, 2007; Vermeulen u. a., 2010). Dies ist ein weiterer Punkt, der für neue Therapieansätze eine wichtige Rolle spielen könnte.

1.4. Stadien von Kolonkarzinomen

Bösartige Tumorerkrankungen werden gemäß den Kriterien der TNM Klassifikation eingeteilt, so auch die Kolonkarzinome (Tabelle 1.1). Vor kurzem erschien die 8. Auflage der Klassifikation welche wiederum Grundlage für die Einteilung der Stadien nach der UICC (Union internationale contre le cancer) (Tabelle 1.2) oder AJCC (American Joint Committee on Cancer) ist (Brierley u. a., 2016). Es werden insgesamt vier Stadien unterschieden, wobei die Infiltrationstiefe des Primärtumors in die Dickdarmwand (T), Fernmetastasierung (M) und der Befall regionaler Lymphknoten (N) entscheidend sind. Die jeweilige Kategorie wird mit Hilfe körperlicher Untersuchung, Bildgebung und/ oder chirurgischer Exploration festgelegt (Brierley u. a., 2016; Klimpfing u. a., 2005). Die Stadieneinteilung ist für die Planung der Therapie, sowie die Prognose der Kolonkarzinome entscheidend (Pox u. a., 2017).

Tabelle 1.1: TNM Klassifikation für das kolorektale Karzinom (nach Brierley u. a., 2016)

TNM	Ausdehnung
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Keine Evidenz für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muskularis propria
T3	Tumor infiltriert die Subserosa oder das retroperitoneale perikolische und/perirektale Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum (T4a) oder infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen (T4b)
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten befallen
TNM	Ausdehnung
N1	1-3 Regionäre Lymphknoten befallen (N1a: 1 Lymphknoten befallen, N1b: 2-3 Lymphknoten befallen)
N2	4-6 Regionäre Lymphknoten befallen (N2a: 4-7 Lymphknoten befallen, N2b: ≥ 7 Lymphknoten befallen)
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen in einem Organ (M1a), in mehr als einem Organ (M1b) oder Befall des Peritoneums (M1c)

Tabelle 1.2: UICC (Union for International Cancer Control) Stadieneinteilung der Kolonkarzinome (nach Brierley u. a., 2016)

UICC		TNM
0		Tis,(Karzinoma in situ) N0, M0
I		T1-T2, N0, M0
II	IIa	T3, N0, M0
	IIb	T4a, N0, M0

	IIc	T4b, N0, M0
III	IIIa	T1-T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
	IIIb	T1-T2, N2b, M0 oder T2-3, N2a, M0 oder T3-T4a, N1, M0
	IIIc	T3-T4a, N2b, M0 oder T4a, N2a, M0 oder T4b, N2, N2, M0
IV	IVa	Jedes T, Jedes N, M1a
	IVb	Jedes T, Jedes N, M1b
	IVc	Jedes T, Jedes N, M1c

1.5. Therapie von Kolonkarzinomen

Die Therapie von Kolonkarzinomen gestaltet sich stadienabhängig (zu den Stadien siehe 1.4) (Labianca u. a., 2013). In frühen Stadien wird oft kurativ, chirurgisch vorgegangen während weiter fortgeschrittene, metastasierte Stadien neben einer chirurgischen Therapie meist systemisch behandelt werden müssen (Van Cutsem u. a., 2016). Im Folgenden soll ein Überblick über die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten und anschließend ein solcher über deren Effektivität gegeben werden.

1.5.1. Chirurgische Therapie

Die chirurgische Therapie richtet sich sowohl an Patienten mit frühen Stadien eines Kolonkarzinoms, bei denen ein kurativer Ansatz besteht, als auch an Patienten mit metastasierten Karzinomen, entsprechend Stadium IV, zur maximalen Tumorreduktion und zur Linderung von Leid und Schmerzen (Pox u. a., 2017). Hier sollen vorrangig stadienabhängig die therapeutischen Ansätze bei kurativ operablen Tumoren grob abgehandelt werden. In Stadium 0 (Carcinoma in situ) wird entweder mit lokaler Exzision oder segmentaler en bloc Resektion- abhängig von der Zugänglichkeit und Größe der Läsion therapiert. Häufig sind Polypen betroffen, bei denen es einer genauen Beurteilung der histologischen Merkmale durch einen Pathologen bedarf, um nicht umsonst das Risiko einer Operation einzugehen (Labianca u. a., 2013). Befindet sich das Kolonkarzinom in Stadium I ist bei einem pT1- Karzinom die endoskopische Resektion ausreichend, wo hingegen bei „High-risk“ Faktoren eine große chirurgische Resektion mit anschließender Anstomosenbildung empfohlen wird (Choi u. a., 2015); eine adjuvante Chemotherapie jedoch nicht. High-risk Faktoren sind die Differenzierungsgrade G3 und G4, die Invasion von

Lymphgefäßen und die Anwesenheit von versprengten Tumorzellen (Bosch u. a., 2013). Auch in Stadium II wird großräumig, mit anschließender Anastomosenbildung reseziert. Eine adjuvante Chemotherapie kann durchgeführt werden und sollte bei Patienten mit Hochrisikofaktoren, wie zum Beispiel schlecht differenzierten Tumoren, trotz unzureichender Datenlage in Betracht gezogen werden. (Labianca u. a., 2013; Pox u. a., 2017; QUASAR Collaborative Group, 2007). Im Gegensatz dazu soll bei dem fortgeschrittenen Stadium III, nach der kompletten chirurgischen Resektion eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (Connell u. a., 1997). Die adjuvanten Therapien setzen eine R0-Resektion des Primärtumors voraus. Bei allen großen chirurgisch kurativen Therapien sollte außerdem eine komplette mesokolische Exzision durchgeführt werden, da sie zu einer erhöhten Ausbeute der Lymphknoten und nach den bisherigen Daten die Überlebensraten verbessern kann (Pox u. a., 2017). Patienten mit Stadium IV, welches bereits eine metastasierte Situation darstellt (Tabelle 1.1), sollen abhängig vom Allgemeinzustand therapiert werden: Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand und unter günstiger Risikokonstellation ist eine Resektion der Metastasen anzustreben, bei Patienten bei denen der Allgemeinzustand keine chirurgische Intervention mehr zulässt soll mit systemischer Therapie eine maximale Tumorreduktion angestrebt werden und so kann es in besonderen Fällen sogar zu einer sekundären Resektabilität kommen (Van Cutsem u. a., 2016; Pox u. a., 2017). Die hier beschriebenen Empfehlungen orientieren sich an den Leitlinien der ESMO und der AWMF, wobei in Deutschland die S3-Leitlinie der AWMF relevant ist.

1.5.2. Systemische Therapie

Die systemische Therapie von Kolonkarzinomen kann in zwei Untergruppen unterteilt werden: Die Chemotherapie und die zielgerichtete Therapie. In den folgenden Unterkapiteln soll auf beide genauer eingegangen werden.

1.5.2.1. Chemotherapie

Ab UICC Stadium II kann, ab Stadium III soll eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden (Pox u. a., 2017). Dabei werden verschiedene Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU), Capecitabin (orale Prodrug von 5-FU) Leucovorin (LV), Oxaliplatin oder Irinotecan eingesetzt. Diese Chemotherapeutika werden zum einen als Monotherapie, zum anderen als Kombinationstherapie, eingesetzt (Tabelle 1.3) (Falcone u. a., 2007; Twelves u. a., 2005).

Tabelle 1.3: Zusammensetzung der verwendeten Kombinationstherapien

Kombinationen	Enthaltene Chemotherapeutika
5-FU/LV	5-Fluoruracil, Leucovorin
Cabecitabin/LV	Capecitabine (orales Prodrug von 5-FU), Leucovorin
FOLFOX	5-Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatin
XELOX (auch CAPOX)	Capecitabin, Oxaliplatin
FOLFIRI	5-Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan
FOLFOXIRI	5-Fluoruracil, Leucovorin, Oxaliplatin, Irinotecan

In den kurativen, adjuvanten Settings werden verschiedene der in Tabelle 1.3 gelisteten Kombinationstherapien, abhängig vom Tumorstadium eingesetzt. Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, kann bei Stadium II eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, hierbei wird die Therapie mit

Fluoropyrimidinen, also meist im Schema 5-FU/LV empfohlen, eine zusätzliche Gabe von Oxaliplatin im Rahmen von FOLFOX bringt keine prognostische Verbesserung (Tournigand u. a., 2012) und für das Prodrug Capecitabine gibt es aktuell keine Daten (Pox u. a., 2017). Hingegen soll in Stadium III eine Oxaliplatin-haltige Chemotherapie in Form von FOLFOX oder XELOX angewandt werden (André u. a., 2004, 2015; Schmoll u. a., 2015), allerdings nur bis zum 70. Lebensjahr (Tournigand u. a., 2012). Bei der Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms (UICC IV) kommen, abhängig vom Allgemeinzustand 5-FU Mono- oder 5-FU basierte Kombinationstherapien wie FOLFOX, FOLFIRI oder FOLFOXIRI zum Einsatz, wobei FOLFOXIRI zu den effektivsten Chemotherapie-Regimen zählt (Souglakos u. a., 2006). Die Regime werden, teilweise abhängig von der Genetik und der Tumorlokalisation, mit zielgerichteten Therapien kombiniert, welche Thema des nächsten Abschnitts sind (Douillard u. a., 2013; Heinemann u. a., 2014).

1.5.2.2. Zielgerichtete Therapie und deren Kombination mit Chemotherapie

Die derzeit verwendeten zielgerichteten Therapien werden beim Stadium IV des Kolonkarzinoms angewandt, zum Einsatz kommen vorwiegend anti-EGFR Antikörper und anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bzw. anti-VEGFR Substanzen (Tabelle 1.4) (Van Cutsem u. a., 2015; Hurwitz u. a., 2004).

Tabelle 1.4: Verwendete zielgerichtete Therapeutika

Therapeutikum	Wirkstoffklasse	Mechanismus
Cetuximab	Antikörper	anti-EGFR
Panitumumab	Antikörper	anti-EGFR
Bevazizumab	Antikörper	anti-VEGF
Aflibercept	Fusionsprotein	anti-VEGF

Therapeutikum	Wirkstoffklasse	Mechanismus
Ramucirumab	Antikörper	anti-VEGFR
Regorafenib	Zytostatikum	Tyrosinkinaseinhibitor

Die Therapie in der metastasierten Situation richtet sich nach dem Allgemeinzustand des Patienten. Bei schlechtem Allgemeinzustand kann eine intensive Kombinationschemotherapie nicht eingesetzt werden, es kann aber eine Behandlung mit 5-FU und Bevacizumab durchgeführt werden (Pox u. a., 2017). Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand ist die Therapieentscheidung abhängig von der Genetik und der Lokalisation des Tumors. Patienten, deren Tumoren molekularpathologisch als RAS-Wildtyp Tumoren bestätigt sind und der Tumor auf der linken Seite lokalisiert ist, sollen mit einer Kombination wie FOLFOX oder FOLFIRI plus einer anti-EGFR Therapie (Cetuximab oder Panitumumab) behandelt werden (Arnold u. a., 2017; Douillard u. a., 2013; Heinemann u. a., 2014, 2016). Bei molekularpathologisch nicht selektierten Patienten kann Bevacizumab gemeinsam mit einer 5-FU Monotherapie zu einer Effektivitätssteigerung führen (Kabbinar u. a., 2005). In der Zweitlinientherapie kommen weitere anti-VEGF beziehungsweise anti-VEGFR Substanzen, wie Aflibercept und Ramucirumab zum Einsatz, die in Kombination mit Chemotherapie-Regimen wie FOLFIRI das Überleben signifikant verlängerten (Van Cutsem u. a., 2012; Tabernero u. a., 2015). Letztlich ist noch Regorafenib zu erwähnen, welches bei Patienten eingesetzt werden kann, die mit allen verfügbaren Chemotherapien und Antikörpern vorbehandelt wurden (Grothey u. a., 2013; Pox u. a., 2017).

1.5.3 Effektivität von systemischen Therapien

Viele Patienten mit Kolonkarzinom in Stadium IV sind sich nicht darüber im Klaren, dass Chemotherapie meist nur eine Verlängerung des Überlebens erzielen kann, aber keine kurative Therapie darstellt (Pawlik u. a., 2014; Weeks und Catalano, 2012). Bei aktuellen Therapiekonzepten kann allerdings Gesamtüberleben von bis zu über drei Jahren erreicht werden (Schwartzberg u. a., 2014). Vor allem konnte in den letzten Jahren die zusätzlich verfügbare, zielgerichtete Therapie, besonderes eine mit anti-EGFR Antikörpern bei RAS-Wildtyp Patienten signifikant zur Verlängerung des Überlebens beitragen (Heinemann u. a., 2016). In früheren Stadien kann in vielen Fällen durch eine Operation und anschließender adjuvanter Chemotherapie eine Heilung erzielt werden und bringt einen signifikanten Überlebensvorteil mit sich (Gill u. a., 2004; Sargent u. a., 2001), jedoch hat hier eine zielgerichtete Therapie, mit der möglicherweise Behandlungsdauer und Nebenwirkungen verkürzt werden könnten, noch keine Bedeutung erlangt (Alberts u. a., 2012; Allegra u. a., 2013). Trotz vieler vorhandener Therapien, intensiver Behandlungen und neuerer Ansätze erliegen letztlich immer noch die meisten Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien ihren Erkrankungen. Im Zeitraum von 2008 bis 2015 lag die 5-Jahres Überlebensrate in den USA von Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom (UICC IV) bei nur 13.5 % (Noone u. a., 2018). Eine mögliche Ursache dafür sind Resistenzen von Kolonkarzinomen gegen Chemotherapeutika (Jeught u. a., 2018). Fast die Hälfte der Patienten die an Kolonkarzinomen leiden, haben Resistenzen gegen das häufig eingesetzte 5-FU (Douillard u. a., 2000). Deshalb ist es essentiell, neue und effektivere Therapiekonzepte zu entwickeln, um eventuell in Zukunft auch hier eine Heilung zu ermöglichen.

2. Zielsetzung

Die beiden folgenden Punkte sind die Ziele dieser Arbeit:

I) Der Einfluss gängiger Chemotherapie-Regime auf die Signalwegaktivitäten WNT, MAPK und NOTCH in kolorektalen Karzinomen.

II) Die Effekte einer MAPK und NOTCH Signalweginhibition in Kombination mit Chemotherapie.

3. Materialien

3.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagens	Hersteller
5-Fluoruracil	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antibody Diluent	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Aqua ad iniectabilia	Deltamedica GmbH, Reutlingen; Deutschland
Dibenzazepin (DBZ)	Axon Medchem BV, Groningen, Niederlande
Dimethylsulfoxide	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fötales Bovines Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Irinotecan	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Leucovorin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Matrigel	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Methocel (Hydroxypropylmethyl cellulose)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Selumetinib (AZD6244)	Selleckchem, Houston, TX, USA
Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun AG, Meslungen, Deutschland
Trypsin / EDTA Lösung (0.05 %/0.02 %)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
TWEEN 80	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.2. Kits

Tabelle 3.2: Kits

Kits	Hersteller
ImmPRESS HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Agilent, Santa Clara, CA, USA
OptiView DAB IHC Detection Kit	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
UltraView Universal DAB Detection Kit	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA

3.3. Antikörper

Tabelle 3.3: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies/ Klon	Katalognummer	Hersteller	IHC
β-Catenin	Maus	760-4242	Roche	vorverdünnt
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen/ 5A1E	9664	Cell Signaling	1:100
Cleaved Notch1 (Val1744)	Kaninchen/ D3B8	4147	Cell Signaling	1:100
FRA1	Maus/ C-12	sc-28310		1:50
Ki67	Maus MIB-1	M7240	Agilent	1:150
TS (C5)	Maus	sc-390945	Santa Cruz	1:100

Immunhistochemie (IHC)

3.4. Lösungen

Tabelle 3.4: Lösungsmittel und Medien

Lösungen	Zusammensetzung
Selumetinib (AZD) Lösungsmittel	Aqua ad iniectabilia 0,5 % Methocel 0,2 % Tween 80
Basismedium	DMEM 10% FBS 1% Penicillin / Streptomycin
Dibenzazepine (DBZ) Lösungsmittel	Aqua ad iniectabilia 0,5 % Methocel 0,1 % Tween 80
Einfriermedium	90% FBS 10% DMSO

3.5. Laborausrüstung

Tabelle 3.5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
accu-jet pro	BrandTech Scientific Inc, Essex, USA
Axioplan 2	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heracell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heraeus Megafuge 40R Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Herasafe KSP Class II Biological Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
6765 LSE Mini Microcentrifuge	Corning, New York, USA
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pannoramic DESK II DW	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn

Gerät	Hersteller
Pipetman Classic P20, P100, P200, P1000	Gilson, Limburg an der Lahn, Deutschland
Talent TE124S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Theromixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland

Tabelle 3.6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD Plastipak Spritzen mit Luer-Ansatz	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Kryoröhrchen 2,0 ml	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Tubes 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Cell Culture Dishes	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
Falcon 15, 50 mL Centrifuge Tube	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA
OneTouch Barrier 1000 µl (50-1250 µl)	Sorenson BioScience, Inc., Salt Lake City, USA
Rotilabo-Spritzenfilter, steril	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Tips Professional 20 µl, 200 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Sterican Standardkanülen	B. Braun AG, Meslungen, Deutschland
Stripette 5 mL, 10 mL, 25 mL	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA

3.6. Computersoftware

Tabelle 3.7: Verwendete Software

Software	Firma
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San José, USA
Corel Draw X6	Corel GmbH, München, Deutschland
Gene Mapper 4.0	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Image J Software	Wayne Rasband (NIH)
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA

4. Methoden

4.1. Zellkultur

SW480 Zellen wurden von dem Unternehmen ATCC, SW1222 Zellen von dem Ludwig Institute for Cancer Research (New York, USA) bezogen. SW1222 Zellen haben eine Deletion von 113bp in Exon 1 von TP53, welche einen Funktionsverlust der Expression des Proteins p53 zufolge hat. Zudem eine verkürzende Mutation in APC(E1306*) und eine aktivierende Mutation in KRAS(A146V)(Liu und Bodmer, 2006; Tate u. a., 2019). SW480 Zellen tragen mutierte p53(R273H/P309S), verkürzende APC(Q1338*) Mutationen und ebenso eine aktivierende KRAS(G12V) Mutation. Beide Zelllinien wurden aus kolorektalen Adenokarzinomen gewonnen. Sie sind mikrosatellitenstabil und tumorerzeugend in NOD/SCID Mäusen (Schmidt u. a., 2018). Um etwaige Kontaminationen durch Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilze zu vermeiden, wurden alle Tätigkeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und anschließend in DMEM mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und jeden zweiten bis dritten Tag mit PBS gewaschen, mit Trypsin / EDTA Lösung inkubiert, geteilt und anschließend wieder in frischem Basismedium kultiviert. Zur Aufbewahrung wurden die Zellen in Kryoröhrchen, in 90% FBS und 10% DMSO langsam auf -80° C eingefroren.

4.2. STR-Analyse

Um die Identität der Zelllinien zu verifizieren wurde eine Short Tandem Repeat-Analyse von SW480 und SW1222 DNA durchgeführt (Abbildung 4.1, 4.2). Dafür wurde zunächst von kultivierten SW480 und SW1222 Zellen DNA mit dem QIAamp DNA Micro Kit extrahiert und anschließend mit dem NanoDrop 1000 Spectralphotometer quantifiziert. Die anschließende STR- Analyse ergab eine 100%ige Übereinstimmung der DNA-Profile mit den Daten der ATCC beziehungsweise der ECACC.

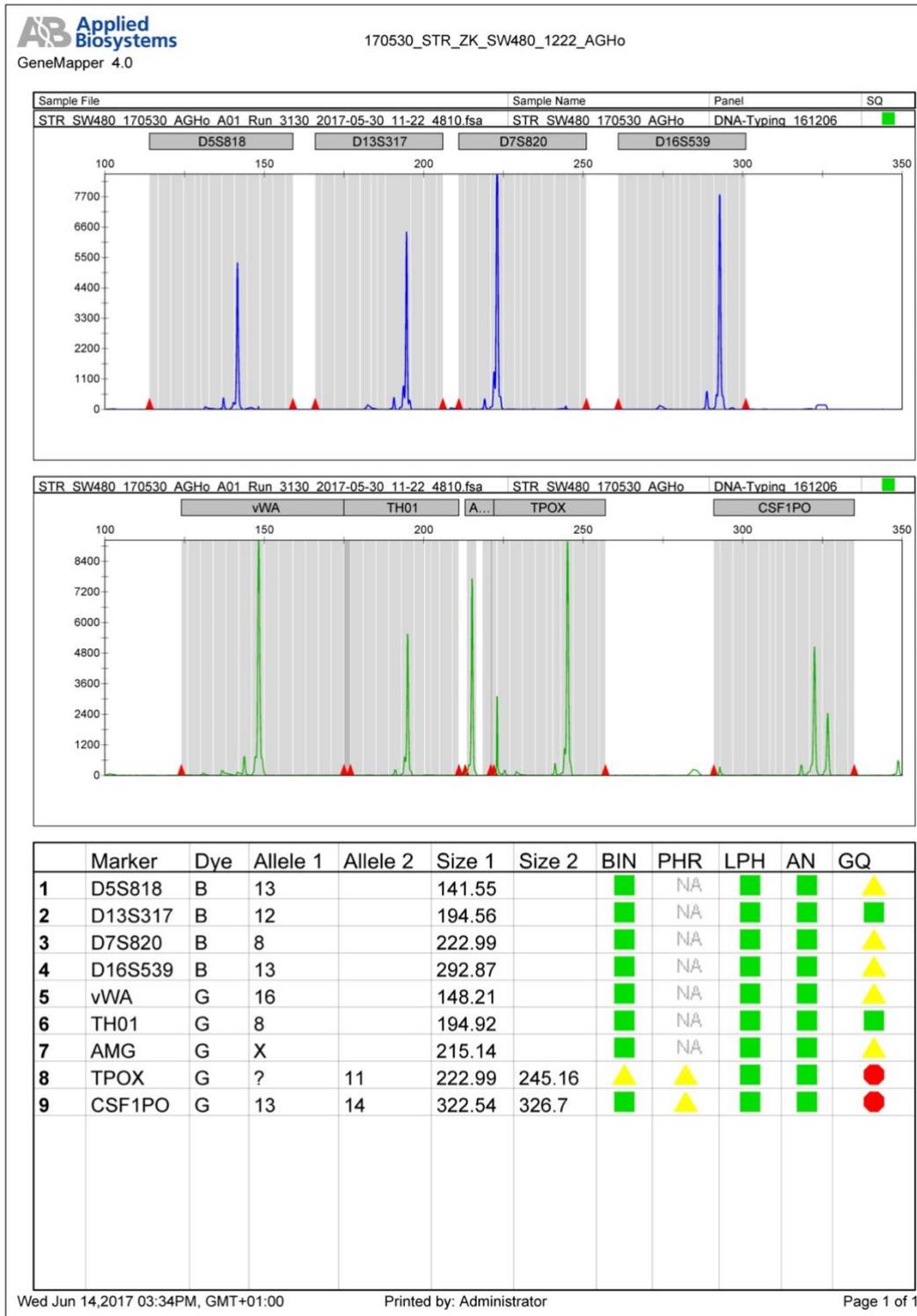


Abbildung 4.1: STR- Analyse von SW480 DNA zur Authentifizierung der SW480 Zelllinie. Die DNA-Profile zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den Daten der ATCC beziehungsweise der ECACC.

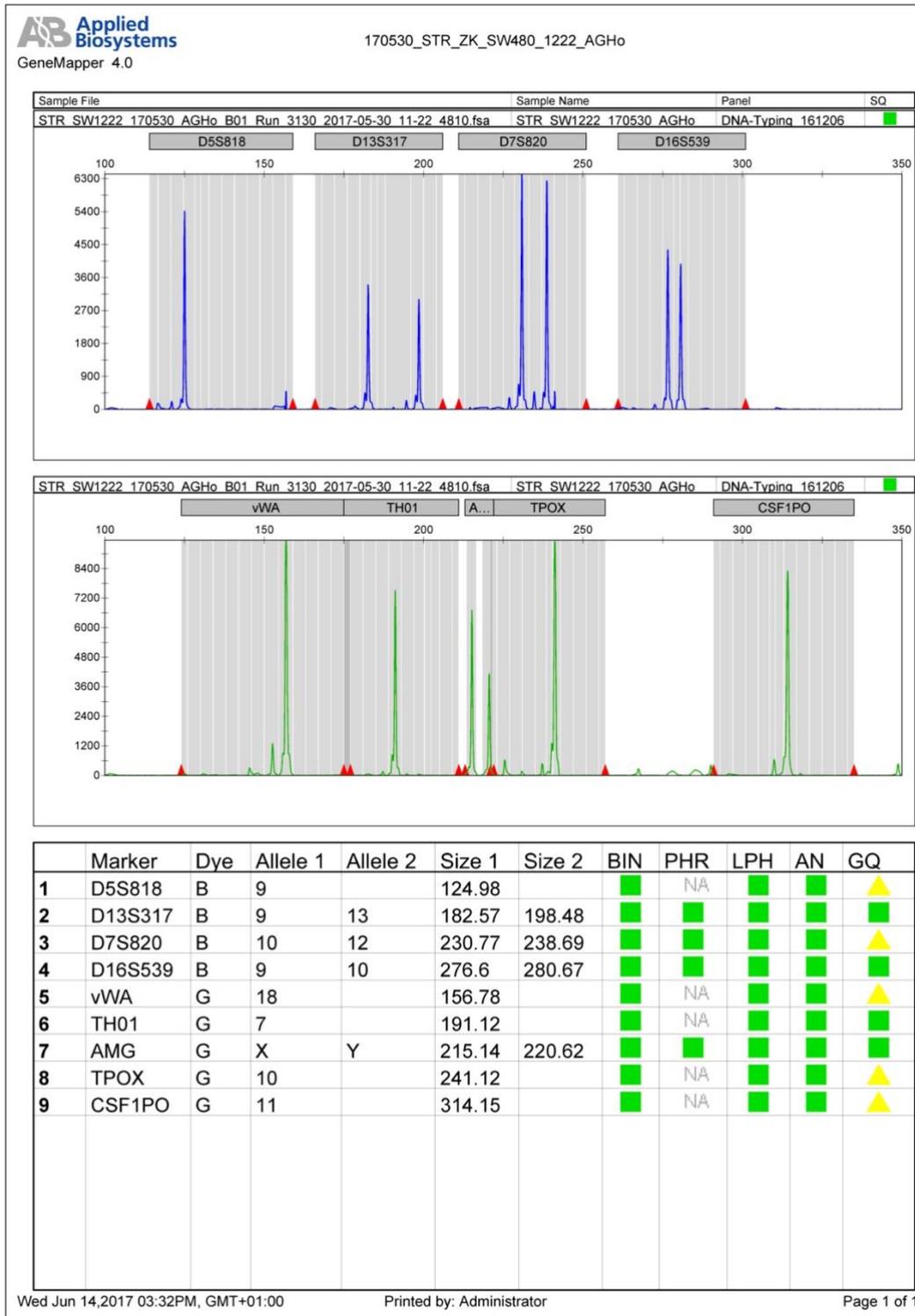


Abbildung 4.2: STR- Analyse von SW1222 DNA zur Authentifizierung der SW1222 Zelllinie.
Die DNA-Profile zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den Daten der ATCC beziehungsweise der ECACC.

4.3. Xenotransplantate und in vivo Behandlung

Alle Mausexperimente wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und überprüft. Für diese Experimente wurden NOD/SCID Mäuse (NOD.CB17-Prkdcscid, The Jackson Laboratory) verwendet, die in spezifisch pathogen freien Käfigen (SPF) untergebracht waren. Den Mäusen fehlen reife B- und T-Zelllinien, sowie Komplementsystem-Aktivität (Shultz u. a., 1995) und erlauben das Wachstum von xenotransplantierten Tumoren. Für die Xenotransplantate wurden SW480 und SW1222 Zellen in 50 µl PBS und 50 µl Matrigel suspendiert und dann subkutan in die Flanke von 6-8 Wochen alten NOD/SCID Mäusen injiziert. Die Tumorgroße wurde mithilfe einer Schiebelehre gemessen und das Volumen gemäß der Formel $\frac{\text{Breite}^2 \times \text{Länge}}{2}$ berechnet. Sobald die Tumoren 100 mm³ erreicht hatten, wurden die Mäuse randomisiert zu einer Kontroll- oder Behandlungsgruppe zugewiesen. Es wurden jeweils mindestens drei Tiere zugewiesen. Während der experimentellen Phase wurden alle Mäuse gemäß dem Tierschutzgesetz überwacht und als die Tumoren einen Durchmesser von 1,5 cm erreicht hatten getötet. Anschließend die Tumoren entfernt, in Formalin fixiert und für weitere histologische Untersuchungen in Paraffin eingebettet.

4.4. Chemotherapie und Inhibitor- Behandlung

Für die Chemotherapie wurden 5-Fluoruracil (5-FU), Leucovorin, Oxaliplatin und Irinotecan in steriler, 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst und als Mono- oder Kombinationstherapie verabreicht. Für die Inhibitor- Behandlung wurde Selumetinib (AZD) in 0,5 % Methocel und 0,1 % Tween 80 gelöst. Dibenzazepin (DBZ) wurde in 0,1 % DMSO, 0,5% Methocel und 0,1 % Tween 80 gelöst. Es wurden Kurzzeit- und Langzeitexperimente durchgeführt. Für die Kurzzeit-Chemotherapie wurden 0,3 mg 5-FU und 0.4 mg Leucovorin täglich i.p. gegeben

und 0,2 mg Oxaliplatin oder 1 mg Irinotecan i.p. an Tag 1 für eine dreitägige Therapie beziehungsweise an Tag 1 und 6 für eine zehntägige Therapie. Für die FOLFOX und FOLFIRI Kombinationstherapien wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Monotherapie verwendet und nach denselben Schemen appliziert. Für die Langzeittherapie wurden die Mäuse mit 0,3 mg 5-FU und 0,4 mg Leucovorin i.p. an 5 Tagen pro Woche und/oder mit 1,25 mg AZD p.o. und 0,35 mg DBZ i.p. zweimal pro Woche behandelt. Die Kontrollgruppen wurden nur mit den Lösungsmitteln behandelt. Die Mäuse wurden bis zu 31 Tage lang, oder bis die Tumoren ein Volumen von 1000-1300 mm³ erreicht hatten, behandelt.

4.5. Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden 5µm dünne Gewebeschnitte, der in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumoren entparaffiniert und mit dem vollautomatischen Ventana BenchMark XT Färbesystem, unter Verwendung der in Tabelle 3.3 unter Kapitel 3.3 gelisteten primären Antikörper gefärbt. Die Färbungen wurden mit dem UltraView oder OptiView DAB IHC Detection Kit visualisiert. Die immunhistochemischen Färbungen für Cleaved Caspase-3 wurden manuell an entparaffinierten Schnitten durchgeführt. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 20 Minuten in Citratpuffer (pH 6, Aglient) in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend mit den primären Antikörpern inkubiert. Für die Visualisierung von Cleaved Caspase-3 wurden das ImmPRESS HRP Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit und das Liquid DAB+ Substrate Chromogen System gemäß den Herstelleranweisungen verwendet. Zur Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurden Zellen, die den entsprechenden Marker exprimierten als

positiv bewertet und solche, die ihn nicht exprimierten als negativ bewertet. Diese semiquantitative Bewertung wurde mit Hilfe von Image J durchgeführt.

4.6. Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen und Auswertungen wurden die Programme Excel (Microsoft) und GraphPad Prism 5 genutzt. Die Stichprobengröße wurde basierend auf vorläufigen Daten und der bisherigen Erfahrung gewählt. Um Unterschiede zweier Gruppen zu analysieren, wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Die Kaplan-Maier-Methode wurde angewandt, um Unterschiede beim tumorspezifischen Überleben zu zeigen, für welche ein Tumordurchmesser von 1,5 cm als Endpunkt genommen wurde. Für die Berechnung von Unterschieden zwischen den Kaplan-Maier-Überlebenskurven diente der Log-Rank-Test. Unterschiede gelten als statistisch signifikant, wenn $P < 0,05$. Alle signifikanten P Werte sind in den einzelnen Abbildungen angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Begrenzte Effekte von Chemotherapie auf Signalwegaktivitäten in Kolonkarzinomen

Um mögliche Effekte von Chemotherapie auf Signalwegaktivitäten zu zeigen, wurden SW480 und SW1222 Xenotransplantate untersucht, die entweder drei oder zehn Tage lang mit 5-Fluoruracil (5-FU), Oxaliplatin, Irinotecan oder in den Kombinationen 5-FU und Oxaliplatin (FOLFOX) oder Irinotecan (FOLFIRI) behandelt wurden. In der durchgeführten Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte sich, dass alle Xenotransplantate ausreichende Bereiche mit noch vitalem Tumorgewebe aufwiesen (Abbildung 5.1). Irinotecan hatte, sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit 5-FU, die stärksten zytopathischen Effekte. Bei der genauen Betrachtung der Tumorzellmorphologie fielen unter der Therapie mit Irinotecan stark geschwollene Tumorzellen, riesige, irreguläre Zellkerne und blasses Zytoplasma auf. Unter den anderen Mono- und Kombinationstherapien waren keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen bei dieser Kurzzeittherapie zu erkennen (Abbildung 5.1).

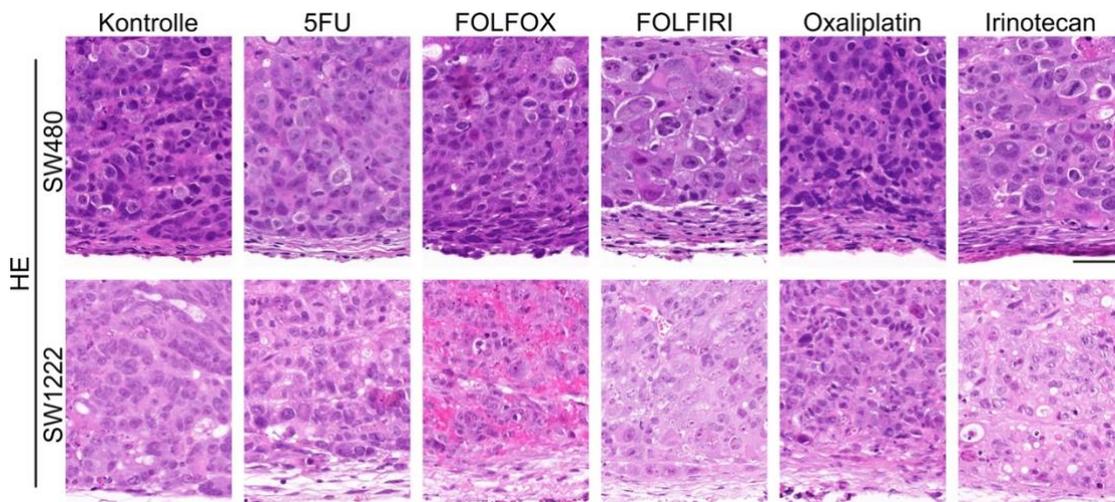


Abbildung 5.1: Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die Tumorzellmorphologie in Kolonkarzinomen. Ausschnitte von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten von SW480 und SW1222 Kolonkarzinom Xenotransplantaten, die über drei oder zehn Tage mit verschiedenen Chemotherapien, oder nur dem Lösungsmittel (Kontrolle), wie bezeichnet behandelt wurden. Maßstabbalken entsprechen 50 μm .

5.1.1. Effekte von Kurzzeit- Chemotherapie auf die WNT Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.

Um anschließend diese Tumoren auf WNT Signalwegaktivität zu untersuchen, wurden die Tumoren mit Immunhistochemie auf nukleares β -Catenin, welches WNT Signalwegaktivität widerspiegelt (Phelps u. a., 2010), untersucht und dessen Ausprägung bewertet. In SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die nicht behandelt wurden, zeigten sich Ansammlungen von nuklearem β -Catenin in den Tumorzellen, deren Ausprägung eher am Tumorrand am stärksten war. (Abbildung 5.2).

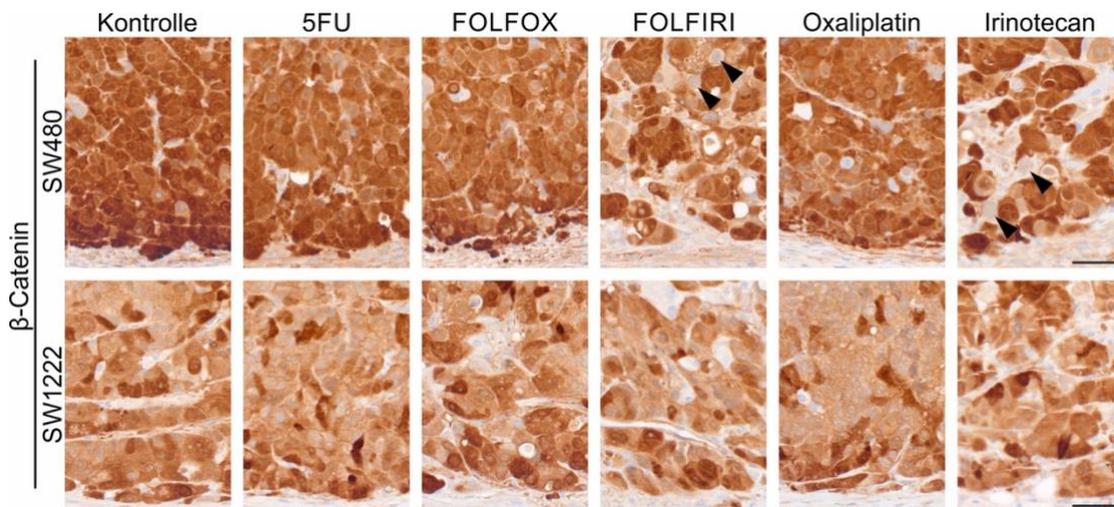


Abbildung 5.2: Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die WNT Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für β -Catenin, von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die über zehn Tage mit verschiedenen Chemotherapien, oder nur dem Lösungsmittel (Kontrolle), wie angegeben behandelt wurden. Die Pfeilspitzen markieren einzelne Tumorzellen ohne Akkumulation von nuklearem β -Catenin in mit 5-FU+Irinotecan (FOLFIRI) oder Irinotecan behandelten Xenotransplantaten. Maßstabbalken entsprechen 50 μ m.

Eine genaue Auswertung der Tumoren ergab interessanterweise, dass in SW480 Xenotransplantaten die Behandlung mit Irinotecan allein oder in Kombination als FOLFIRI einen Verlust der Akkumulation von nuklearem β -Catenin in einigen Zellen zufolge hatte. Dieser Effekt war nach drei und nach zehn Tagen Therapie zu beobachten (Abbildung 5.3 A-B), nach drei Tagen zeigte sich die höchste Signifikanz (Abbildung 5.3 A). Bemerkenswerterweise hatte keine der unterschiedlichen Therapien diese Effekte in den SW1222 Xenotransplantaten, weder nach drei Tagen noch nach zehn Tagen, zu Folge (Abbildung 5.3 A-B).

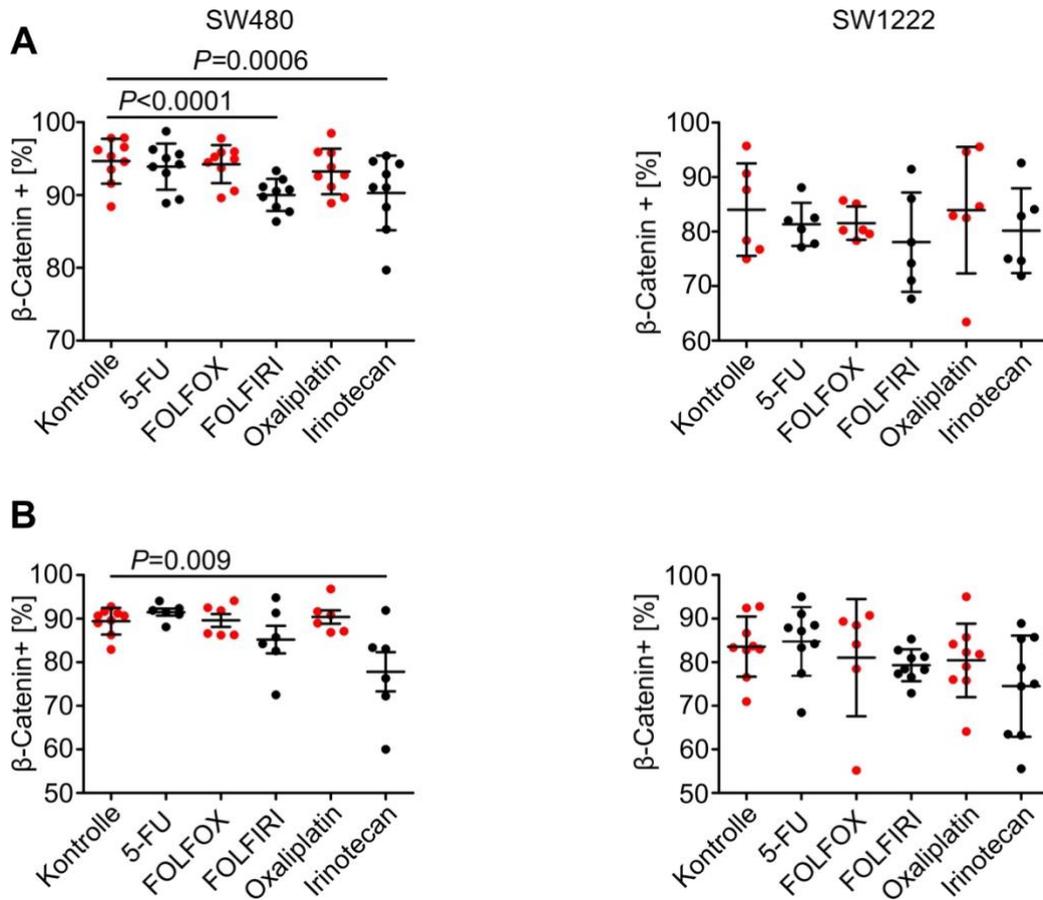


Abbildung 5.3.: Quantifizierte Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die WNT Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit starker Expression von nuklearem β -Catenin, welches die WNT Signalwegaktivität widerspiegelt, nach **(A)** 3 und **(B)** 10 Tagen Chemotherapie wie angegeben. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

5.1.2. Der Einfluss von Kurzzeit-Chemotherapie auf die MAPK Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.

Als nächstes wurden die Tumoren beider Zelllinien für FRA1 immunhistochemisch gefärbt und das Vorkommen von positiven, also Tumorzellen mit einer FRA1 Expression bewertet. Es markiert eine Untergruppe von Kolonkarzinomzellen in SW1222 und SW480 Xenotransplantaten und zeigt die MAPK Signalwegaktivität an. Es zeigte sich, dass wie auch schon von Schmidt u. a., (2018) beschrieben wurde, die positiven Tumorzellen Richtung Tumorzentrum abnehmen (Abbildung 5.4). Daher wurden für die Bewertung repräsentative Areale ausgewählt, welche die Tumorränder sowie das Tumorzentrum beinhalteten.

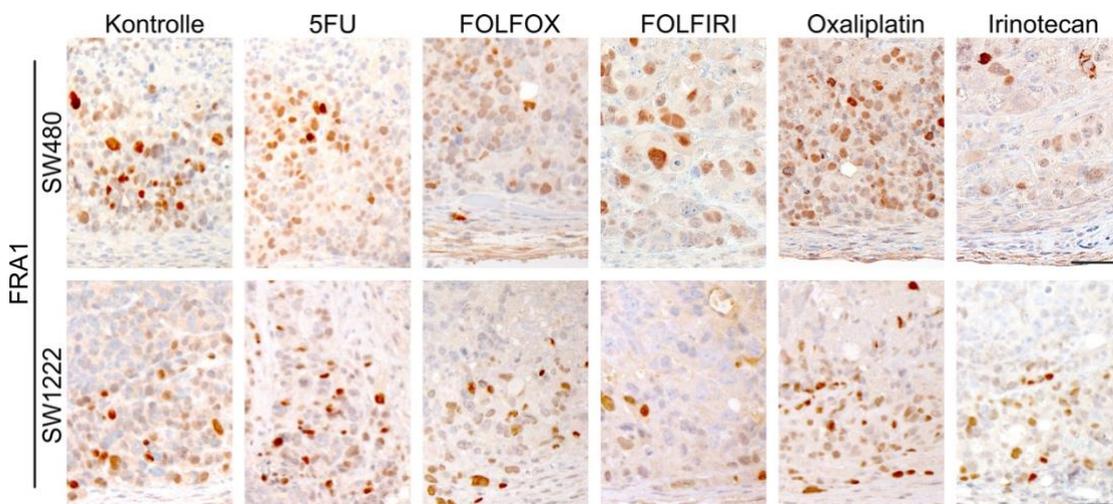


Abbildung 5.4: Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die MAPK Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für FRA1, von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die über zehn Tage mit verschiedenen Chemotherapien, oder nur dem Lösungsmittel (Kontrolle), wie angegeben behandelt wurden. Maßstab Balken entsprechen 50 µm.

Nach zehntägiger Therapie mit Irinotecan und Oxaliplatin, jeweils als Monotherapie, sowie nach der Kombinationstherapie FOLFIRI, konnte in den SW480 Tumoren ein Abfall der FRA1 positiven Tumorzellen beobachtet werden

(Abbildung 5.5 B). In den SW1222 Tumoren führte Oxaliplatin zu einem Anstieg und FOLFIRI zu einem Abfall der FRA1 positiven Zellen. Unter den anderen Therapien gab es keine signifikante Veränderung der Tumorzellexpression (Abbildung 5.5 B). Jedoch zeigte sich bei der Bewertung von SW480 Tumoren nach nur dreitägiger Therapie ein leichter Anstieg der FRA1 positiven Tumorzellen unter FOLFIRI Therapie, aber ein Abfall der positiven Population unter der Therapie mit FOLFOX im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 5.5 A). Des Weiteren führte eine 5-FU Monotherapie in SW1222 Tumoren über drei Tage zu einem signifikanten Anstieg der FRA1 positiven Tumorzellen (Abbildung 5.5 A).

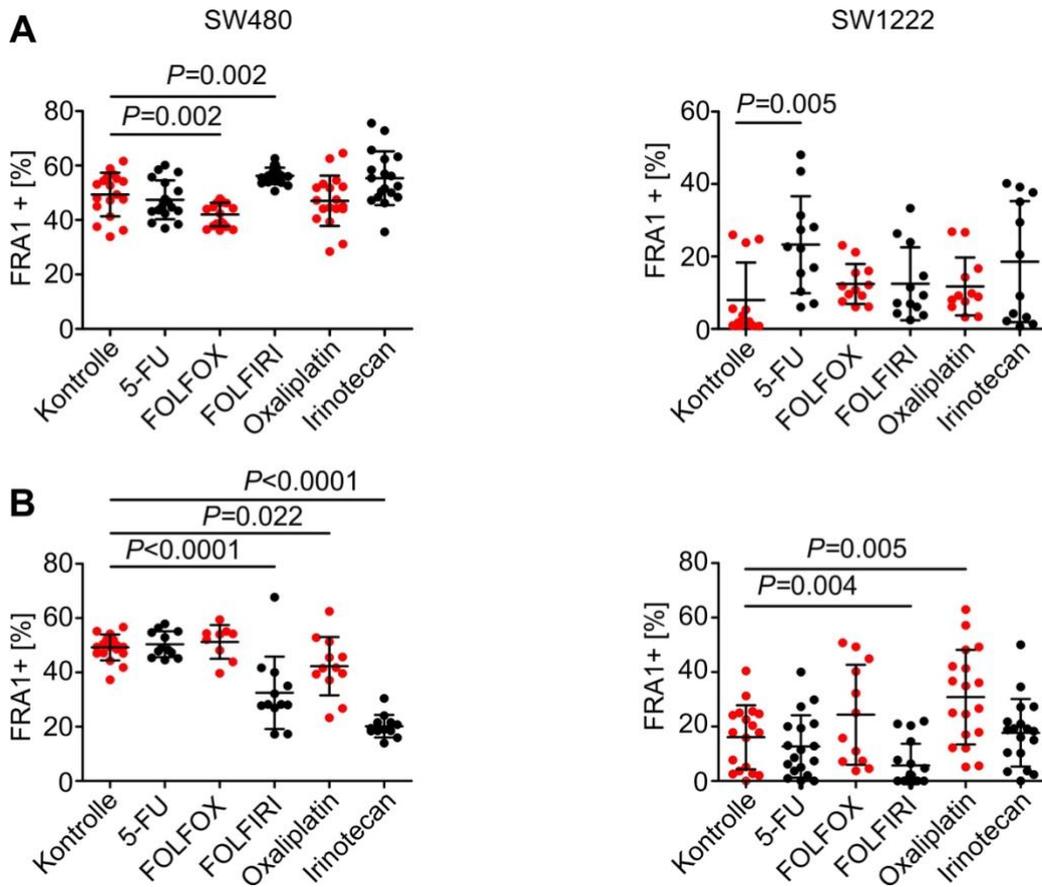


Abbildung 5.5.: Quantifizierte Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die MAPK Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit Expression von FRA1, welches die MAPK Signalwegaktivität widerspiegelt, nach **(A)** 3 und **(B)** 10 Tagen Chemotherapie wie angegeben. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. *P* Werte sind *t*-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

5.1.3. Wirkung von Kurzzeit Chemotherapie auf die NOTCH Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen.

Um auch die Effekte von gängigen Chemotherapien auf die Signalwegaktivitäten von NOTCH zu klären, wurden die Xenotransplantate mittels Immunhistochemie auf die Akkumulation von aktivem NOTCH1 (die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors; Notch Intracellular Domain, NICD) hin untersucht. Die unbehandelten Kontrollen der SW480 und SW1222 Tumoren zeigten eine hohe

Rate an NICD positiven Tumorzellen, welches wiederum die NOTCH Signalwegaktivität reflektiert (Abbildung 5.6).

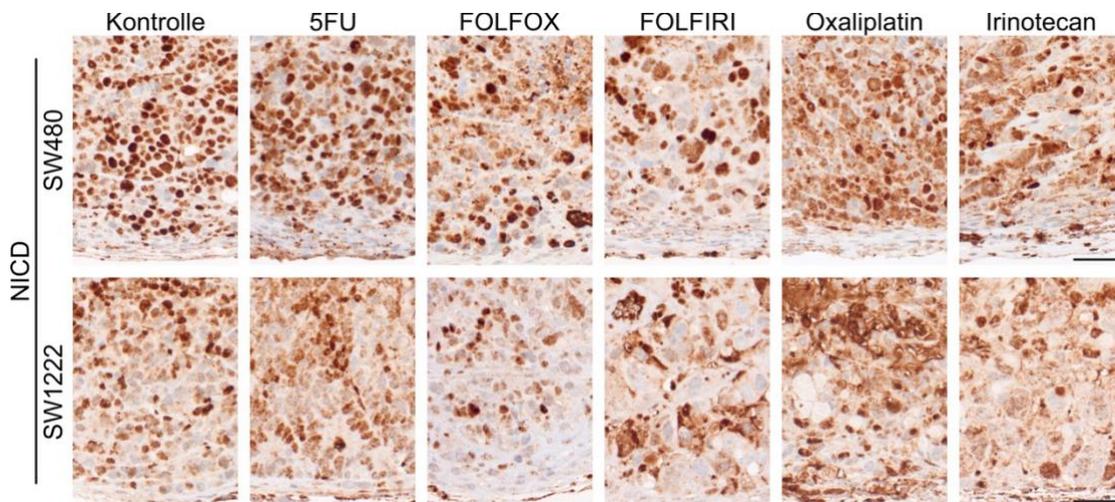


Abbildung 5.6: Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die NOTCH Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für die intrazelluläre Domäne des NOTCH-Rezeptors (Notch intracellular Domain, NICD), von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die über zehn Tage mit verschiedenen Chemotherapien oder nur dem Lösungsmittel (Kontrolle), wie angegeben, behandelt wurden. Maßstabbalken entsprechen 50 μm .

Bei der Bewertung fiel interessanterweise auf, dass in den SW480 Xenotransplantaten nach zehn Tagen alle Chemotherapien zu einem signifikanten Abfall der NICD positiven Tumorzellen führten (Abbildung 5.7 B). Auch nach dreitägiger Chemotherapie kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Außer bei Oxaliplatin als Monotherapie, kam es auch hier zu einer signifikanten Reduktion der NICD positiven Zellen in den Xenotransplantaten unter den verschiedenen Therapien (Abbildung 5.7 A). Dagegen führte bei den SW1222 Tumoren nur Irinotecan nach drei Tagen und FOLFIRI nach zehn Tagen zu einem signifikanten Abfall der NICD positiven Zellen (Abbildung 5.7 A-B).

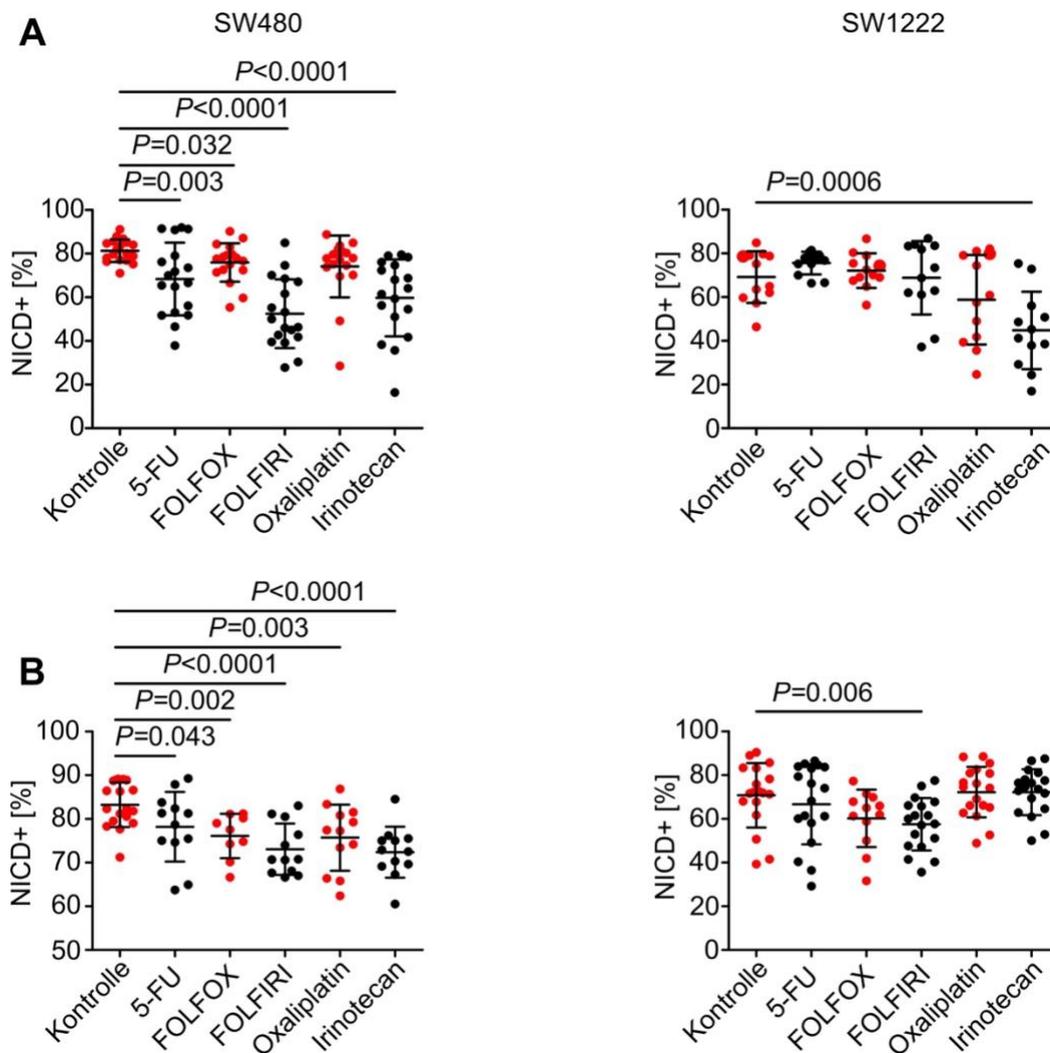


Abbildung 5.7: Quantifizierte Effekte von Kurzzeit Chemotherapie auf die NOTCH Signalwegaktivität in Kolonkarzinomen. Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit Expression von der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (Notch intracellular Domain, NICD), welches die NOTCH Signalwegaktivität widerspiegelt, nach **(A)** 3 und **(B)** 10 Tagen Chemotherapie wie, angegeben. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

Zusammengenommen zeigen diese Beobachtungen und Ergebnisse, dass verschiedene Chemotherapie-Protokolle einen variablen Einfluss auf die Expression von Tumorzellen mit hoher WNT oder MAPK Signalaktivität haben können, während die Expression von Tumorzellen mit hoher NOTCH Signalwegaktivität oft reduziert wird. Dennoch bleiben Tumorzellpopulationen mit den verschiedenen Signalwegaktivitäten unter Chemotherapie erhalten.

5.2. Kombination zielgerichteter MAPK und NOTCH Therapie mit 5-FU Chemotherapie

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Kombination von einem MEK-Inhibitor, zur Hemmung des MAPK Signalwegs, mit einem γ -Sekretase-Inhibitor zur Hemmung des NOTCH Signalwegs, das Tumorwachstum in Xenotransplantaten signifikant reduziert (Schmidt u. a., 2018). Um diese therapeutischen Effekte mit denen einer Chemotherapie zu vergleichen, wurden SW480 und SW1222 Xenotransplantate in einem Langzeitexperiment behandelt. Die Behandlung erfolgte mit 5-Fluoruracil für die Chemotherapie oder mit Selumetinib (AZD) und Dibenzazepin (DBZ) für die MEK- und NOTCH Inhibition und wurde bis zu einer Dauer von 31 Tagen durchgeführt (Abbildung 5.8). Darüber hinaus wurde, um etwaige zusätzliche Therapieeffekte beurteilen zu können, die Kombination von 5-FU mit den beiden Inhibitoren AZD und DBZ getestet. Mäuse die nur mit den jeweiligen Lösungsmitteln von 5-FU, AZD und DBZ behandelt wurden, dienten als Kontrolle.

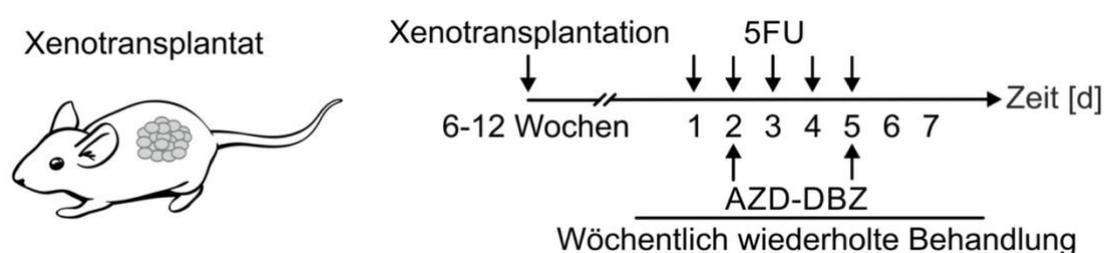


Abbildung 5.8: Schema und Zeitplan für die Xenotransplantation und die anschließende Therapie. 5-Fluoruracil wurde an fünf Tagen pro Woche, AZD und DBZ zweimal wöchentlich verabreicht bis zu einer Maximaldauer von 31 Tagen.

Alle Therapieprotokolle reduzierten das Tumorwachstum in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten signifikant gegenüber der Kontrolle (Abbildung 5.9 A). Auch verlängerten alle genannten Therapien das tumorspezifische Überleben

signifikant (Abbildung 5.9 B). Es zeigte sich, dass die Therapien bei den SW480 Xenotransplantaten mit 5-FU oder mit AZD und DBZ das Tumorwachstum ähnlich stark reduzierten. Bei den SW1222 Tumoren war die AZD und DBZ Therapie gegenüber der 5-FU Monotherapie bezüglich des Tumorwachstums etwas effektiver, allerdings nicht signifikant (Abbildung 5.9 A). Überraschenderweise konnten bei der Behandlung der Xenotransplantate mit der Kombination von 5-FU, AZD und DBZ keine signifikanten, zusätzlichen therapeutischen Effekte beobachtet werden (Abbildung 5.9 A). Allerdings führte die Kombinationstherapie in den SW1222 Xenotransplantaten nahezu zu einem Stillstand des Tumorwachstums (Abbildung 5.9 A).

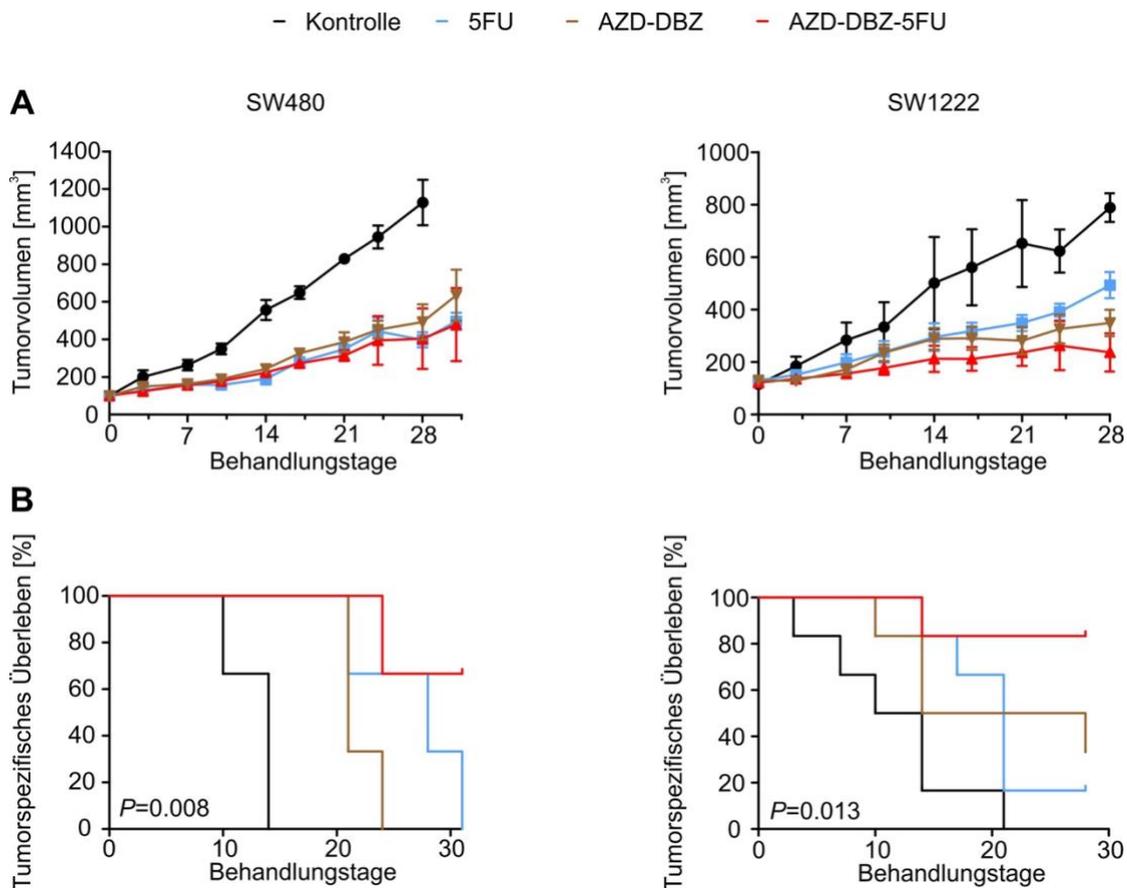


Abbildung 5.9: Auswirkung von 5-FU Chemotherapie und MAPK und NOTCH Inhibition auf Kolonkarzinome. (A) Langzeittherapie Effekte von 5-FU, Selumetinib (AZD) und Dibenazepin (DBZ) und deren Kombination, im Vergleich zur Kontrolle auf SW480 und SW1222 Xenotransplantate. Die Abbildung zeigt Wachstumskurven, Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SE und $n \geq 3$ für jede Behandlungsgruppe. **(B)** Langzeittherapie Effekte von 5-FU, AZD und DBZ und deren Kombination auf das Überleben. Diagramme zeigen das tumorspezifische Überleben als Kaplan-Meier Kurven. P Werte sind Ergebnisse eines Log-Rank Tests.

Um die beobachteten therapeutischen Effekte weiter beurteilen zu können, wurde von den Tumoren, welche mit 5-FU, AZD, DBZ, oder deren Kombination behandelt wurden, die Tumornekrose untersucht (Abbildung 5.10 A). Dafür wurden die relativen Tumornekroseflächen bestimmt (Abbildung 5.10 B). Alle Tumoren, auch die Kontrollen, wiesen große Areale mit Tumornekrose auf (Abbildung 5.10 A). Die genaue Bestimmung der Tumornekrose für die unterschiedlichen Behandlungsgruppen ergab, dass in SW480 Xenotransplantaten 5-FU als Monotherapie oder die Kombination von 5-FU mit

AZD und DBZ die Tumornekrose signifikant erhöhte und damit die Menge von vitalem Tumorgewebe, im Vergleich zur Kontrolle reduzierte (Abbildung 5.10 B). In den SW1222 Xenotransplantaten konnte eine Zunahme der Nekrose unter allen Therapien mit ähnlich starken Effekten der unterschiedlichen Therapiegruppen beobachtet werden (Abbildung 5.10 B). Wichtig ist jedoch, dass die Kombination von 5-FU mit AZD und DBZ keine signifikante Steigerung der Tumornekrose im Vergleich zu den Einzeltherapien bewirken konnte.

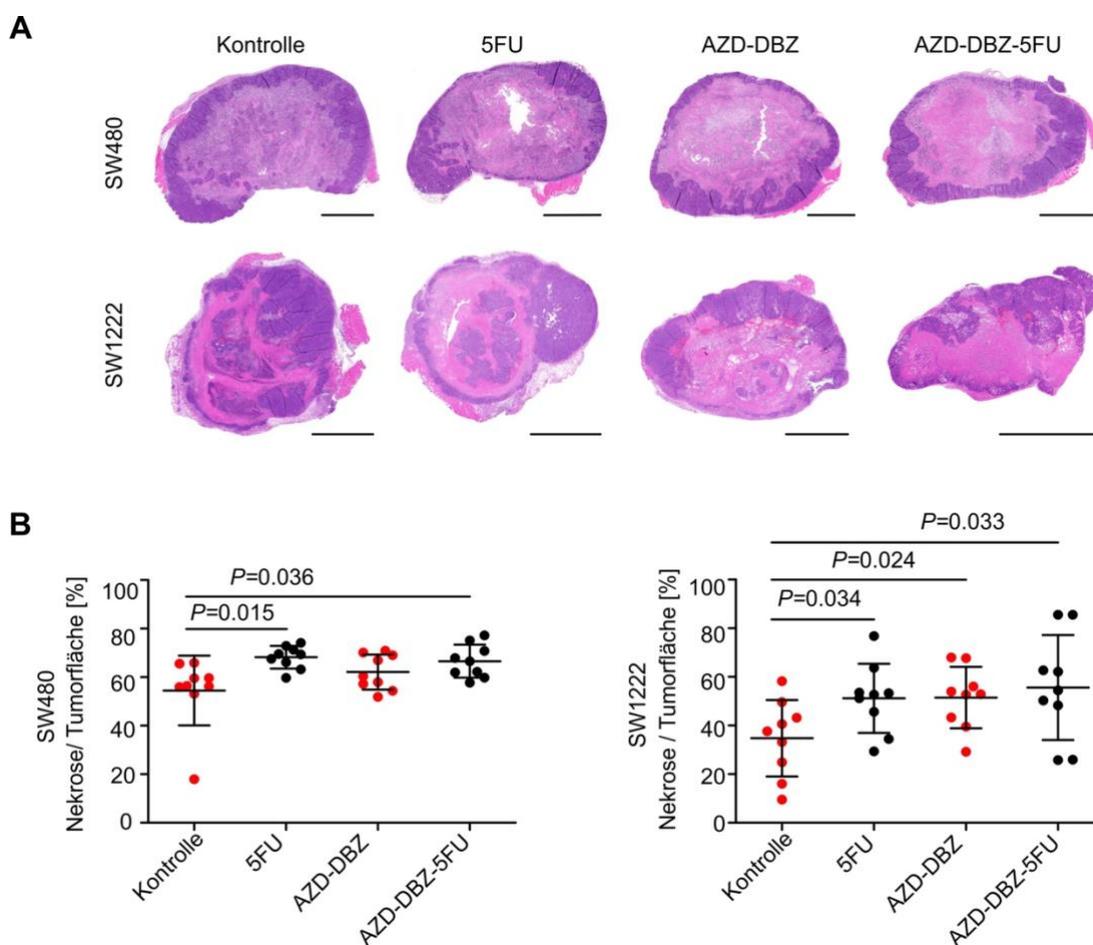


Abbildung 5.10: Effekte von 5-FU Chemotherapie und MAPK und NOTCH Inhibition auf Tumornekrose in Kolonkarzinomen. (A) Repräsentative, Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten nach einer entsprechenden Langzeittherapie wie angegeben. Maßstabballen entsprechen 2mm. (B) Quantifizierung der Tumornekrose in behandelten SW480 und SW1222 Xenotransplantaten. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

Zusammengefasst zeigen diese Untersuchungen und Ergebnisse, dass die therapeutischen Effekte von 5-FU oder MAPK und NOTCH Inhibition, mit AZD und DBZ vergleichbar sind. Die Kombination beider Therapien bewirkte, bezogen auf das Tumorwachstum, keine zusätzlichen positiven Therapieeffekte.

5.3. Auswirkung von 5-FU, MAPK und NOTCH Inhibition auf Proliferation und Apoptose

Um die in Abschnitt 5.2 beschriebenen therapeutischen Effekte auf Xenotransplantate besser zu verstehen, wurden Proliferation- und Apoptoseraten von den behandelten SW480 und SW1222 Tumoren bestimmt. Für die Bestimmung der Proliferation wurden Schnitte der Xenotransplantate immunhistochemisch für Ki67, einem Proliferationsmarker, gefärbt (Abbildung 5.11 A) und für die Quantifizierung der Ki67 positiven Tumorzellen repräsentative Ausschnitte bewertet. In SW480 Xenotransplantaten zeigte sich, dass sich die Proliferation unter der 5-FU Monotherapie im Vergleich zur Kontrolle leicht reduzierte (Abbildung 5.11 A-B). Die Therapie mit AZD und DBZ reduzierte in diesen Tumoren die Proliferation stärker als die 5-FU Monotherapie (Abbildung 5.11 A-B). Jedoch konnte die Kombination beider Therapien nur wenig stärkere Effekte als AZD und DBZ alleine zeigen. Dagegen konnten in SW1222 Transplantaten stärkere Effekte aller Therapien beobachtet werden. Die

Kombination von 5-FU mit AZD und DBZ reduzierte die Proliferationsrate um mehr als 50% (Abbildung 5.11 A-B).

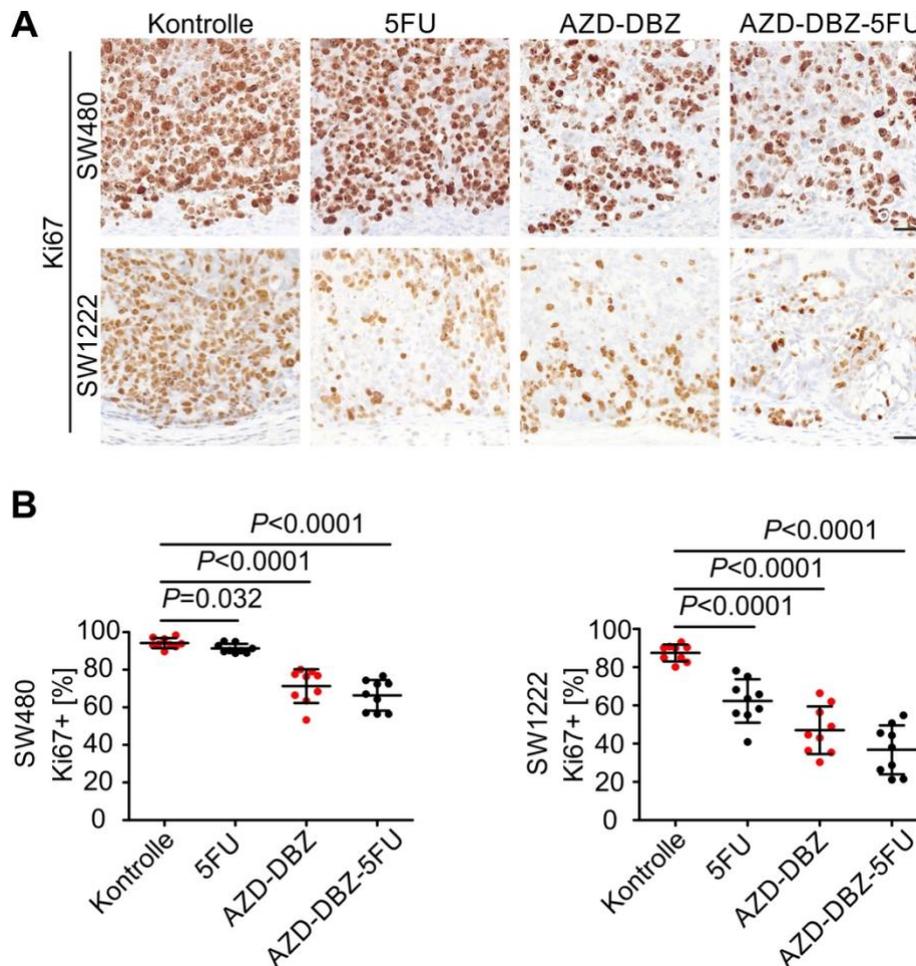


Abbildung 5.11: Proliferation in Kolonkarzinomen nach einer Langzeittherapie. (A) Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für Ki67, von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die mit einer Langzeittherapie, wie angegeben, behandelt wurden. Maßstabbalken entsprechen 50 μ m **(B)** Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit Expression von Ki67, nach der angegebenen Chemo- und/oder Inhibitor Therapie. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

Eine Färbung für Cleaved Caspase-3 wurde angefertigt, um die Apoptoserate beurteilen zu können (Abbildung 5.12 A). Sowohl in den SW480 als auch in den SW1222 Tumoren zeigte sich unter der Therapie mit 5-FU, AZD und DBZ oder der Kombination beider ein Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5.12 B). Dieser Anstieg war in den SW1222 Tumoren deutlicher als

in den SW480 Xenotransplantaten. Allerdings führte die Kombination von 5-FU, AZD und DBZ in den SW480 Tumoren nicht zu einem Anstieg der Apoptoserate, im Vergleich zur Therapie mit AZD und DBZ alleine. Bei den SW1222 Tumoren konnte ein leichter Anstieg beobachtet werden, jedoch nicht signifikant (Abbildung 5.12 B).

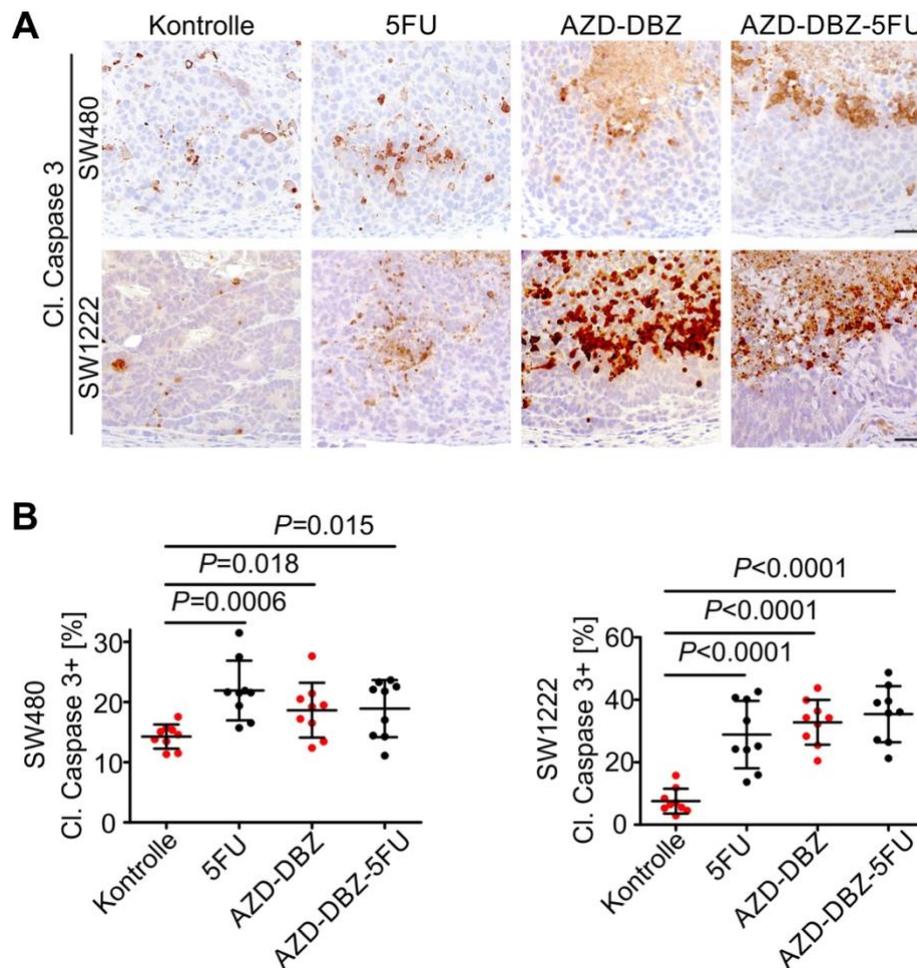


Abbildung 5.12: Apoptose in Kolonkarzinomen nach einer Langzeittherapie. (A) Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für Cleaved Caspase-3, von SW480 und SW1222 Xenotransplantaten, die mit einer Langzeittherapie, wie angegeben behandelt wurden. Maßstabbalken entsprechen 50 μ m. **(B)** Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit Expression von Cleaved Caspase-3, nach der angegeben Chemo- und/oder Inhibitor Therapie. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die MAPK und NOTCH Inhibition stärkere Effekte auf die Proliferation von Tumorzellen in Kolonkarzinomen, als 5-FU hatte, während die Apoptoserate von den verschiedenen Therapien ähnlich beeinflusst wurde.

5.4. Effekte von 5-FU, MAPK und NOTCH Inhibition auf die Expression von Thymidylat-Synthase

Eine mögliche Ursache für die Resistenz von Kolonkarzinomen gegen eine Therapie mit 5-Fluoruracil ist die erhöhte Expression des Enzyms Thymidylat-Synthase (Peters u. a., 2002). Um die Bedeutung von diesem möglichen Resistenzmechanismus für die bisher beschriebenen Beobachtungen und Ergebnisse zu evaluieren, wurden die Tumoren der verschiedenen Therapiegruppen und Kontrollen auf die Expression von Thymidylat-Synthase untersucht. Dafür wurden immunhistochemische Färbungen der einzelnen Xenotransplantate angefertigt und schließlich bewertet (Abbildung 5.12 A-B). Bei der Bewertung zeigte sich, dass die Tumorzellen der SW480 und SW1222 Xenotransplantate eine Thymidylat-Synthase Expression von 59,4%, beziehungsweise 63,8% aufwiesen (Abbildung 5.12 A-B). Wie erwartet, kam es unter der 5-FU Monotherapie, sowohl in SW480 als auch in SW1222, zu einem signifikanten Anstieg der Thymidylat-Synthase positiven Tumorzellen (Abbildung 5.12 B). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter AZD und DBZ Therapie eine Reduktion der Expression von positiven Tumorzellen, jedoch in SW480 Tumoren nicht signifikant. Dieser Effekt verschwand allerdings bei der Kombination mit 5-FU ganz oder teilweise (Abbildung 5.12 A-B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition von MAPK und NOTCH Signalwegen nicht zu einer 5-FU

Therapieresistenz über die Induktion von Thymidylat-Synthase Expression führte.

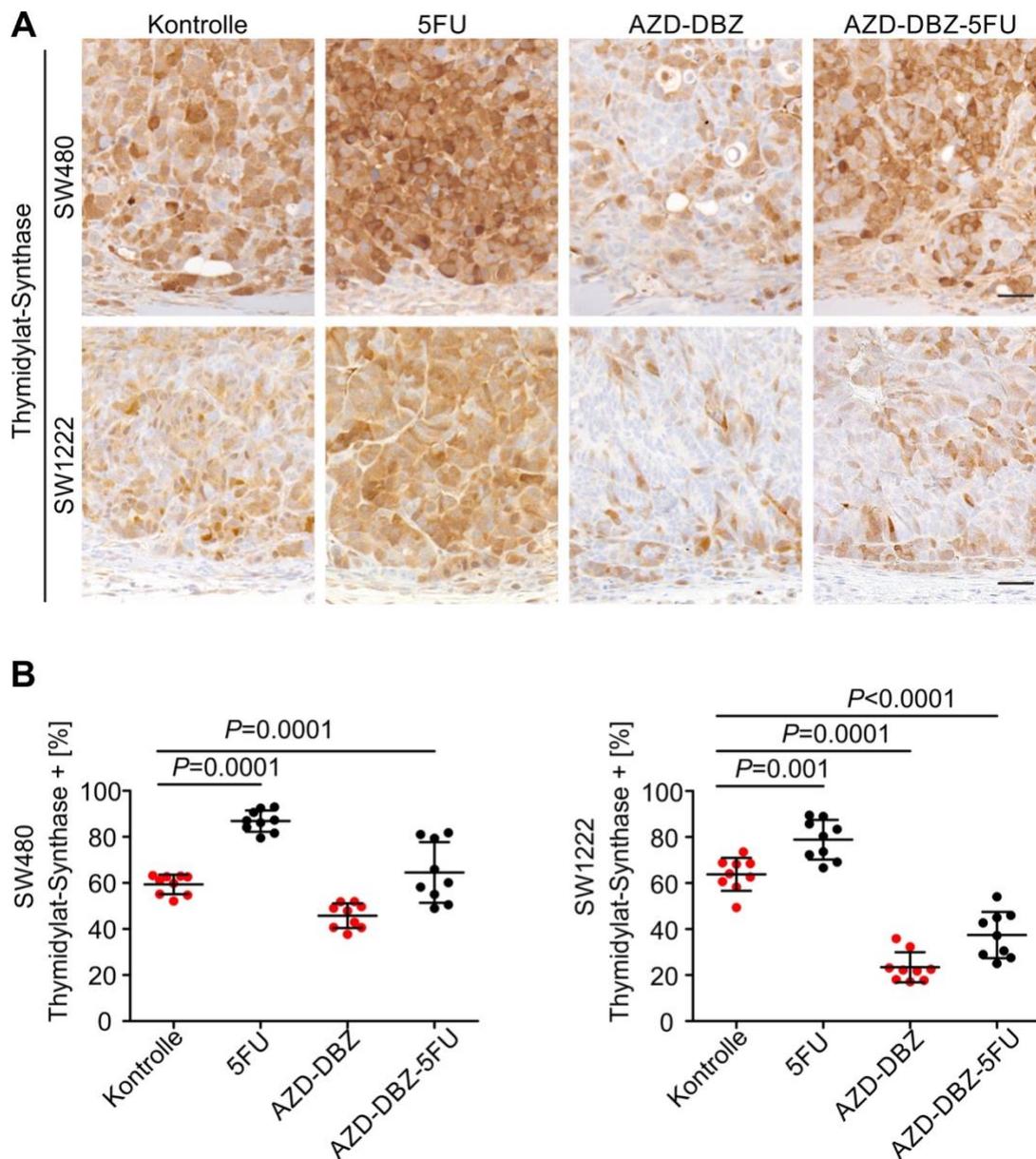


Abbildung 5.12: Expression von Thymidylat-Synthase in Xenotransplantaten bei Langzeittherapie. (A) Repräsentative Areale von immunhistochemischen Färbungen für Thymidylat-Synthase, von SW480 und SW122 Xenotransplantaten, die mit einer Langzeittherapie, wie angegeben, behandelt wurden. Maßstabbalken entsprechen 50 μ m. **(B)** Quantifizierung von Tumorzellen in SW480 und SW1222 Xenotransplantaten mit Expression von Thymidylat-Synthase, nach der angegebenen Chemo- und/oder Inhibitor Therapie. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte \pm SD. P Werte sind t-Test Ergebnisse. $n \geq 3$.

6. Diskussion

Kolorektale Karzinome, bei denen eine rein chirurgische Therapie ausgeschlossen ist, werden meist mit unterschiedlichen Chemotherapeutika in verschiedenen Therapieprotokollen behandelt (Abschnitt 1.5.2.1) (Van Cutsem u. a., 2016). Chemotherapeutika wie zum Beispiel 5-Fluoruracil, wirken zytotoxisch über den Eingriff in den Zellzyklus und damit in die DNA-Synthese und verhindern so die weitere Zellproliferation (Longley u. a., 2003). Es ist also vorstellbar, dass solche Chemotherapeutika, die in den aktiven Zellzyklus und in die DNA-Synthese eingreifen, Effekte auf die in kolorektalen Karzinomen vorkommenden Signalwege wie WNT, MAPK und NOTCH haben. Mithilfe von Tumormodellen sollte die Wirkung von Chemotherapie auf die genannten Signalwege in dieser Arbeit untersucht werden.

Um spezifischer und zielgerichteter gegen Tumorzellen vorzugehen können, wie in Abschnitt 1.5.2.2 dargelegt, mit neueren Formen von zielgerichteter Tumortherapie unter anderem Signalwege wie der MAPK Signalweg, mit Hilfe von Antikörpern gegen EGFR oder MEK Inhibitoren gehemmt und damit das Fortschreiten der Tumorprogression verlangsamt werden (Miyamoto u. a., 2017). Auch die Hemmung des NOTCH Signalwegs mit einem γ -Sekretase-Inhibitor und zeitgleicher Inhibition von MAPK kann das Tumorwachstum in Modellen stark reduzieren (Schmidt u. a., 2018). Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich das durch MAPK und NOTCH Inhibition verringerte Tumorwachstum weiter - durch die Kombination solcher zielgerichteten Therapien mit einer gängigen Chemotherapie - eindämmen lässt und dadurch eine mögliche Alternative für Patienten mit Kolonkarzinom darstellen könnte.

6.1. Effekte von Chemotherapie auf Signalwegaktivitäten in Kolonkarzinomen

Die Auswirkungen von aktuellen und häufigen Chemotherapien wie 5-Fluoruracil, Oxaliplatin oder Irinotecan auf die Signalwege WNT, MAPK und NOTCH in Kolonkarzinomen wurden hier untersucht. Es wurden SW1222 und SW480 Xenotransplantate genutzt, da diese Zelllinien Tumorzellsubpopulationen mit hoher WNT, MAPK und NOTCH Signalwegaktivität besitzen und somit adäquat primäre Kolonkarzinome widerspiegeln (Schmidt u. a., 2018). Die Signalwegaktivitäten wurden mit der immunhistochemischen Analyse von nuklearem β -Catenin für den WNT Signalweg, beziehungsweise FRA1 für den MAPK Signalweg bewertet (Abbildungen 5.2-5.5). In den Ergebnissen zeigte sich, dass sowohl die Monotherapien mit dem jeweiligen Therapeutikum, als auch die Kombinationstherapien FOLFOX und FOLFIRI variable und eher mäßige Effekte auf die Expression von Tumorzellen mit WNT und MAPK Signalwegaktivität hatten (Abbildungen 5.2-5.5). Tumorzellsubpopulationen mit hoher WNT oder MAPK Signalwegaktivität könnten potentielle Tumorstammzellen repräsentieren und damit verantwortlich für eine Tumorprogression beziehungsweise Rezidivneigung sein (Blaj u. a., 2017; Vermeulen u. a., 2010). Die gering beobachteten Effekte auf die Signalwegaktivitäten in diesen Tumorzellen implizieren, dass diese Tumorzellsubpopulationen, welche also Stammzeleigenschaften haben könnten, nicht spezifisch von den typischen Chemotherapie-Protokollen beeinflusst oder gar angegriffen werden und daher die Möglichkeit besteht, Therapieresistenz und Tumorprogression zu verursachen (Eyler und Rich, 2008).

Konsistentere Effekte zeigten sich bei der Untersuchung der NOTCH Signalwegaktivität, welche über die immunhistochemische Färbung der intrazellulären Domäne des NOTCH-Rezeptors (Notch intracellular Domain, NICD) dargestellt werden konnte (Abbildung 5.6). Die Bewertung der NOTCH Signalwegaktivität ergab, dass die Rate an NICD positiven Tumorzellen unter verschiedenen Chemotherapien signifikant reduziert wurde (Abbildung 5.7). (Schmidt u. a., 2018) konnten zeigen, dass Tumorzellen mit hoher NOTCH Signalwegaktivität stärker proliferieren, als solche mit hoher MAPK Signalwegaktivität. Das könnte eine Erklärung dafür sein, warum Tumorzellpopulationen mit hoher NOTCH Signalwegaktivität von Chemotherapeutika, deren Ziel primär stark proliferierende Zellen sind (Zajac u. a., 2016), mehr von der Therapie beeinflusst werden als andere und daher die Population sinkt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die zurzeit angewandte Chemotherapie-Schemata für Patienten, die an kolorektalen Karzinomen leiden, inkonstante Einflüsse auf die Signalwegaktivitäten von WNT und MAPK positiven Tumorzellsubpopulationen haben können. Wichtig ist jedoch, dass diese Tumorzellsubpopulationen und auch jene mit hoher NOTCH Signalwegaktivität unter allen Therapieschemen in unterschiedlichem Ausmaß erhalten geblieben sind (Abbildung 5.2-5.7). Weitere wissenschaftliche Arbeit und Forschung wird notwendig sein, um herauszufinden welche Bedeutung das Verbleiben solcher Tumorzellpopulationen hat für die Therapie von Patienten, die an therapieresistenten Kolonkarzinomen leiden. Insbesondere die Bedeutung von

verbliebenen Tumorzellpopulationen die Stammzeleigenschaften tragen könnten (Blaj u. a., 2017; Vermeulen u. a., 2010).

6.2. Kombination zielgerichteter MAPK und NOTCH Therapie mit 5-FU Chemotherapie

Wie zu Beginn schon angesprochen, gelang es (Schmidt u. a., 2018) zu demonstrieren, dass eine gemeinsame Hemmung des MAPK Signalwegs und des NOTCH Signalwegs mit dem MEK Inhibitor Selumetinib (AZD), beziehungsweise mit dem γ -Sekretase-Inhibitor Dibenzazepin (DBZ) erheblich zur Reduktion des Tumorwachstums von kolorektalen Xenotransplantaten führt. Die in 5.1.2. und 5.1.3. dargestellten Ergebnisse, welche zeigten, dass Tumorzellpopulationen mit hoher MAPK und NOTCH Signalwegaktivität in, mit verschiedenen Chemotherapie-Protokollen behandelten Tumoren, generell persistierten (Abbildung 5.4-5.7) führten zu dem logischen Schluss Chemotherapie mit einer solchen Inhibitor Therapie zu kombinieren. Das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) ist Bestandteil vieler gängiger Chemotherapie-Schemata und wird häufig in Kombination - wie zum Beispiel in den Protokollen FOLFOX mit Oxaliplatin oder FOLFIRI mit Irinotecan - angewendet (Van Cutsem u. a., 2016). Darüber hinaus hatte 5-FU eher geringe Effekte auf die Tumorzellpopulationen mit MAPK und NOTCH Signalwegaktivität (Abbildung 5.4-5.7) und dadurch waren besonders hier mögliche zusätzliche Therapieeffekte zu erwarten. Deshalb wurde 5-FU für die Kombinationstherapie mit AZD und DBZ ausgewählt. Jedoch wurde wider Erwarten festgestellt, dass die Kombination einer MAPK und NOTCH Signalweghemmung mit 5-FU nur minimal verbesserte Therapieeffekte in einem von zwei Tumormodellen, im

Vergleich zur 5-FU Monotherapie oder AZD und DBZ Inhibitor Therapie zeigte (Abbildung 5.9 A).

Auch beim Tumorzerfall - gemessen an dem Ausmaß von Tumornekrose und Apoptose - zeigte sich kein signifikanter Unterschied verglichen mit der 5-FU Monotherapie oder der AZD und DBZ Inhibitor Therapie (Abbildungen 5.10 und 5.12). Es konnten jedoch die von (Schmidt u. a., 2018) gezeigte Daten, zur signifikanten Reduktion der Proliferation unter AZD und DBZ Therapie reproduziert und dadurch untermauert werden (Abbildung 5.11). Es wäre möglich, dass durch die verringerte Proliferation der Tumorzellen zusätzliche positive Effekte von 5-FU, in Kombination mit den Inhibitoren AZD und DBZ ausbleiben, da 5-FU in seinen Wirkmechanismen als zytotoxisches Chemotherapeutikum - und damit Schädigung von DNA und Verhinderung von Proliferation - (Longley u. a., 2003) eingeschränkt ist. Außerdem wurde eine Abnahme des Enzyms Thymidylat-Synthase (TS), einer der Hauptangriffspunkte von 5-FU (Longley u. a., 2003), unter AZD und DBZ Inhibitor Therapie beobachtet (Abbildung 5.12). Weil also unter einer MAPK und NOTCH Signalweginhibition die Expression von Thymidylat-Synthase deutlich zurück ging und daher von einer Wirkung der Therapie via Proliferations- und damit Proteinsynthesehemmung auszugehen ist, spricht einiges dafür, dass die Inhibitor Therapie die Wirkung von 5-FU verminderte und nicht umgekehrt. Es bleibt also zu klären, ob Änderungen von Chemotherapeutika und Therapieschemata zu besseren synergistischen Therapieeffekten führen können.

Thymidylat-Synthase ist nicht nur einer der Hauptangriffspunkte von 5-FU (Longley u. a., 2003), sondern eine hohe Expression von TS in Tumorzellen spielt auch eine entscheidende Rolle bei 5-FU resistenten Tumoren (Peters u. a., 2002) und ist möglicherweise mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit kolorektalen Karzinom assoziiert (Popat u. a., 2004). Deswegen könnte, besonders weil die Inhibition von MAPK und NOTCH Signalwegen zu einer ähnlich starken Reduzierung des Tumorwachstums wie eine 5-FU Monotherapie geführt hat, eine solche Inhibitor Therapie für Patienten mit 5-FU resistenten Kolonkarzinomen in Zukunft möglicherweise in Betracht kommen um so die Prognose verbessern.

Weitgehend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kombination von Chemotherapie mit zielgerichteten Therapien, bei denen auf molekularer Ebene Signalwege, die in kolorektalen Karzinomen vorkommen, sehr spezifisch gehemmt werden, nicht generell zusätzliche Vorteile mit sich bringt. Es ist möglich, dass dies teilweise durch bereits stark reduzierte Proliferation, aufgrund von Signalweghemmung und damit mit einem Wirkungsverlust von Chemotherapeutika einhergeht. Wie teilweise aus Abschnitt 1.2 hervorgeht, sind Kolonkarzinome morphologisch und genetisch sehr heterogene bösartige Erkrankungen (Bosman u. a., 2010; Guinney u. a., 2015). Auch in den hier verwendeten SW1222 und SW480 Xenotransplantat-Modellen zeigten sich, trotz vergleichbarem genetischem Hintergrund mit Mikrosatellitenstabilität und Mutationen in *TP53*, *APC* and *KRAS* Genen, variable Effekte der Therapie auf die Tumorzellsubpopulationen. Es muss daher die Relevanz dieser Beobachtungen und Ergebnisse erst für weitere verschiedene Tumorsubtypen

abgeklärt werden. Dann könnten eventuell zukünftige klinische Studien, die Therapieregime für kolorektale Karzinome untersuchen, von diesem Wissen profitieren und sie könnten letztlich Einfluss auf die Behandlung von Patienten mit Kolonkarzinom nehmen.

6.3 Ausblick

Aktuell werden Patienten, vor allem mit weit fortgeschrittenen und/oder metastasierten Formen von kolorektalen Karzinomen, meist adjuvant oder palliativ mit Chemotherapie behandelt, eventuell auch neoadjuvant, um eine chirurgische Therapie zugänglich zu machen (Van Cutsem u. a., 2016). Mittlerweile gibt es viele neuere Ansätze, Kolonkarzinome zielgerichtet durch das Hemmen von Signalwegen zu therapieren (Ciombor u. a., 2015). Die Auswirkungen von Chemotherapien auf Signalwegaktivitäten und die Möglichkeit einer Kombination von Chemo- und zielgerichteter Therapie wurden in dieser Arbeit untersucht und dabei versucht, Mechanismen möglicher Resistenzen zu verstehen. Dennoch bleiben einige Fragen bezüglich der Kombinationsmöglichkeiten von Therapien und der Tragweite, der in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, für unterschiedliche Tumorsubtypen ungeklärt:

- Sind die potentiellen Arzneimittel AZD und DBZ, mit ihren signalweghemmenden Eigenschaften - aufgrund von verminderter Proliferation während der Therapie - auch nicht mit anderen verwendeten zytotoxischen Therapeutika wie Oxaliplatin oder Irinotecan zu kombinieren?

- Bestehen Kombinationsmöglichkeiten von FOLFOX oder FOLFIRI mit einer AZD und/oder DBZ Therapie oder würde dies zu einer zu großen therapeutischen Belastung führen?
- Würden, durch die unter AZD und DBZ beobachtete Abnahme von Thymidylat-Synthase 5-FU, resistente Tumoren einer 5-FU Therapie zugänglich gemacht werden? Oder stellt sogar die alleinige Therapie mit AZD und DBZ eine mögliche Alternative dar?
- Welchen Einfluss haben die aktuell verwendeten Chemotherapeutika auf Tumorstammzellen und andere als die hier untersuchten Tumorsubtypen?

Diese Fragen gilt es in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten und Untersuchungen zu klären, um eventuell die Therapie und Prognose von Kolonkarzinomen in Zukunft zu verbessern.

7. Zusammenfassung

Patienten mit fortgeschrittenen Kolonkarzinomen werden neben einer chirurgischen Therapie meist einer Chemotherapie mit Fluorouracil, Irinotecan, Oxaliplatin oder deren Kombinationen FOLFOX und FOLFIRI zugeführt. Zudem ist es möglich Signalwege, welche aktiv in Kolonkarzinomen sind, zielgerichtet zu hemmen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss gängiger Chemotherapie auf die Signalwege WNT, MAPK und NOTCH, in Xenotransplantaten aus Kolonkarzinomzellen untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob sich mit der Kombination einer gängigen Chemotherapie mit Inhibitoren gegen die Signalwege MAPK und NOTCH, verbesserte therapeutische Effekte erzielen lassen. Die Ergebnisse zeigten, dass Kolonkarzinomzellen mit hoher WNT, MAPK und NOTCH Aktivität unterschiedlich auf Chemotherapie reagierten, aber grundsätzlich unter der Therapie aktiv blieben. Diese bestehenbleibende Aktivität ist ein Hinweis auf die begrenzte Wirksamkeit zytotoxischer Therapie auf diese Signalwege. Obwohl dadurch eine zusätzliche zielgerichtete Therapie gegen die Signalwege erfolgsversprechend scheint, konnte kein signifikant verbessertes Therapieansprechen unter der Kombination von MAPK und NOTCH Inhibitoren mit Fluorouracil beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten auf einen Rückgang der Tumorzellproliferation unter der Therapie mit MAPK und NOTCH Inhibitoren und damit einhergehender verminderter Wirksamkeit der systemischen Chemotherapie zurückzuführen sein. Die therapeutischen Vorteile der Kombination von Chemotherapie mit zielgerichteter Therapie gegen Signalwege müssen daher bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen in Zukunft kritisch bewertet werden.

8. Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATCC	American Type Culture Collection
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	Intraperitoneal
NICD	Notch intracellular Domain
p.o.	Per os
UICC	Union internationale contre le cancer

9. Literaturverzeichnis

Alberts, S.R., Sargent, D.J., Nair, S., Mahoney, M.R., Mooney, M., Thibodeau, S.N., Smyrk, T.C., Frank, A., Chan, E., Gill, S., u. a. (2012). Effect of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin With or Without Cetuximab on Survival Among Patients With Resected Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol.* 307, 1383–1393.

Alexandrov, L.B., Nik-zainal, S., Wedge, D.C., und Aparicio, S.A.J.R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.

Allegra, C.J., Yothers, G., O’Connell, M.J., Sharif, S., Petrelli, N.J., Lopa, S.H., und Wolmark, N. (2013). Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial. *J. Clin. Oncol.* 31, 359–364.

André, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Zaninelli, M., Clingan, P., Bridgewater, J., u. a. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343–2351.

André, T., De Gramont, A., Vernerey, D., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Tijeras-Raballand, A., Scriver, A., Hickish, T., Tabernero, J., Van Laethem, J.L., u. a. (2015). Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J. Clin. Oncol.* 33, 4176–4187.

Angers, S., und Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 468–477.

Arnold, D., Lueza, B., Douillard, J.Y., Peeters, M., Lenz, H.J., Venook, A., Heinemann, V., Van Cutsem, E., Pignon, J.P., Tabernero, J., u. a. (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann. Oncol.* 28, 1713–1729.

Barker, N., und Born, M. (2009). Detection of β -Catenin Localization by Immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* 468, 91–98.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642.

Bienz, M., und Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311–320.

Blaj, C., Schmidt, E.M., Lamprecht, S., Hermeking, H., Jung, A., Kirchner, T., und Horst, D. (2017). Oncogenic effects of high MAPK activity in colorectal cancer mark progenitor cells and persist irrespective of RAS mutations. *Cancer Res.* 77, 1763–1774.

- Bosch, S.L., Teerenstra, S., Wilt, J.H.W. De, Cunningham, C., Nagtegaal, I.D., und Bosch, S.L. (2013). Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy* 45, 827–834.
- Bosman, F.T., Organization, W.H., Carneiro, F., und Hruban, R.H. (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System. *Int. Agency Res. Cancer (IARC)*.
- Bray, S.J. (2006). Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 678–689.
- Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., und Wittekind, C. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours* (Wiley-Blackwell).
- Choi, J.Y., Jung, S., Shim, K., Cho, W.Y., Keum, B., Byeon, J., Huh, K.C., und Jang, B.I. (2015). Meta-analysis of Predictive Clinicopathologic Factors for Lymph Node Metastasis in Patients with Early Colorectal Carcinoma. *30*, 398–406.
- Chuen, S., Wong, C., Siu, E., Lo, F., Lee, K.C., Chan, J.K.C., und Hsiao, W.L.W. (2004). Prognostic and Diagnostic Significance of β -Catenin Nuclear Immunostaining in Colorectal Cancer. *10*, 1401–1408.
- Ciombor, K.K., Wu, C., und Goldberg, R.M. (2015). Recent Therapeutic Advances in the Treatment of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Med.* 66, 83–95.
- Clevers, H., und Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., und Ricciardiello, L. (2013). Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16365–16385.
- Connell, B.M.J.O., Mailliard, J.A., Kahn, M.J., Macdonald, J.S., Hailler, D.G., Mayer, R.J., und Wieand, H.S. (1997). Leucovorin Given for 6 Months as Postoperative Adjuvant Therapy for Colon Cancer. *Society* 15, 246–250.
- Coppedè, F., Lopomo, A., Spisni, R., und Migliore, L. (2014). Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 20, 943–956.
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausov??, J., Macarulla, T., Ruff, P., Van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., u. a. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol.* 30, 3499–3506.
- Van Cutsem, E., Lenz, H.J., Köhne, C.H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezínek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., Han Van Krieken, J., u. a. (2015). Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in

colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 33, 692–700.

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J.H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., u. a. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 27, 1386–1422.

Douillard, J.-Y., Oliner, K.S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., u. a. (2013). Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 369, 1023–1034.

Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., und Alakl, M. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : a multicentre randomised trial. 355, 1041–1047.

Van Es, J.H., Van Gijn, M.E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., Cozijnsen, M., Robine, S., Winton, D.J., Radtke, F., u. a. (2005). Notch/ γ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963.

Eyler, C.E., und Rich, J.N. (2008). Survival of the fittest: Cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 26, 2839–2845.

Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrine, G., Barbara, C., Crinò, L., Benedetti, G., Evangelista, W., Fanchini, L., u. a. (2007). 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 nor. *J. Clin. Oncol.* 25, 1670–1676.

Fearon, E.R. (2011). Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6, 479–507.

Fearon, E.F., und Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R.M., Barregard, L., Bhutta, Z.A., Brenner, H., Dicker, D.J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L., u. a. (2017). Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden . *JAMA Oncol.* 3, 524–548.

Fodde, R., und Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 5, 745–749.

Gill, S., Loprinzi, C.L., Sargent, D.J., Thomé, S.D., Alberts, S.R., Haller, D.G., Benedetti, J., Francini, G., Shepherd, L.E., Seitz, J.F., u. a. (2004). Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? *J. Clin. Oncol.* 22, 1797–1806.

- Gonga, S., Dongsheng, X., Zhu, J., Zou, F., und Rui, P. (2018). Efficacy of the MEK Inhibitor Cobimetinib and its Potential Application to Colorectal Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 680–693.
- Grothey, A., Van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., u. a. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* *381*, 303–312.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Sonesson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., u. a. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* *21*, 1350–1356.
- Haifeng, L., Jia, X., Ning, S., Shuyang, X., Jian, W., Wei, W., Fengzhen, M., Haiya, L., Wang, A., Xiankui, C., u. a. (2018). Notch signaling promotes serrated neoplasia pathway in colorectal cancer through epigenetic modification of EPHB2 and EPHB4. *Cancer Manag. Res.* *10*, 6129–6141.
- Hanahan, D., und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Heinemann, V., Weikersthal, L.F. Von, Decker, T., Kiani, A., Vehling-kaiser, U., Scholz, M., Müller, S., Link, H., Niederle, N., Rost, A., u. a. (2014). 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.* *15*, 1065–1075.
- Heinemann, V., Rivera, F., O’Neil, B.H., Stintzing, S., Koukakis, R., Terwey, J.H., und Douillard, J.Y. (2016). A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* *67*, 11–20.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., u. a. (2004). Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2335–2342.
- Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., und Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int. J. Cancer* *125*, 171–180.
- Ilyas, M., Tomlinson, I.P., Rowan, A., Pignatelli, M., und Bodmer, W.F. (1997). Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10330–10334.
- Jen, J., Powell, S.M., Papadopoulos, N., Smith, K.J., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., und Kinzler, K.W. (1994). Molecular Determinants of Dysplasia in Colorectal Lesions. *Cancer Res.* *54*, 5523–5526.

Jeught, K. Van Der, Xu, H., Li, Y., Lu, X., Ji, G., Jeught, K. Van Der, Xu, H., und Li, Y. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *24*, 3834–3848.

Kabbinavar, F.F., Schulz, J., McCleod, M., Patel, T., Hamm, J.T., Hecht, J.R., Mass, R., Perrou, B., Nelson, B., und Novotny, W.F. (2005). Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: Results of a randomized phase II trial. *J. Clin. Oncol.* *23*, 3697–3705.

Kahn, M. (2015). Can we safely target the WNT pathway? *13*, 513–532.

Kim, E.K., und Choi, E.-J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* *89*, 867–882.

Kinzler, K.W., und Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159–170.

Klimpfinger, M., Wittekind, C., und Sobin, L.H. (2005). *TNM-Atlas* (Springer, Berlin, Heidelberg).

Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., und Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a b-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* (80-). *275*, 1784–1787.

Kume, T. (2009). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J. Angiogenes. Res.* *1*, 8.

Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G.D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., und Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *24*, vi64-vi72.

Lemieux, E., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., und Rivard, N. (2009). Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* *125*, 1575–1586.

Liu, Y., und Bodmer, W.F. (2006). Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *103*, 976–981.

Liu, F., Yang, X., Geng, M., und Huang, M. (2018). Targeting ERK , an Achilles ' Heel of the MAPK pathway , in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* *8*, 552–562.

Longley, D.B., Harkin, D.P., und Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 330–338.

Miyamoto, Y., Suyama, K., und Baba, H. (2017). Recent advances in targeting the EGFR signaling pathway for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 752.

Morin, P.J., Sparks, a B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., und Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by

mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.

Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K., und Arends, M.J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 469, 125–134.

Network, T.C.G.A., Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J. a., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., u. a. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337.

Noone, A., Howlader, N., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D., u. a. (2018). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015.

Pancione, M., Remo, A., und Colantuoni, V. (2012). Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog. Res. Int.* 2012, 509348.

Pawlik, T.M., Devon, K.M., Fields, C.A., und Hinshaw, D.B. (2014). What are patients' expectations about the effects of chemotherapy for advanced cancer? *J. Am. Coll. Surg.* 219, 588–590.

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, und Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein(MAP) Kinase pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.

Peters, G.J., Backus, H.H.J., Freemantle, S., Van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., Van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S., u. a. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1587, 194–205.

Peti, W., und Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci.* 22, 1698–1710.

Phelps, R.A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Randall, W., und Jones, D.A. (2010). A two step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. 137, 623–634.

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 9.

Popat, S., Matakidou, A., und Houlston, R.S. (2004). Thymidylate Synthase Expression and Prognosis in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Oncol.* 22, 529–536.

Pox, C., Schmiegel, W., Buchberger, B., Follmann, M., Graeven, U., Heinemann, V., Langer, T., Nothacker, M., Porschen, R., Rödel, C., u. a. (2017). S3-Leitlinie - Kolorektales Karzinom (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)).

QUASAR Collaborative Group (2007). Adjuvant chemotherapy versus

observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 2020–2029.

Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., und Velculescu, V.E. (2002). RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934.

Ranganathan, P., Weaver, K.L., und Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* 11, 338–351.

Raskov, H., Pommergaard, H.C., Burcharth, J., und Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J. Gastroenterol.* 20, 18151–18164.

Reedijk, M., Odorcic, S., Zhang, H., Chetty, R., Tennert, C., Dickson, B.C., Lockwood, G., Gallinger, S., und Egan, S.E. (2008). Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 33, 1223–1229.

Robert-Koch-Institut, und E.V., G. der epidemiologischen K. in D. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. 154.

Rowan, A., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W., und Tomlinson, I. (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational „hotspot“ and interdependence of the „two hits“. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3352–3357.

Sabio, G., und Davis, R.J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237–245.

Sargent, D.J., Goldberg, R.M., Jacobson, S.D., Macdonald, J.S., Labianca, R., Haller, D.G., Shepherd, L.E., Seitz, J.F., und Francini, G. (2001). A Pooled Analysis of Adjuvant Chemotherapy for Resected Colon Cancer in Elderly Patients. *N. Engl. J. Med.* 345, 1091–1097.

Schmidt, E.M., Lamprecht, S., Blaj, C., Schaaf, C., Krebs, S., Blum, H., Hermeking, H., Jung, A., Kirchner, T., und Horst, D. (2018). Targeting tumor cell plasticity by combined inhibition of NOTCH and MAPK signaling in colon cancer. *J. Exp. Med.* 215, 1693–1708.

Schmoll, H.-J., Tabernero, J., Maroun, J., de Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Hoersch, S., Rittweger, K., und Haller, D.G. (2015). Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* 33, 3733–3740.

Schwartzberg, L.S., Rivera, F., Karthaus, M., Fasola, G., Canon, J.L., Hecht, J.R., Yu, H., Oliner, K.S., und Go, W.Y. (2014). PEAK: A randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal . *J. Clin. Oncol.* 32, 2240–2247.

- Sebio, A., Kahn, M., und Lenz, H.-J. (2014). The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 611–615.
- Segditsas, S., und Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531–7537.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., Mckenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V, und Greiner, D.L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD / LtSz-scid mice . Multiple Defects in Innate and Adaptive Immunologic Function in NOD / LtSz-scid Mice. 154, 180–191.
- Siegel, R., Miller, K., und Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 7–34.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Ahnen, D.J., Meester, R.G.S., Barzi, A., und Jemal, A. (2017). Colorectal Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J Clin* 67, 177–193.
- Silva, A.L., Dawson, S.N., Arends, M.J., Guttula, K., Hall, N., Cameron, E.A., Huang, T.H.M., Brenton, J.D., Tavaré, S., Bienz, M., u. a. (2014). Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer* 14, 1–10.
- Souglakos, J., Androulakis, N., Syrigos, K., Polyzos, A., Ziras, N., Athanasiadis, A., Kakolyris, S., Tsousis, S., Kouroussis, C., Vamvakas, L., u. a. (2006). FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): A multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncolog. *Br. J. Cancer* 94, 798–805.
- Stratton, M., Campbell, P., und Futreal, P. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.
- Strosberg, J.R., Yeatman, T., Weber, J., Coppola, D., Schell, M.J., Han, G., Almhanna, K., Kim, R., Valone, T., Jump, H., u. a. (2012). A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 48, 997–1003.
- Suppiah, A., und Greenman, J. (2013). Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: Systematic review and focus on colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 4651–4670.
- Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A.L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T.E., Portnoy, D.C., Van Cutsem, E., Grothey, A., u. a. (2015). Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blin. *Lancet Oncol.* 16, 499–508.
- Takebe, N., Nguyen, D., und Yang, S.X. (2014). Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacol. Ther.* 141, 140–149.

- Tate, J.G., Bamford, S., Jubb, H.C., Sondka, Z., Beare, D.M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C.G., Creatore, C., Dawson, E., u. a. (2019). COSMIC : the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *47*, 941–947.
- Das Thakur, M., und Stuart, D.D. (2014). Molecular pathways: Response and resistance to BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E tumors. *Clin. Cancer Res.* *20*, 1074–1080.
- Tiwari, A., Saraf, S., Verma, A., Panda, P.K., und Jain, S.K. (2018). Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer : An insight. *World J. Gastroenterol.* *24*, 4428–4435.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., und Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* *65*, 87–108.
- Tournigand, C., André, T., Bonnetain, F., Chibaudel, B., Lledo, G., Hickish, T., Tabernero, J., Boni, C., Bachet, J.B., Teixeira, L., u. a. (2012). Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: Subgroup analyses of the multicenter international study of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin in the adjuvant tre. *J. Clin. Oncol.* *30*, 3353–3360.
- Twelves, C., Wong, A., Nowacki, M.P., Abt, M., Burris, H., Carrato, A., Cassidy, J., Cervantes, A., Fagerberg, J., Georgoulas, V., u. a. (2005). Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. *N. Engl. J. Med.* *352*, 2696–2704.
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., Van Der Heijden, M., Cameron, K., De Jong, J.H., Borovski, T., Tuynman, J.B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., u. a. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* *12*, 468–476.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L. a, und Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* (80-). *339*, 1546–1558.
- Wang, J., und Xia, Y. (2012). Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro. *Commun. Integr. Biol.* *5*, 319–324.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R.M., Carter, A., Casey, D.C., Charlson, F.J., Chen, A.Z., Coates, M.M., Coggeshall, M., u. a. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* *388*, 1459–1544.
- Wanghai Zhang, Hart, J., McLeod, H.L., und Wang, H.L. (2005). Differential Expression of the AP-1 Transcription Factor Family Members in Human Colorectal Epithelial and Neuroendocrine Neoplasms. *124*, 11–19.
- Weeks, J., und Catalano, P. (2012). Patients' expectations about effects of chemotherapy for advanced cancer. *N Engl J Med* *367*, 1616–1625.
- Zajęc, M., Muszalska, I., und Jelińska, A. (2016). New Molecular Targets of

Anticancer Therapy – Current Status and Perspectives. *Curr Med Chem* 23, 4176–4220.

Zhan, T., Rindtorff, N., und Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36, 1461–1473.

10. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Spartalis, C., Marina, E., Manal, S., Gerald, E., Schulz, B., Kirchner, T., und Horst, D. (2019). In vivo effects of chemotherapy on oncogenic pathways in colorectal cancer. *Cancer Science* 110, 2529-2539.

11. Danksagung

Ich habe mich im Jahr 2016 für eine experimentelle Doktorarbeit bei Prof. David Horst entschieden. Über diese Entscheidung freue ich mich bis heute ausgesprochen. Ich möchte meinen besonderen Dank Prof. David Horst aussprechen, welcher mich in jeglicher Hinsicht und zu jederzeit in vollem Ausmaß Unterstützt hat. Er ist seiner Aufgabe als Doktorvater mehr als gerecht geworden. Er war zu jeder Zeit verfügbar, brachte mir Methoden des wissenschaftlichen Arbeitens näher, sowie den richtigen Umgang mit wissenschaftlichen Daten und Ergebnissen. Darüber hinaus gewährte er mir jederzeit Freiräume und berücksichtigte meine Wünsche und Vorstellungen bei dieser Arbeit. Ich konnte durch ihn den bestmöglichen Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten finden und er ebnete mir so den Weg für eine akademische Karriere.

Auch möchte ich meinen Eltern Katharina Spartalis und Alexander Spartalis von Herzen Danken. Ich konnte in der Zeit meines Studiums und kann weiterhin auf ihre volle Unterstützung, Anerkennung und Wertschätzung zählen. Sie sind für mich immer wichtige Ansprechpartner vor allem in nicht medizinischen Belangen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Eva Marina Schmidt und Sebastian Lamprecht bedanken, welche mir insbesondere zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten, Unterstützung, Hilfe und Geduld bei neuen Methoden oder Experimenten entgegenbrachten.