

Diplomarbeit

Analyse von „K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC/L523S) beim kolorektalen Karzinom

eingereicht von
Verena Sarah Pollheimer
Mat.Nr.: 0212273

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Pathologie

unter der Anleitung von
Univ. Doz. Dr. med. Cord Langner

Graz, am.....

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am.....

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Univ.-Doz. Dr. Cord Langner für die Betreuung und Begleitung, sowie für die unterstützenden Ratschläge und die ständige Motivation bei der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön darf ich meinem Zweitbetreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med.univ Peter Kornprat für die Unterstützung und Begleitung bei dieser Diplomarbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt auch Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Peter Rehak für die Hilfestellung bei der Aufschlüsselung und Auswertung der Daten.

Mein Freund Alex hat mir während der Erstellung dieser Diplomarbeit großen Rückhalt gegeben und war stets mit Rat und Tat zur Stelle.

Besonders dankbar bin ich auch meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht und mich stets in jeder Beziehung gefördert haben. Deshalb ist diese Arbeit ihnen gewidmet, als Zeichen der großen Wertschätzung.

Graz, Juni 2009

Verena Sarah Pollheimer

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms.....	1
1.2. Formale Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	2
1.3. Molekulare Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	3
1.4. Pathologie des kolorektalen Karzinoms.....	5
1.5. Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms.....	6
1.6. Problemstellung.....	16
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Patientenkollektiv.....	19
2.1.2. Histopathologie.....	19
2.1.3. Follow-up.....	21
2.1.4. TMA-Konstruktion.....	21
2.2. Immunhistochemie.....	22
2.2.1. Färbeprotokoll.....	22
2.2.2. Auswertung der Immunhistochemie.....	23
2.3. Statistik.....	23
3. Ergebnisse.....	25
3.1.1. Pathologische Daten.....	25
3.1.2 Immunhistochemie.....	29
3.1.3. Follow-up.....	37
4. Diskussion.....	43
5. Literaturverzeichnis.....	52

Abkürzungen und deren Erklärung

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous polyposis coli
BMI	Body-Mass-Index
CAP	College of American Pathologists
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
Cis	Carcinoma in situ
CRD-BP	Coding Region instability Determinant-Binding Protein
CT	Computertomographie
DCC	Deleted in colorectal cancer
DCO	Death Certificate Only
EGF-R	Epidermal growth factor-Rezeptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HNPCC	Hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IGF-R	Insulin-like growth factor-Rezeptor
KRK	kolorektales Karzinom
KOC	K homology domain containing protein overexpressed in cancer
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting
MCC	Mutated in colorectal cancer
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
PDEGF	Platelet-derived endothelial growth factor
TGF	Transforming growth factor
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Verteilung der kolorektalen Karzinome.....	25
Abb.2: Stadienverteilung.....	26
Abb. 3: UICC-Stadienverteilung.....	26
Abb. 4: Verteilung nach dem Differenzierungsgrad.....	27
Abb.5: Histologische Re-Evaluierung.....	27
Abb.6 : Verteilung nach der Tumorgröße.....	29
Abb.7: TMA-Übersichtsbild mit 6 Gewebestanzten (Original x100).....	30
Abb.8: Mäßige KOC-Expression (Original x200).....	31
Abb.9: : Hochgradige KOC-Expression (Original x200).....	31
Abb.10: : Heterogene KOC-Expression (Original x200).....	32
Abb.11.: Schwache Färbeintensität der KOC-Immunreaktion (Original x400).....	33
Abb.12.: Mittlere Färbeintensität der KOC-Immunreaktion (Original x400).....	33
Abb.13.: Starke Färbeintensität der KOC-Immunreaktion (Original x400).....	34
Abb.14.: Lymphknoten mit KOC-positiver KRK-Metastase (Original x200).....	36
Abb. 15: Krankheitsprogression in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	38
Abb. 16: Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression	40
Abb. 17: Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression >10%.....	40
Abb. 18: Kaplan-Meier-Kurve für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression >50%.....	41
Abb. 19: Kaplan-Meier-Kurve für das krankheitsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression	41
Abb. 20: Kaplan-Meier-Kurve für das krankheitsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression >10%.....	42
Abb. 21: Kaplan-Meier-Kurve für das krankheitsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression >50%.....	42

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Zusammenfassung prognostisch bedeutsamer histopathologischer Charakteristika des kolorektalen Karzinoms	7
Tab.2: Synopse potenziell prognostisch relevanter molekularer Veränderungen.....	12
Tab.3: Korrelation der KOC-Expression mit konventionellen Tumorparametern.....	35
Tab.4: Kategorien von Prognose.....	44

Zusammenfassung

Neuerkrankungsrate und Inzidenz des kolorektalen Karzinoms (KRK) haben in den letzten 50 Jahren stark zugenommen. Das KRK stellt bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache innerhalb der europäischen Union dar. Das Tumorstaging hat beim KRK den größten Stellenwert unter den Prognosefaktoren und ist Basis für die Therapieplanung. Nicht jeder Patient eines bestimmten Tumorstadiums hat aber tatsächlich auch die gleiche Chance zu überleben. Diese Tatsache hat zu einer Vielzahl von Ansätzen geführt, weitere Prognosefaktoren zu etablieren, jeweils mit dem Ziel, einerseits eine exaktere Risikostratifizierung und individuelle Prognoseabschätzung zu ermöglichen als auch HochrisikopatientInnen zu identifizieren, die von neuartigen und maßgeschneiderteren adjuvanten Therapieansätzen profitieren könnten.

„K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC/L523S), auch bekannt als IMP3 (Insulin-like Growth Factor II mRNA-bindendes Protein 3), ist ein onkofetales RNA-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 65–70 kDa. KOC reguliert die Transkripte des Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) während der Embryogenese und wird später in einem Anteil neoplastischer Zellen in verschiedenen Tumoren neu exprimiert. Über die indirekte Hochregulation von Insulin-like growth factor II, einem potenten proliferationsfördernden Protein, kann KOC das Tumorwachstum fördern. KOC wurde zuerst bei der Analyse unterschiedlich exprimierter Genen in Pankreaskarzinomen und in normalem Pankreasgewebe identifiziert. Der Stellenwert einer Expression bei kolorektalen Karzinomen ist unklar.

Wir haben eine 5%-Zufallsstichprobe aus der Kolonkrebsdatenbank des Instituts für Pathologie der Medizinischen Universität Graz mit einer Gesamtzahl von 7909 kolorektalen Karzinomen und 7564 PatientInnen (4095 Männer, 3469 Frauen; Ratio: 1,2:1) auf verschiedene histopathologische Parameter und die immunhistochemische Expression von KOC hin untersucht. Anschließend haben wir die Daten auf mögliche Assoziationen zwischen der Expression von KOC und konventionellen histopathologischen Parametern sowie dem Überleben der betroffenen PatientInnen analysiert.

Das in der Diplomarbeit untersuchte Kollektiv umfasste insgesamt 381 Tumoren, davon präsentierten sich bei Diagnosestellung 151 (40%) PatientInnen im

UICC-Stadium III und 23 (6%) im UICC-Stadium IV. Die Immunreaktivität der Tumorzellen für KOC wurde in folgenden Kategorien eingeteilt: 0: keine Reaktivität; 1+ (1-10%), 2+ (11-25%), 3+ (26-50%), 4+ (51-75%), 5+ (76-90%), 6+ (>90%). Um die statistische Auswertung zu erleichtern, führten wir eine Stratifizierung wie folgt durch: 1: <10%, 2: 10-50%, 3: >50%. Des Weiteren gliederten wir die Intensität der Färbung in 1 (schwach), 2 (mittelstark) und 3 (stark) ein.

Eine zytoplasmatische Expression von KOC wurde bei 150 (41%) der insgesamt 370 auswertbaren Primärtumoren gefunden werden. In 73 (49%) dieser Tumoren waren mehr als 50% der Tumorzellen angefärbt. Übertragen in unser Scoring-Schema lieferte unsere Analyse eine Anzahl von 35 (23%) für den Score 1, 42 (28%) für den Score 2 und 73 (49%) Score 3.

58 (41%) der 143 Lymphknotenmetastasen zeigten eine Expression von KOC, 66 (46%) waren KOC-negativ und 19 (13%) wurden als nicht auswertbar klassifiziert. Unter den 43 Fernmetastasen zeigten 21 (49%) einer Expression von KOC, 18 (42%) waren KOC-negativ und 4 (9%) wurden als nicht auswertbar eingestuft. Eine auffallende Diskrepanz bestand zwischen dem Färbeergebnis der Tumoren und ihren zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Eine Korrelation der Expression von KOC mit klinisch-pathologischen Parametern ergab eine signifikante Assoziation ($p=0.001$) mit der Tumordifferenzierung. Des Weiteren korrelierte die KOC-Expression mit der Tumorgroße ($p=0,034$). Ein Trend bestand im Hinblick auf eine Assoziation mit dem Vorliegen einer lymphatischen Invasion ($p=0,084$).

Eine Beziehung mit dem PatientInnenüberleben, dies betrifft sowohl das progressionsfreie als auch das krankheitsspezifische Überleben, wurde nicht gefunden.

Zusammenfassend bestand in unserem Kollektiv eine statistisch signifikante Assoziation der KOC-Expression mit der Tumordifferenzierung und der Tumorgroße. Eine Beziehung zwischen der Expression von KOC und dem PatientInnenüberleben wurde nicht beobachtet.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) continues to be one of the most common malignancies worldwide. TNM stage represents the most significant prognostic factor and is used to select patients for (neo)adjuvant therapy. KOC/L523S (K homology domain containing protein overexpressed in cancer), also known as IMP3 (insulin-like growth factor II binding protein 3), is a newly identified oncofetal RNA-binding protein that is involved in cell growth and cell migration during embryogenesis. Our study aimed to analyze the immunohistochemical expression of KOC in a large sample of surgically resected colorectal adenocarcinomas and to correlate KOC expression with other histopathological findings as well as survival of affected patients.

The expression of KOC was analyzed by immunohistochemistry in 381 surgically resected CRCs and corresponding regional lymph node and/or distant metastases, if present. The proportions of tumor cells positive for KOC were scored as 0: negative, 1+ (1-10%), 2+ (11-25%), 3+ (26-50%), 4+ (51-75%), 5+ (76-90%), 6+ (>90%). Furthermore, we stratified the intensity of KOC immunoreactivity into 3 groups: 1 (weak), 2 (intermediate), 3 (strong). The expression levels were correlated with several clinicopathologic parameters and patient survival.

Cytoplasmic immunoreactivity for KOC was present in 150 (41%) of 370 evaluable cases. In detail, our analysis showed staining of <10% in 35 (23%), of 11-25% in 31 (21%), of 26-50% in 11 (7%), of 51-75% in 23 (15%), of 76-90% in 20 (13%) and of >90% in 30 (21%) cases, respectively. Among 143 corresponding lymph node metastases 58 (41%) were specifically stained, 66 (46%) were negative and 19 (13%) metastases were not evaluable. Among the 43 distant metastases 21 (49%) were specifically stained, 18 (42%) were negative and 4 (9%) metastases were not evaluable.

Marked staining difference between primary tumors and corresponding metastases was observed. The expression of KOC in primary tumors was associated with tumor differentiation ($p=0.001$) and tumor size ($p=0.034$). A trend was noted with respect to association with lymphatic invasion ($p = 0.087$). No impact on survival was noted.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt nach den aktuellsten Statistiken, in Bezug auf die westliche Welt, die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung bei Männern und Frauen dar (1). Jedes Jahr treten ca. 300 000 neue Erkrankungsfälle in Europa und den USA auf, ca. 200 000 Betroffene versterben an diesem Malignom bzw. an seinen Folgen.

Epidemiologische Studien zeigen weltweit erhebliche geographische und sozioökonomische Unterschiede in der Inzidenz. Allgemein lässt sich sagen, dass das KRK häufiger in wirtschaftlich hoch entwickelten Bevölkerungen mit einer westlichen Lebensweise, die sich besonders durch Verzehr von viel Fett und Fleisch und wenig Ballaststoffen auszeichnet, auftritt. Dementsprechend findet man die höchsten Neuerkrankungsraten in Nordamerika, Australien und Neuseeland, gefolgt vom westlichen Teil Europas. In Afrika, Asien und Lateinamerika werden hingegen die niedrigsten Erkrankungsraten gefunden. Allerdings soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass besonders in den letzten Jahrzehnten eine starke Zunahme, vor allem in Asien, bemerkt wurde (3). Über die Ursache hierfür kann noch keine klare Aussage getroffen werden. In Österreich stellt das KRK bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung hinter dem Mammakarzinom dar bzw. steht an dritter Stelle nach dem Prostata- und Lungenkarzinom bei Männern (2).

Das Lebenszeitrisko, an einem KRK zu erkranken, liegt in Mitteleuropa bei 4-6 %, das Risiko daran zu versterben beträgt 2,5-3%. Der Häufigkeitsgipfel liegt um das 65. Lebensjahr mit einem steilen Anstieg ab dem 45. Lebensjahr. 70% der Diagnosen werden im Alter zwischen 50 und 80 Jahren gestellt. In Österreich liegt der Altersgipfel bei Männern zwischen dem 65. und 74. und bei Frauen im 75. Lebensjahr und darüber (2). In Österreich verstarben 2002 2.483 Menschen an einem KRK, davon 68% an einem Kolonkarzinom und 32% an einem Rektumkarzinom. Die Letalität pro 100.000 betrug für das Kolonkarzinom bei Männern 21,7 und bei Frauen 20,2. Für das Rektumkarzinom lag die Letalitätsrate bei 11,6 bei Männern bzw. 8,3 bei Frauen (2).

Die Lokalisation des KRK in Bezug auf die einzelnen Abschnitte des Dickdarms hat sich in den letzten Jahren verändert. Eine Verlagerung auf die rechte

Seite („shift to the right“) wird besonders in den letzten Jahrzehnten beobachtet. Der Anteil der im Rektum detektierten Karzinome schwankt von 15-35%. Allerdings wird die stärkste Zunahme im Coecum und Colon ascendens beobachtet, die rechtseitigen Karzinome machen heute rund ein Viertel aller KRK aus.

Von den 70er Jahren bis in die Mitte der 80er Jahre hat sich die Lebenserwartung deutlich verbessert. Sie ist in erster Linie vom Stadium abhängig, in dem das Karzinom diagnostiziert wird, ist aber auch maßgeblich auf verbesserte Therapiemaßnahmen zurückzuführen.

1.2 Formale Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Die Ätiologie des KRK ist multifaktoriell. Der Großteil wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus exogenen Einflüssen (Umweltfaktoren, Ernährung), hierdurch verursachte Veränderungen auf genetischer Ebene und einem *per se* vorhandenem individuellen Risiko auf Grund einer genetischen Prädisposition bestimmt. Bei den genetischen Dispositionen können exogene Einflüsse das Risiko zu erkranken vervielfachen (4).

80% der KRK treten sporadisch auf, für die restlichen 20% ist eine familiäre Häufung nachzuweisen. Diese kann wiederum entweder auf eine genetische Ursache oder eine gemeinsame Exposition der Familienangehörigen in Bezug auf exogene Risikofaktoren oder beides zurückgeführt werden. Nur 5-6% aller KRK weisen eine rein genetische Ursache im Rahmen einer definierbaren hereditären Erkrankung auf, Beispiele hierfür sind: Lynch-Syndrom (hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome bzw. HNPCC-Syndrom), FAP, Li-Fraumeni-Syndrom, Cronkhite-Canada-Syndrom und Peutz-Jeghers-Syndrom.

Wichtige ernährungsspezifische Risikofaktoren für die Entwicklung eines sporadischen KRK sind fettreiche Nahrung (tierische Fette), hohe Kalorienaufnahme, N-Nitrosamine (Proteinabbauprodukte), geringer Faser- und Ballaststoffanteil. Die Rolle dieser ernährungsspezifischen Faktoren für die Entwicklung eines KRK wird in der Literatur allerdings kontroversiell diskutiert. Ein deutlicher protektiver Effekt soll mit dem häufigen Konsum von Früchten und Gemüse verbunden sein (5, 94). Es gibt auch Untersuchungen über die Schutzwirkung von Vitaminen (A, C, E) und Selen gegen Krebsradikale auf zellulärer Ebene. Wesentlich für den antikanzerogenen

Effekt dürfte dabei sein, dass die jeweiligen Inhaltsstoffe in Obst und Gemüse und nicht in isolierter Form eingenommen werden, da sich die protektiven Stoffe möglicherweise in dieser Form ergänzen und ihre Wirkung verstärken. (6) Eine Studie hat gezeigt, dass eine ballaststoffreiche Ernährung das KRK-Risiko um ca. 40% senken kann (94). Weitere Risikofaktoren stellen CED, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sowie Vorerkrankungen, wie ein stattgehabtes KRK, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Uteruskarzinom dar. Zu den genetischen Risikofaktoren zählen eine positive Familienanamnese, Syndrome mit präexistierender Polyposis (FAP, Turcot Syndrom), Syndrome mit hamatomatösen Polypen (Peutz-Jeghers-Syndrom, Juvenile Polyposis) und Syndrome ohne präexistierender Polyposis (Lynch-Syndrom). Zu den sonstigen prädisponierenden Faktoren gehören: Alter, Nikotinabusus, hoher Alkoholkonsum, Hypergastrinämie.

Unbestritten nimmt die Dysplasie (intraepitheliale Neoplasie) eine Schlüsselrolle im Übergang von kolorektalen Adenomen in Karzinome ein. Die Dysplasie stellt aus histologischer Sicht eine Neoplasie mit zellulärer Atypie, abweichender Differenzierung und gestörter epithelialer Architektur, jedoch ohne invasives Wachstum dar, entsprechend einer präkanzerösen Läsion (6). Heute geht man davon aus, dass sich praktisch alle KRK auf dem Boden eines Adenoms entwickeln. Das heißt, die Pathogenese des sporadischen KRKs ist durch eine histologisch und makroskopisch nachweisbare stufenweise Progression (Adenom-Karzinom-Sequenz) charakterisiert, welche mit spezifischen molekularen Veränderungen (Multistep-Karzinogenese) einhergeht (13).

Das Entartungsrisiko der Adenome ist von mehreren Faktoren, wie Adenomgröße, histologischem Differenzierungsgrad und Wuchsform abhängig. Villöse Adenome zeigen das größte Entartungspotential, gefolgt von tubulovillösen und tubulären Adenomen (7).

1.3 Molekulare Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms

Nach heutigem Kenntnisstand sind unterschiedliche molekulare Mechanismen der Karzinogenese an der Entstehung des KRK beteiligt. Rund 80-90% der KRK beruhen auf dem sog. *Tumorsuppressor-Pathway* (8, 36, 37, 38), der durch sequentielle

genetische Mutationen und Alterationen sowie „loss of heterozygosity“ (LOH) charakterisiert ist. Fearon und Vogelstein haben dies als erste an einem Modell der molekularen neoplastischen Transformation bei der FAP beschrieben (39). Verschiedene Tumorsuppressorgene, wie adenomatous polyposis coli (APC), mutated in colorectal cancer (MCC), deleted in colorectal cancer (DCC) und p53, sowie Protoonkogene, wie K-ras nehmen eine Schlüsselposition ein (8).

Der sog. *Mutator-Pathway* beruht hingegen auf autosomal dominant vererbten Keimbahnmutationen, die zur Inaktivierung spezifischer DNA-Reparaturenzyme führen, so dass Fehler bei der DNA-Replikation nicht mehr korrigiert werden können. Zum diagnostischen Nachweis dienen Längenpolymorphismen im Bereich einfacher repetitiver DNA-Sequenzen, der sog. Mikrosatelliten. Diese Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist charakteristisch für das Lynch-Syndrom (38, 40). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass KRK bei Lynch-Syndrom-PatientInnen trotz der oftmals schlechteren histologischen Differenzierung eine bessere Prognose als sporadische Karzinome aufweisen (41,42). Eine hochgradige MSI (MSI-H) liegt definitionsgemäß dann vor, wenn zwei oder mehr der konsensugemäß untersuchten fünf Genloci betroffen sind, während eine geringgradige MSI (MSI-L) bei Beeinträchtigung eines Locus zu diagnostizieren ist (8).

Allerdings ist auch bei rund 10-20% der sporadischen KRK eine MSI-H nachweisbar. Sporadische KRK mit MSI weisen teilweise klinische, morphologische und molekulare Gemeinsamkeiten mit Tumoren bei Lynch-Syndrom auf. Sie sind häufiger proximal der linken Flexur lokalisiert und muzinös differenziert. Charakteristisch sind vor allem auch solid-medulläre Wachstumsformen, die eine bessere Prognose (43, 44) sowie eine starke intratumorale lymphozytäre Infiltration (45) aufweisen. In Abhängigkeit vom Mikrosatellitenstatus ergeben sich offenbar auch bei sporadischen KRK unterschiedliche Lebenserwartungen. Die Mehrzahl der Untersuchungen mit Rekrutierung großer Patientenkollektive belegte, dass Patienten mit MSI-H Tumoren eine signifikant bessere Prognose haben als solche mit mikrosatellitenstabilen (MSS) Tumoren (44, 46).

Im Rahmen der Progression des KRK kommt es nach heutigem Kenntnisstand zu Veränderungen an 4 verschiedenen Signalwegen, die von entscheidender tumorbiologischer Bedeutung sind: dem wnt/Wingless-Pathway, dem K-ras-Pathway, dem Transforming-growth-factor-(TGF-) β -Pathway und dem p53-Pathway (8, 37). Zu einem frühen Zeitpunkt in der Karzinogenese treten Alterationen besonders des wnt/

Wingless- und des K-ras-Pathways auf und werden charakteristischerweise durch Mutationen im APC- bzw. K-ras-Gen verursacht (8). Auf der anderen Seite können mikrosatelliteninstabile Tumoren den wnt/Wingless-Pathway durch β -Catenin stabilisierende Mutationen konstitutiv aktivieren. Veränderungen des TGF β -Rezeptors Typ II beobachtet man bei mikrosatelliteninstabilen Adenomen in enger Korrelation mit der malignen Transformation zu Karzinomen (8, 47). Bei MSI-H Karzinomen wurden zudem häufige Mutationen im TGF β -Rezeptor Typ II, bax und insulin-like growth factor II receptor- (IGF-II-Rezeptor)-Gen gefunden (48).

Der sog. *Methylierungs-Pathway* wurde für sporadische MSI-H-Karzinome vorgeschlagen, weil diese häufig eine Hypermethylierung bestimmter Genpromotoren (z.B. von p16, hMLH1) aufweisen (49). Nun ergeben sich aus der unterschiedlichen molekularen Pathogenese abweichende genetische Alterationen. In einer großen Studie wurde festgestellt, dass MSI-H Karzinome einen Verlust in p53, eine geringere Proliferation sowie Präsenz von bcl-2 und p21 aufweisen; p27 wird offenbar unabhängig vom Mikrosatellitenstatus exprimiert. (8, 50) Dies wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert, denn es ist auch schon eine p53-Überexpression (51) in MSI-H Karzinomen beschrieben worden. Gerade wegen solcher Ergebnisse ist es von großer Bedeutung, dass künftige Untersuchungen immunhistochemisch nachweisbare Markerproteine und molekulare Alterationen als Prognosefaktoren abklären. Dadurch können Einblicke darüber gewonnen werden, ob bestimmte Prädiktoren abhängig oder unabhängig vom Karzinogenese-Pathway sowie tumorbiologisch und prognostisch bedeutsam sind.

Neben diesen relativ gut erforschten Wegen der Karzinogenese werden aktuell noch weitere Entstehungswege des KRK im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und bei der Entstehung von KRK aus hyperplastischen Polypen über den Zwischenschritt sessiler serratierter Adenome (SSA) diskutiert („serrated route to cancer“).

1.4 Pathologie des kolorektalen Karzinoms

Die WHO trifft folgende Einteilung für die histologische Klassifikation des KRK: Adenokarzinom, muzinöses Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, adenosquamöses Karzinom, kleinzelliges Karzinom und undifferenziertes Karzinom (127). Die häufigsten KRK (90%) sind klassische Adenokarzinome und

diese weisen meist eine tubuläre Differenzierung auf. In rund 10 % der Fälle kommen muzinöse Karzinome vor, die durch die Produktion von Muzin (Schleim) durch die Tumorzellen charakterisiert und dadurch definiert sind, dass mehr als 50 % der Tumorfläche aus Muzin besteht. Mit nur 1 % sind Siegelringzellkarzinome nur für einen kleinen Teil der KRK verantwortlich. Sie bestehen aus isolierten Tumorzellen, die intrazytoplasmatisches Muzin enthalten und definitionsgemäß die Hauptkomponente (mehr als 50% der Fläche) des Tumors ausmachen.

KRK können unterschiedliche makroskopische Wuchsformen zeigen, die häufigsten sind: ulzeriert, ringförmig, polypoid und stenosierend. In der Makroskopie erscheinen sie in der Regel als gut abgrenzbare Tumoren mit einem aufgeworfenen Randsaum. Häufig korreliert das Wachstumsverhalten mit den klinischen Symptomen, wie tumorbedingten Blutungen oder prästenotischer Dilatation mit Subileus- und Ileussympomen (7).

1.5 Prognosefaktoren des kolorektalen Karzinoms

Ein Prognosemarker ist eine Variable, die prospektive Information über den Krankheitsverlauf geben kann und dadurch eine therapeutische Entscheidungsfindung ermöglicht.

Es existiert eine große Anzahl an histopathologischen Prognosefaktoren für das KRK in der gängigen Literatur (15). Obwohl das pathologische Tumorstadium (TNM-Stadium) der stärkste prognostische Faktor ist (vergleiche unten), weisen noch eine Reihe weiterer pathologischer Merkmale eine unabhängige prognostische Signifikanz auf (9). Als solche weiteren ungünstige Prädiktoren gelten: Invasion lymphatischer und venöser Gefäße, perineurale Infiltration, schlechte Differenzierung sowie eine unvollständige Tumorsektion mit positiven Resektaträndern (8). Ein signifikant besseres Überleben ist hingegen mit einer lymphozytären Infiltration des Tumors bzw. des peritumorösen Gewebes verbunden (10). Eine Zusammenstellung zeigt Tabelle 1.

Zusammenfassung prognostisch bedeutsamer histopathologischer Charakteristika des kolorektalen Karzinoms:
<ul style="list-style-type: none"> • Pathologisches Tumorstadium (TNM der UICC) • Lokale Ausbreitung (pT) • Regionale Lymphknotenmetastasen (pN) • Fernmetastasen (pM) • Differenzierungsgrad (G) • Invasion lymphatischer Gefäße (L1) • Invasion venöser Gefäße (V1) • Perineurale Invasion • Tumorzell dissoziation („Budding“) im Bereich der Invasionsfront • Lymphozytäre (peri)tumoröse Infiltration • Vollständigkeit der Tumorresektion (R-Status)

Tab. 1

TNM-Klassifikation

Das pathologische Tumorstadium („Staging“) ist nach wie vor der entscheidende Prädiktor für die Prognose des KRK und der Goldstandard für die Evaluation anderer Prognosemarker. Das pathologische Staging gilt als der stärkste prognostische Einzelfaktor und ist in vielen Fällen ausschlaggebend für die adjuvante Therapieentscheidung (11).

Die Bezeichnung „T“ bezieht sich auf die lokale Ausbreitung des Primärtumors, „N“ auf die regionale Lymphknotenmetastasierung und „M“ auf die hämatogene Fernmetastasierung. Die Ausbreitung des Tumors vor der Primärtherapie (TNM-Klassifikation) muss von derjenigen nach der Primärtherapie (Residualtumor-R-Klassifikation) unterschieden werden, da der weitere Krankheitsverlauf und das therapeutische Vorgehen entscheidend vom Residualtumor abhängen. Patienten mit makroskopisch nachweisbarem Resttumor (R2) haben eine kürzere mediane Überlebenszeit als solche mit lediglich mikroskopisch detektierbarem residualem Karzinomgewebe im Sinne einer R1-Resektion (8).

Eine der wichtigsten Punkte in der Stadieneinteilung des KRK stellt die exakte Analyse von regionalen Lymphknotenmetastasen dar. Obwohl spezielle Techniken, wie immunhistochemische Färbungen, die Detektion von isolierten Tumorzellen in

regionalen Lymphknoten durchaus erleichtern können, empfehlen die zuständigen Fachgesellschaften (AJCC, UICC und CAP) die H&E-Färbung für die standardmäßige Evaluierung des N-Status (12).

Blut- und Lymphgefäßinvasion

Ein wesentlicher Schritt in der metastatischen Kaskade stellt die Invasion von Blut- und Lymphgefäßen dar. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Nachweis einer Blut- oder Lymphgefäßinvasion einen etablierten prognostischen Parameter beim KRK darstellt. Die venöse Invasion erweist sich als Stadiums-unabhängiger Prognostikator in der uni- (18) und multivariaten (16,17) Analyse. Die Studienergebnisse bezüglich lymphatischer und venöser Infiltration sind jedoch keineswegs eindeutig zu interpretieren. Es gibt auch zahlreiche Arbeiten, die die prognostische Bedeutung einer Blutgefäßinvasion nur in Univariatanalysen zeigen (19,20). Ähnliche Ergebnisse existieren für die lymphatische Invasion (20). In einigen Untersuchungen wurde nicht zwischen Blut- und Lymphgefäßinvasion unterschieden und die allgemeine Aussage einer Gefäßinvasion erschien als signifikant.

Die unterschiedlichen Ergebnisse erklären sich möglicherweise daraus, dass der definitive histopathologische Nachweis einer Gefäßinvasionen schwierig sein kann. Das Auftreten von Tumor-induzierter Fibrose und Fixationsartefakten (Schrumpfungsspalten) um die Tumorzellnester herum kann eine Identifizierung am HE-Schnitt sehr schwierig machen und führt zu einer hohen Interobserver-Variabilität. Spezielle Techniken, wie immunhistochemischen Färbungen des Endothels bzw. der elastischen Anteile von Gefäßwänden, können eine Identifikation der Gefäße erleichtern. Sie sind jedoch sehr laborintensiv, zeitaufwendig und teuer und finden aus diesem Grund keine routinemäßige Anwendung (21). Für die histopathologische Evaluierung einer Gefäßinvasion existieren derzeit keine weltweit akzeptierten oder verbreiteten Standards oder Richtlinien. Ausgehend von der AJCC/UICC Konvention beeinflusst das Vorhandensein von Tumorzellen innerhalb von Lymphgefäßen oder Venen im Primärtumor nicht die pT-Klassifikation (21). Allerdings müssen lymphatische oder venöse Invasionen im histopathologischen Befund als solche dokumentiert werden und auch ihre Abwesenheit sollte stets vermerkt werden (21).

Tumordifferenzierung

Die Literaturdaten hinsichtlich des Differenzierungsgrades lassen die grundsätzlichen Probleme bei der Anwendung abweichender Graduierungsschemata erkennen. Hinzu kommen die Subjektivität der Graduierung und damit die hohe Interobserver-Variabilität (23). Obwohl schon eine große Anzahl an Gradingssystemen in der Literatur vorgeschlagen wurde, gibt es noch immer kein weit verbreitetes Standardverfahren zur Festlegung des Differenzierungsgrades des KRK. In einigen Systemen wird der Differenzierungsgrad auf der Basis einer einzigen mikroskopischen Merkmale bestimmt, in anderen Systemen hingegen wird ein großes Spektrum von histologischen Merkmalen für die Beurteilung des Differenzierungsgrades herangezogen (22).

Die WHO-Richtlinie für die Graduierung kolorektaler Karzinome basiert auf dem prozentuellen Anteil von Drüsenformationen (127). Dementsprechend werden Tumoren in die folgenden vier Differenzierungsgrade unterteilt

- Grad 1: Gut differenziert (>95% glanduläre Differenzierung)
- Grad 2: Mittel differenziert (50-95% glanduläre Differenzierung)
- Grad 3: Schlecht differenziert (5-50% glanduläre Differenzierung)
- Grad 4: Undifferenziert (<5% glanduläre Differenzierung)

Die Subjektivität der Bestimmung des Tumorgrades kann in einigen Fällen auch auf einen heterogenen Aufbau des Tumors an sich zurückzuführen sein. Eine ausgeprägte Heterogenität innerhalb eines Tumors kann das Grading sehr schwierig machen, jedoch sollte in diesem Fall immer der am schlechtesten differenzierte Teil für die Graduierung ausschlaggebend sein. Die unmittelbare Invasionsfront, jedoch, darf nicht bewertet werden.

Ungeachtet der hohen Subjektivität der Graduierung hat sich in Studien gezeigt, dass der Differenzierungsgrad einen unabhängigen prognostischen Faktor in der multivariaten Analyse darstellt (17, 24, 25). Es wurde im Speziellen bewiesen, dass ein niedrigerer Differenzierungsgrad mit schlechter Prognose assoziiert ist (11).

Tumorzelldissoziation („Tumor Budding“)

Beim Tumor Budding handelt es sich um mikroskopische Cluster aus Karzinomstrukturen in Einzelformationen oder Anhäufungen von bis zu vier undifferenzierten Tumorzellen an der Invasionsfront des Tumors (11).

Es wurde mehrfach gezeigt, dass das Wachstum eines Tumors an der Invasionsfront und die damit häufig verbundene Tumorzelldissoziation eine vom Stadium unabhängige prognostische Signifikanz hat (9). Einige Studien weisen darauf hin, dass diese Tumorzelldissoziation eine stärkere prognostische Bedeutung als der Differenzierungsgrad hat (22, 26, 27). Ein hochgradiges Tumor Budding ist ein unabhängiger Risikofaktor für lokale Rezidivneigung, Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie und schlechte Prognose nach kurativer Operation (28-30).

Interessanterweise wird die Abwesenheit von Tumor Budding in einigen Untersuchungen mit dem Auftreten von intratumoralen Lymphozyten (sog. TILs) und peritumoralen Lymphozyten assoziiert, welche auf immunologischer Ebene möglicherweise zu einer Zerstörung der Budds führen können und so die Prognose verbessern (31).

Tumorkonfiguration an der Invasionsfront

Dieses morphologische Merkmal scheint ein Stadiums-unabhängiger prognostischer Parameter beim KRK zu sein und durch ihn kann möglicherweise eine Vorhersage über die Entwicklung von Lebermetastasen getroffen werden (27, 32). Grundsätzlich kann man ein infiltratives von einem expansiven Wachstumsmuster unterscheiden. Jass et al. (28) haben festgestellt, dass bei der Analyse der Tumorkonfiguration eine hohe Interobserver-Variabilität existiert, wenn keine spezifischen Definitionen oder Richtlinien vorhanden sind. Compton (11) hat 2003 diagnostische Kriterien für eine infiltrative Tumorkonfiguration aufgestellt. Diese sollen eine einheitlichere Diagnosestellung ermöglichen und zu einer geringeren Interobserver-Variabilität führen. Ein signifikantes Kriterium, das auf ein infiltratives Wachstum hindeutet, ist die perineurale Invasion. Dieses pathologische Merkmal wird nicht routinemäßig erhoben oder spezifisch angegeben, es wurde jedoch in mehreren Studien eine prognostische Signifikanz festgestellt (11). Es hat sich gezeigt, dass Tumoren, welche alle Kriterien für ein infiltratives Wachstumsmuster erfüllen, eine schlechtere Prognose aufweisen als Tumoren mit verdrängendem Charakter (32).

Lymphozytäre Reaktion im Tumor

Die lymphozytäre Infiltration des Tumors oder des peritumoralen Gewebes entspricht einer immunologischen Antwort des Wirt-Gewebes auf ein invasiv wachsendes Malignom, und in mehreren Studien wurde seine prognostische Bedeutung bewiesen (11, 33, 34). Andererseits ist die Datenlage nicht so eindeutig, es gibt auch Untersuchungen, die keine prognostische Signifikanz aufzeigen oder nur in der univariaten Analyse. Darüber hinaus sind diese Untersuchungen schwer zu vergleichen, da unterschiedliche histologische Kriterien für die qualitative und quantitative Evaluation des Infiltrates Verwendung fanden. Insofern sind weitere klinische Studien unter Anwendung standardisierter Methoden notwendig, um diesen vielleicht viel versprechenden prognostischen Parameter noch weiter zu untersuchen.

Es gibt jedoch weitgehende Einigung darüber, dass eine große Anzahl an Tumor infiltrierender Lymphozyten (sog. TILs) mit MSI-H Status assoziiert ist (11). Tatsächlich sind viele TILs ein diagnostisches Merkmal von medullären Karzinomen, diese können aber auch in anderen histologischen Typen von MSI-H Tumoren gefunden werden. Es wird empfohlen TILs von peritumorale lymphozytäre Infiltration zu unterscheiden und eine moderate bis hohe Anzahl an TILs (entspricht 4 pro high-power field) anzugeben (33).

Molekulare Prognosefaktoren

In den vergangenen Jahren sind zahlreiche molekularbiologische Parameter, die bestimmte Eigenschaften der Tumorbilogie abbilden, beim KRK entdeckt worden. Bis dato haben diese molekularen Veränderungen noch keinen Eingang in den klinischen Alltag gefunden. Es ist aber zu erwarten, dass einige der gegenwärtig diskutierten Biomarker zukünftig Bedeutung in der klinischen Betreuung von KRK-PatientInnen gewinnen werden.

Die wichtigsten molekularen Veränderungen können hier nur exemplarisch aufgezeigt und nicht im Detail besprochen werden. Eine Zusammenstellung der potenziell prognostisch bedeutsamen molekularen Veränderungen zeigt Tabelle 2.

Synopse potenziell prognostisch bedeutsamer molekularer Veränderungen		
Onkogene	K-ras	
	Her-2/neu	
	EGFR	
	c-myc	
	IGF-I/IGF-II	
Tumorsuppressorgene	„K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC)	
	Adenomatous polyposis coli (APC)	
	Deleted in colorectal cancer (DCC)	
	Zellzyklusregulatoren Zyklin D1	
	Zyklin E	
	Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs)	
	p16	
	p21 (WAF1/CIP1)	
	p27	
	p53	
	Retinoblastom-Protein (RB)	
	Proliferation/Apoptose	Proliferations- und Apoptose-Indizes
		bcl-2
Bax		
Zelladhäsion/Invasion	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator	
	Cathepsin D	
	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	
	CD44	
	E-Cadherin	
	β-Catenin	
Angiogenese	Muzin-Core-Proteine	
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	
	Platelet-derived endothelial growth factor (PDGF)	

Tab. 2

Onkogene

K-ras

Neben Alterationen des p53 zählen K-ras-Mutationen zu den häufigsten und am besten untersuchten genetischen Veränderungen in malignen Tumoren (8). Im KRK gelten sie in den meisten Studien als unabhängige Parameter für eine schlechte Prognose (46). Eine Metaanalyse der Daten von 22 Arbeitsgruppen bestätigte dieses Ergebnis an insgesamt 2721 PatientInnen (52). Die Mutationen traten unabhängig vom Geschlecht, Alter, Tumorlokalisierung oder Tumorstadium auf. In

Multivariatanalysen korrelierte eine K-ras-Mutation mit jeweils signifikant höherem Rezidiv- und Todesrisiko (8, 52).

her-2/neu (c-erbB2) und epidermal growth factor receptor (EGFR)

Insbesondere aufgrund der therapeutischen Konsequenzen ist das auf dem Chromosom 17q lokalisierte her-2/neu-Onkogen in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Der epidermal growth factor receptor (EGFR) ist dem vom her-2/neu-Gen kodierten transmembranösen Protein mit Tyrosin-Kinase-Aktivität homolog. Als Rezeptor des epidermal growth factors (EGF) ist EGFR für die Signaltransduktion ausschlaggebend. Die Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung im KRK sind kontrovers: Einige Studien fanden signifikante Korrelationen zwischen EGFR-Protein- oder mRNA-Expression und Tumorstadium (Dukes-Klassifikation), Differenzierung und Prognose, während dies von anderen nicht bestätigt werden konnte (53).

c-myc

Das c-myc-Onkogen stellt ein Zielgen im Rahmen des wnt-Signalwegs dar, dessen Amplifikation in kolorektalen Tumorzelllinien gezeigt werden konnte (8, 54). In Hinblick auf die prognostische Bedeutung von c-myc ergab sowohl der Nachweis des Transkripts als auch des Proteins ein widersprüchliches Ergebnis (15). Weitere Studien mit größeren PatientInnenkollektiven sind nötig, um eine mögliche unabhängige prognostische Relevanz dieses Onkogens beim KRK zu belegen.

IGF-I und IGF-II

Das Insulin-like growth factor (IGF)-System spielt eine bedeutende Rolle im epithelialen Wachstum, in der Apoptoseregulation sowie auch in der Tumor-entstehung (72-74, 83, 88). Das IGF-System umfasst Insulin-like growth factor I (IGF-I) und Insulin-like growth factor II (IGF-II), deren dazu gehörige Rezeptoren IGF-IR und IGF-IIR, die 6 Bindungsproteine (IGFBP-1 bis IGFBP-6) und die große Gruppe von IGFBP-Proteasen (75). Sowohl IGF-I und IGF-II sind essentiell für ein normales Wachstum und eine physiologische Entwicklung (89, 90). Die Mehrheit an IGFs wird in der Leber produziert, daneben ist aber auch eine Vielzahl an Organen zur lokalen Synthese dieser Peptide befähigt (90). Mehr als 90% der IGFs werden an IGFBP-3 gebunden (84, 91) und nur rund 1% zirkuliert in freier, ungebundener Form. Allen

IGFBPs ist gemeinsam, dass sie die IGF-Aktionen inhibieren und so die Verteilung der IGFs über eine hochaffine Bindung kontrollieren (sie ist 2 - 50mal stärker als die Affinität des IGF-IR). Wie bereits erwähnt, können die IGFBPs von verschiedenen Proteasen degradiert werden. Diese Proteasen spalten die IGFBPs in Fragmente, welche dann eine geringe Affinität zu den IGFs aufweisen (94, 100). Die biologische Aktivität von IGF ist nun abhängig von den Interaktionen zwischen zirkulierendem IGF-I und IGFBP und von der lokalen Produktion von IGF, IGFBP und IGFBP-Proteasen (92).

IGF-I und IGF-II binden und aktivieren IGF-IR, dieser Prozess induziert zelluläre Proliferation und Wachstum (96, 98). Getriggert durch die Bindung von IGF-I oder IGF-II wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang getrieben, welche wiederum durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in eine gesteigerte Zellproliferation (bei gleichzeitiger Verminderung der Apoptose) und Transformation mündet (71, 74, 85, 86). Die wachstumsfördernden Effekte von IGF-I und IGF-II auf Malignomzellen werden durch den IGF-I-Rezeptor vermittelt, welcher einer Tyrosinkinase entspricht. Es ist allgemein bekannt, dass Karzinomzellen, die eine starke Tendenz zur Metastasierung aufweisen, durch eine höhere Expression von IGF-IR gekennzeichnet sind (82, 88, 109). Der IGF-II-Rezeptor ist ähnlich dem Mannose-6-Phosphate-Rezeptor (107). Er unterscheidet sich durch seine fehlende Tyrosinkinase-Aktivität vom IGF-IR. Eine Überexpression von IGF-IR wird bei vielen Malignomen beobachtet und wurde bereits in einigen Studien auch innerhalb des KRK beschrieben (76-79, 87, 88, 97, 108). Eine Studie von Barozzi et al. schlug IGF-II als einen der relevantesten biologischen Marker beim KRK vor (81). Laut ihren Untersuchungen ist eine hohe Expression von IGF-II ein prädiktiver Faktor für Lebermetastasen (80, 81).

Darüber hinaus könnten IGF-I und IGF-II in Zukunft besondere Bedeutung als prädiktive therapeutische Zielmoleküle für neuartige Therapiemaßnahmen (mit sog. „Biologicals“) dienen (102).

Tumorsuppressorgene

Adenomatous polyposis coli (APC)

Die familiäre adenomatöse Polypose ist charakterisiert durch das Auftreten von Keimbahnmutationen des APC-Gens; jedoch sind auch in ca. 80% der sporadischen KRK somatische APC-Mutationen detektierbar (8). Die Funktionen des vom APC-

Gen kodierten Proteins sind unter anderem Signaltransduktion über den wnt-Signalwegs, Vermittlung interzellulärer Adhäsionsphänomene und Stabilisierung des Zytoskelett (55). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass chromosomale Allelverluste im Bereich des APC-Locus (Chromosom 5q) keine prognostische Relevanz haben (46). Dies scheint auch nicht weiter verwunderlich, da Alterationen des APC-Gens als initiales Ereignis des Tumorsuppressor-Pathways angesehen werden (8). Dementsprechend ist eine prognostische Relevanz weniger für APC selbst zu erwarten als für andere, erst später im Verlauf der Tumorprogression alterierte Tumorsuppressorgene.

Deleted in Colorectal Cancer (DCC)

Mehrfach wurden Allelverluste im Bereich des Chromosoms 18q als Marker einer schlechteren Prognose des KRK gewertet (15, 46). Darüber hinaus fand sich eine signifikante Assoziation zwischen 18q-Allelverlust und p53-Überexpression, wobei sich nur Ersterer in der uni- und multivariaten Analyse als prognostisch bedeutsam erwies (56). Shibata et al. zeigten, dass eine DCC-Proteinexpression ein signifikant positiver Prädiktor eines längeren Überlebens für Tumoren im Stadium II und III war (57).

p53

Besonders in den letzten 10 Jahren fokussierten zahlreiche Forschungsgruppen ihr Interesse auf das auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisierte p53-Gen. Zahlreiche immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen, die die Bedeutung des p53-Gens für die Prognose des KRKs an über 3 000 PatientInnen evaluierten, ergaben eine zu gleichen Teilen entweder eine schlechtere Überlebensrate der p53-positiven Fälle oder keine Assoziation zwischen p53-Überexpression und Prognose (8, 15). Einige Studien ließen eine größere prognostische Signifikanz erkennen, wenn zusätzlich zu p53-Alterationen auch bcl-2-Veränderungen in denselben PatientInnen detektierbar waren. Eine simultane p53-Überexpression und bcl-2-Negativität war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (58-60). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass der immunhistochemische Nachweis von p53 durch eine längere Halbwertszeit infolge Mutation bedingt ist. Der Nachweis von p53 am Gewebeschnitt gilt aber nicht als Beweis für das Vorliegen einer Mutation (110).

Eine in Amerika durchgeführte Untersuchung an fast 1500 PatientInnen zeigte ein signifikant häufigeres Auftreten von p53-Mutationen in Tumoren des distalen Kolons, in höheren Tumorstadien sowie in Karzinomen ohne MSI und K-ras-Mutation. Die univariate Analyse ergab für PatientInnen mit p53-Mutation zwar eine schlechtere Prognose, die multivariaten Analyse aber bestätigte eine unabhängige prognostische Relevanz jedoch nur für G245-hot-spot-Mutationen und für Mutationen in Tumoren des proximalen Kolons (61). Alles in allem ist auf Grund der kontroversen Datenlage davon auszugehen, dass die Bestimmung von p53-Alterationen allein keine signifikante Assoziation mit dem Krankheitsverlauf aufweist. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass eine p53-Bestimmung in Kombination mit weiteren molekularen Parametern eine prognostische Bedeutung haben könnte (8).

1.6 Problemstellung

Das auf dem Chromosom 7q11.5 lokalisierte „K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC), auch bekannt als L523S oder IMP-3, ist ein Mitglied der RNA-Bindungsprotein-Familie. Es wurde erstmals 1996 in pankreatischen Karzinomen identifiziert (62) und 1997 kloniert (63).

Die Mitglieder der RNA-Bindungsfamilie sind IMP1, IMP2 und IMP3 (IGF-II mRNA binding proteins 1, 2, 3). CRD-BP (Coding Region instability Determinant-Binding Protein) und KOC sind identisch mit IMP1 und IMP3 und p62 stellt eine Splice-Variante von IMP2 dar (64). Für alle von diesen Proteinen wurde nachgewiesen, dass sie an vielen verschiedenen Stellen eines fetalen Subtyps der IGF-II mRNA, auch bekannt als „leader 3 mRNA“, binden können. Darüber hinaus spielen sie eine entscheidende Rolle in der RNA-Wanderung und Stabilisation, DNA-Bindung und Transkription, Zellwachstum und Zellmigration. Die Mitglieder der RNA-Bindungsfamilie weisen distinkte strukturelle Charakteristika auf: Alle beinhalten eine sequenzielle RNA-Bindungsregion, ein RNA-Erkennungs-Motiv in der N-terminalen Region und 4 hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) K homology (KH) Domänen in der C-terminalen Region des Proteins (64, 67). Die IMPs sind über viele Spezies weit verbreitet, werden während der Embryogenese so gut wie in allen Geweben exprimiert. In reifen Organen ist die Expression allerdings größtenteils auf die Plazenta, die Gonaden und die intestinale Mukosa beschränkt (64).

Seit seiner Entdeckung 1996 wurde die Rolle von KOC in der Karzinogenese intensiv in vitro und vivo untersucht (62-65,67). Die zelluläre Wirkung von KOC ist folgende: KOC bindet an die Transkripte des IGF-II-Rezeptors und reguliert auf diesem Weg die IGF-Signaltransduktionskaskade. Weiterhin heftet sich KOC/L523S an die IGF-II binding protein mRNA und führt dadurch mittelbar zu erhöhter Zellproliferation auf dem Boden einer ungehemmten IGF-II-Wirkung.

Unter physiologischen Bedingungen wird KOC während der Embryogenese so gut wie in allen Gewebetypen exprimiert und ist entscheidend am zellulären Wachstum beteiligt. Die KOC-Expression kann in unterschiedlichem Ausmaß in verschiedenen Organen gefunden werden, zum Beispiel in der Plazenta, den Gonaden und der intestinalen Mukosa. In zahlreichen Malignomen, wie zum Beispiel der Lunge, des Magens, der Gallenblase, der Haut, der Ovarien und in Weichteilsarkomen beobachtet man eine KOC mRNA-Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe (62, 63, 66).

Eine Untersuchung von Rochelle et al. hat gezeigt, dass eine hohe immunhistochemische KOC-Expression in extrapulmonalen kleinzelligen Karzinomen, unabhängig von der anatomischen Lokalisation, gefunden werden kann (68). Es ließ sich aber keine Expression in hoch differenzierten neuroendokrinen Tumoren (Karzinoiden) des Gastrointestinaltrakts detektieren. In Analogie dazu wurde eine hochgradige KOC-Expression in kleinzelligen Lungenkarzinomen (90%) und großzelligen neuroendokrinen Karzinomen berichtet, aber keine Positivität in typischen und atypischen Karzinoiden der Lunge mit Ausnahme von einem atypischen Karzinoidtumor, der eine schwache Anfärbkeit in onkozytischen Tumorzellen aufwies, nachgewiesen (70). Obwohl sich die verschiedenen Typen pulmonaler und extrapulmonaler neuroendokriner Tumoren, ungeachtet ihres anatomischen Ursprungs, viele gemeinsame neuroendokrine Merkmale teilen, unterscheiden sie sich doch bedeutend bezogen auf ihre zytogenetischen und molekularen Charakteristika und Mechanismen, was eine fundamentale molekulare Divergenz innerhalb dieser Tumoren anzeigt. Zytogenetische Studien haben gezeigt, dass sich besonders die chromosomalen Alterationen unter diesen Tumoren dramatisch von einander unterscheiden (70).

Die geschilderten Beobachtungen an neuroendokrinen Tumoren / Karzinomen legen nahe, dass KOC ein wichtiges Molekül, vielleicht sogar ein Schlüsselmolekül, in der Regulation des biologischen Verhaltens von Karzinomen mit neuroendokriner

Differenzierung darstellt. Das Spektrum neuroendokriner Tumordifferenzierung bei Karzinomen des Gastrointestinaltrakts umfasst neben den kleinzelligen Karzinomen auch großzellige neuroendokrine Karzinome; darüber hinaus können auch in der konventionellen Lichtmikroskopie „gewöhnliche“ Adenokarzinome eine Expression neuroendokriner Marker zeigen (111).

Beim KRK ist die immunhistochemische Expression von KOC bislang nicht systematisch untersucht worden. Die Daten von anderen Malignomen sind aber viel sprechend, dass sich KOC auch als ein neuer unabhängiger Prognosefaktor beim KRK bewähren könnte. Die Bestimmung von KOC beim KRK, einschließlich der Korrelation mit konventionellen Tumorparametern und der Prognose betroffener PatientInnen, erscheint uns als vielversprechender Ansatz, zum Beispiel in Hinblick auf die mögliche Selektionierung von PatientInnen für eine adjuvante Therapie. Weiterhin stellt KOC selbst, da es laut Literatur bei anderen Karzinomen mit der Tumorprogression hoch reguliert wird, ein mögliches Therapieziel („Target“) dar.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Am Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz wurde für den Zeitraum vom 01.01.1984 bis 31.12.2005 eine Datenbank sämtlicher Kolon- und Rektumkarzinome mit einer Gesamtzahl von 7909 KRK bei 7564 PatientInnen (4095 Männer, 3469 Frauen; Ratio: 1,2:1) zusammengestellt. Aus dieser Datenbank wurde eine Zufallsstichprobe, die 400 PatientInnen (entspricht 5%) umfasste, von Jänner 1992 (Einführung der computergestützten Datenerfassung) bis Dezember 2000 erhoben. Unser Ziel war es dabei, ein Follow-up von mindestens fünf Jahren zu erreichen. Die Erhebung der Follow-up Daten wurde von einem Mitstudenten (Cand. med. Richard Lindtner) sorgfältig und gewissenhaft durchgeführt.

Wir definierten folgende Ausschlusskriterien für unsere Untersuchung:

1. PatientInnen, die neoadjuvant mit Chemo- und/oder Radiotherapie vorbehandelt worden waren wegen Therapie-bedingter Alterationen des Tumorgewebes (unter anderem betreffend Tumorstadium und Differenzierung)
2. PatientInnen mit syn- oder metachronen Zweitkarzinomen im Kolon oder Rektum wegen unklarer Situation im Follow-Up (konkurrierendes invasives Malignom)
3. PatientInnen mit einem oder mehreren anderen konkurrierenden invasiven Karzinomen (z. B. Mammakarzinom) wegen unklarer Situation im Follow-Up
4. PatientInnen, die nur mit einer Polypektomie wegen eines T1-Karzinoms therapiert wurden, wegen fehlender Lymphknotenresektion (unklare N-Kategorie)

2.1.2. Histopathologie

Für die histopathologische Re-Evaluierung standen 381 (95%) Tumoren der 400 PatientInnen zur Verfügung. Das Kollektiv beinhaltete 215 Männer und 166 Frauen (Ratio 1,3:1). Das mediane Erkrankungsalter lag bei 68,5, der Mittelwert bei 69,9 Jahren (Spannweite 28-93 Jahre).

Drei Untersucher, Univ. Doz. Dr. med. Cord Langner, Cand. med. Verena Pollheimer und Cand. med. Marion Pollheimer) evaluierten unabhängig von einander

die histopathologischen Schnittpräparate. Folgende histopathologischen Parameter wurden für die Re-Evaluierung herangezogen:

- TNM-Klassifikation gemäß UICC 2002 (112)
- Differenzierungsgrad gemäß WHO-Klassifikation (127)
- Histologischer Typ (beinhaltet auch Bestimmung von muzinösen sowie plattenepithelialen Anteilen) gemäß WHO-Klassifikation (127)
- Anzahl der resezierten Lymphknoten
- Anwesenheit einer extra- und/oder intramuralen Lymph- oder Blutgefäßinvasion
- Perineurale Invasion
- Tumorkonfiguration an der Invasionsfront (Border)
- Tumorzelldissoziation (Budding)
- Intra- und peritumorale Entzündung
- Anteil an eosinophilen Granulozyten an den Entzündungszellen
- Vorhandensein von (Mikro)Abszessen
- Peritumorale Lymphfollikel (Crohn's like lesions)
- Perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate (Cuffs)
- Ausprägungsgrad von Nekrose
- Ausprägungsgrad von Desmoplasie

Die Tumorlokalisierung und Größe wurde aus der Krankengeschichte entnommen. Alle drei Untersucher waren bezüglich der klinischen Daten blind, da das Follow-up, wie oben bereits erwähnt, von einem anderen Studenten durchgeführt wurde. Zur Analyse standen im Mittel 4,5 (Medianwert 4, Spannweite 1-17) Gewebsblöcke zur Verfügung und in mehr als 90% der Fälle waren zumindest drei Blöcke vorhanden.

2.1.3. Follow-up

Das Follow-up bestand aus den üblichen Nachsorgeuntersuchungen mit Anamnese und einer routinemäßig durchgeführten physikalischen Untersuchung, Labortests mit Bestimmung von Blutbild, CEA, CA19-9 und Leberenzymen alle 3 Monate für die ersten 3 Jahre und danach in einem sechsmonatigen Intervall. Eine abdominale Ultraschalluntersuchung sowie ein Thoraxröntgen wurden in den ersten 3 Jahren alle sechs Monate und in den weiteren einmal im Jahr durchgeführt. Weiters wurde bei PatientInnen mit einem Rektumkarzinom jährlich eine CT Untersuchung des Beckens durchgeführt.

Die Krankheitsprogression wurde definiert entweder als Auftreten von lokalem Tumorrezidiv (jedes nachweisbare Rezidiv im Follow-Up, ob alleine oder in Kombination mit generalisiertem Krankheitsrückfall) oder als Auftreten von systemischem Tumorrezidiv (jede nachweisbare Fernmetastase im Follow-Up, außer Lokalrezidiv).

Die Studie wurde im April 2007 von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt.

2.1.4. TMA-Konstruktion

Im Anschluss an die histopathologische Re-Evaluierung erfolgte die Analyse von „K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC/ L523S) durch Immunhistochemie. Die Analyse wurde unter Zuhilfenahme der Tissue Microarray (TMA) Technik durchgeführt. Die TMAs wurden mittels eines manuellen Tissue-arraying-Instruments (Beecher, Silver Spring, MD, USA) konstruiert. Diese Technik wurde vor etwa 10 Jahren eingeführt. Sie ermöglicht die rasche kostenarme Untersuchung großer PatientInnenkollektive. Ein weiterer Vorteil ist die gleichmäßige Färbung vieler Proben auf einem Objektträger in einem Färbedurchgang und damit unter identischen Bedingungen (128).

Bei der Konstruktion der TMAs wurden jeweils zumindest 3 repräsentative Gewebestanden (Durchmesser 0,6mm) aus den primären Tumorblöcken (formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe), von unterschiedlichen Tumorabschnitten und wo vorhanden auch aus zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen, in einen TMA-Block überführt. Insgesamt wurden acht TMA-Blöcke

mit zusammen 2760 Stenzen erstellt. Darunter waren 1907 Stenzen der 381 Primärtumoren (im Mittel und Median 5 Stenzen pro Tumor, Spannweite 3-14) und 853 Stenzen von 211 Metastasen (im Mittelwert 4.6 und Median 4 Stenzen pro Metastase, Spannweite 3-12).

Die 381 PatientInnen teilten sich wie folgt auf: 220 nur mit Primärtumor, 119 mit Primärtumor und Lymphknotenmetastase, 18 mit Primärtumor und Fernmetastase und 24 PatientInnen mit sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastase. Von den 381 Primärtumoren mussten letztlich 2 wegen im Archiv nicht auffindbarer Tumorblöcke aus der Auswertedatei entfernt werden. Somit standen am Ende 379 Primärtumoren für die immunhistochemische Analyse zur Verfügung.

Folgende Verteilung konnte für die Lokalisation der Fernmetastasen gefunden werden: Am häufigsten waren die Leber (insgesamt fünfzehn Mal und einmal mit einer ovariellen Mitbeteiligung) und das Peritoneum (zwölf Fälle, zweimal die Eierstöcke und einmal die Haut mitbetroffen) von einem metastastischen Befall betroffen. Bei weiteren fünf PatientInnen zeigten das Cerebrum, in drei Fällen der Gastrointestinaltrakt (zweimal der Dünndarm und einmal der Magen) Fernmetastasen. Die Lunge war in zwei weiteren Fällen das Ziel der Metastasierung. Am seltensten (je einmal) standen Tumorabsiedelungen in der Milz, den Ovarien, oder im Knochen für die weitere Aufarbeitung und Auswertung zur Verfügung.

2.2. Immunhistochemie

2.2.1. Färbeprotokoll

Von den TMAs wurden 3µm dicke Schnitte hergestellt und mit einem gegen KOC gerichteten monoklonalen Antikörper (siehe unten) gefärbt. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit proteolytischen Enzymen wurde nicht durchgeführt. Zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung (heat-induced epitope retrieval, HIER) wurden die Paraffinschnitte in eine vorgewärmte Pufferlösung (Target Retrieval Solution pH 9, Dako, Code-Nr. S2368; Dako, Glostrup, Dänemark) eingetaucht und in einem Wasserbad (95–99 °C) erwärmt (40 Minuten) Das Gefäß mit Puffer und der

Objektträger wurden nach der Hitzebehandlung 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Der Primärantikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human IMP3, m-a-L523S, Antigen synonym KOC; Dako) wurde mit Dako Real™ Antibody Diluent (Code-Nr. S2022) auf 1:100 verdünnt und danach auf die TMA-Schnitte aufgebracht (Inkubationszeit 60 Minuten bei Raumtemperatur). Als Detektionssystem wurde Dako Real™ EnVision™ HRP/Rabbit/Mouse (Code-Nr. K 5007) verwendet (Inkubationszeit 30 Minuten bei Raumtemperatur). Abschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein duktales Adenokarzinom des Pankreas. Als Negativ-Kontrollreagenz kam Dako Negative Control, Mouse IgG2a (Code-Nr. X0943) zur Anwendung, das auf dieselbe IgG-Konzentration wie der Primärantikörper verdünnt wurde.

2.2.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei von einander unabhängigen und in Hinblick auf die klinisch-pathologischen Daten geblindeten Beobachtern (Univ.-Doz. Dr. med. Cord Langner und Cand. med. Verena Pollheimer) auf ihre Immunreaktivität in einem semiquantitativen Ansatz untersucht.

Die Immunreaktivität wurde als positiv gewertet, wenn das Zytoplasma eine deutliche braune Färbung aufwies, eine allfällige nukleäre Expression fand keine Berücksichtigung. Die Immunreaktivität wurde in folgenden Kategorien eingeteilt: 0: keine Reaktivität; 1+ (1-10%), 2+ (11-25%), 3+ (26-50%), 4+ (51-75%), 5+ (76-90%), 6+ (>90%). Um eine leichtere statistische Auswertung zu gewährleisten, führten wir eine weitere Stratifizierung wie folgt durch: Score 1: < 10%, Score 2: 10-50%, Score 3: >50%. Des Weiteren bewerteten wir die Intensität der Färbung mit 1 (schwach), 2 (mittelstark) und 3 (stark), vergleiche dazu die Farabbildungen im Ergebnisteil.

2.3. Statistik

Assoziationen zwischen KOC-Expression und Tumorparametern wie T- und N-Klassifikation, UICC-Stadium, Tumordifferenzierung (Grad), Tumorgröße (Durchmesser) und Lymph- und/oder Blutgefäßinvasion wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht. Das progressionsfreie und krankheitsspezifische

Überleben wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mittels Log-Rank-Test verglichen. Die Überlebenskurven wurden graphisch dargestellt. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig mit Signifikanz bei $p < 0.05$.

3. Ergebnisse

3.1.1. Pathologische Daten

Die Tumoren waren wie folgt auf das Kolon und Rektum verteilt: 49 (13%) der Tumoren befanden sich im Zökum (ICD-O C18.0), 27 (7%) im Colon ascendens (ICD-O C18.2), 18 (5%) an der Flexura hepatica (ICD-O C18.3), 13 (3%) im Colon transversum (ICD-O C18.4), 13 (3%) an der Flexura lienalis (ICD-O C18.5), 15 (4%) im Colon descendens (ICD-O C18.6), 82 (22%) im Colon sigmoideum (ICD-O C18.7), 15 (4%) am rektosigmoidalen Übergang (ICD-O C19) und 149 (39%) im Rektum (ICD-O C20).

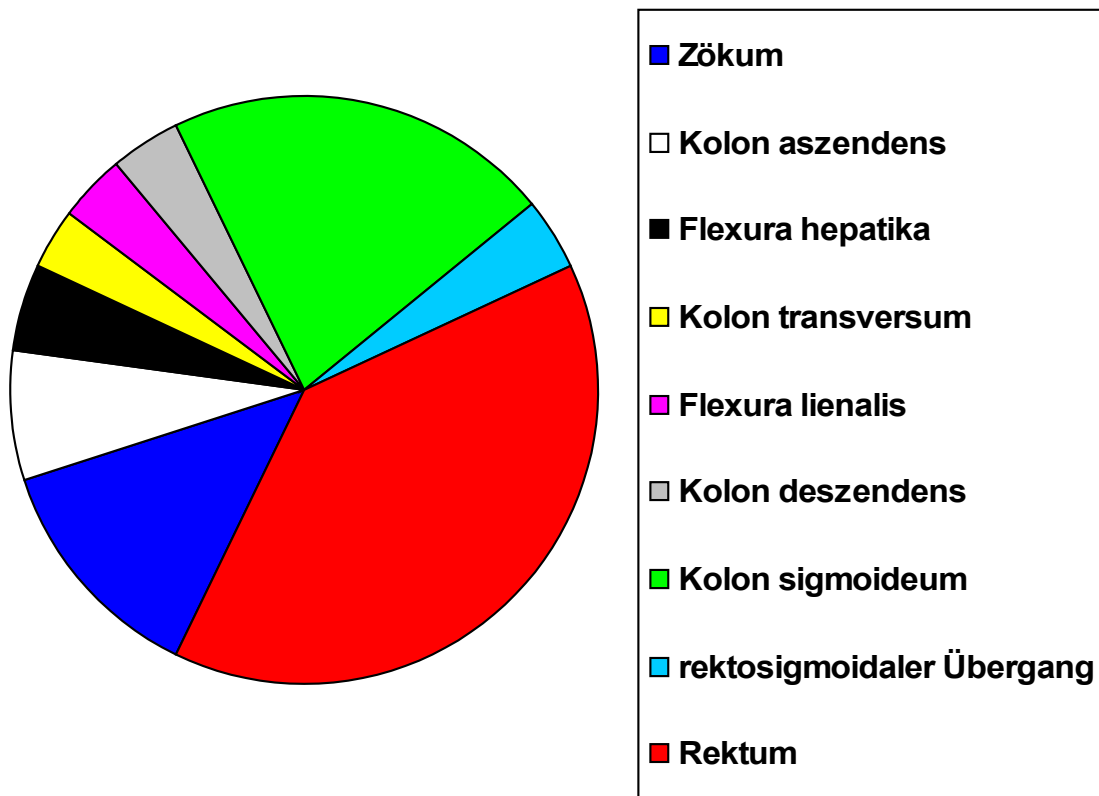


Abb. 1

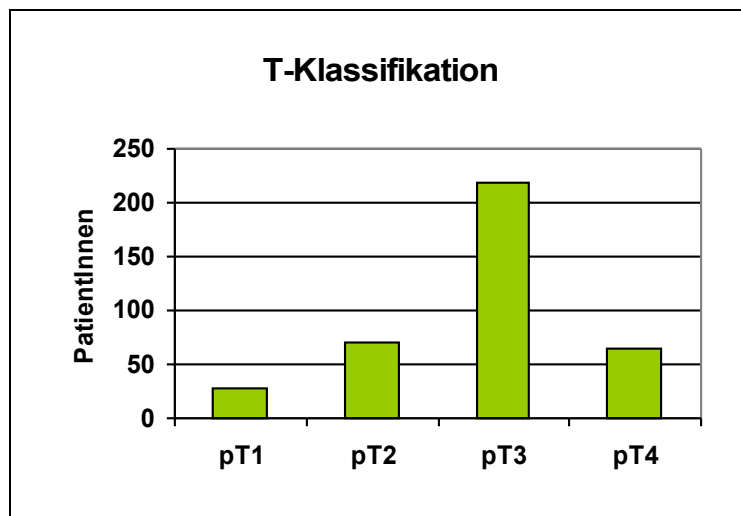


Abb.2

28 (7%) PatientInnen wiesen ein pT1-, 70 (19%) ein pT2-, 218 (57%) ein pT3- und 65 (17%) ein pT4-Karzinom auf.

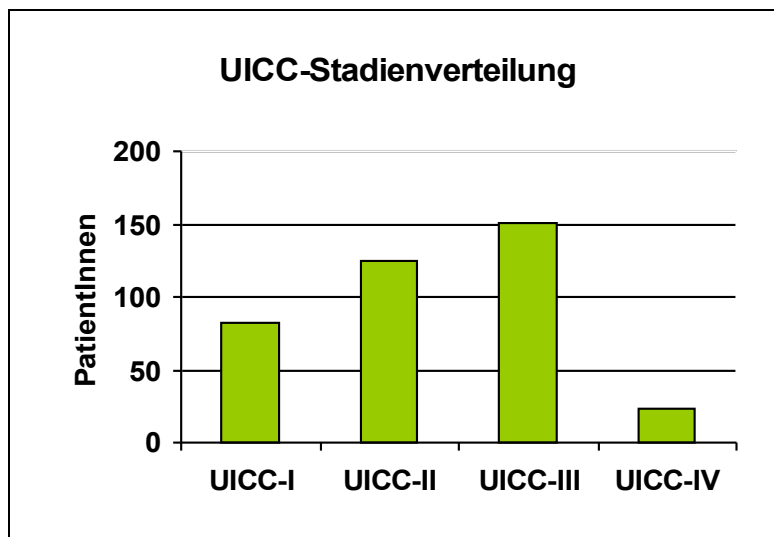


Abb.3

In 82 der 381 (21%) PatientInnen bestand zum Zeitpunkt der Operation ein UICC-Stadium I, in 125 (33%) ein UICC-Stadium II, in 151 (40%) ein UICC-Stadium III und in 23 (6%) ein UICC-Stadium IV.

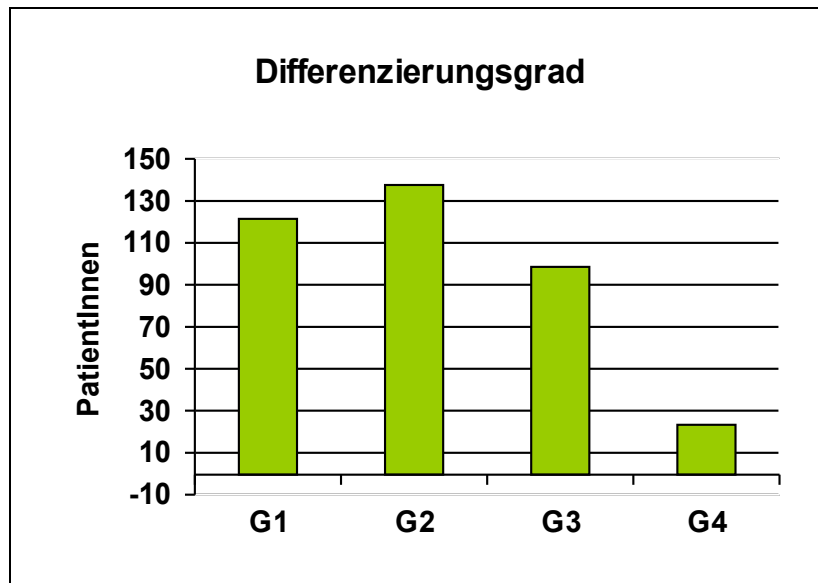


Abb. 4

121 (32%) Tumore zeigten einen hohen, 138 (36%) Tumore einen mittleren und 99 (26%) Tumore einen niedrigen Differenzierungsgrad. In den verbleibenden 23 (6%) Fällen lagen ganz oder in Teilen undifferenzierte Karzinome vor.

Die histologische Re-Evaluierung der KRK lieferte insgesamt:

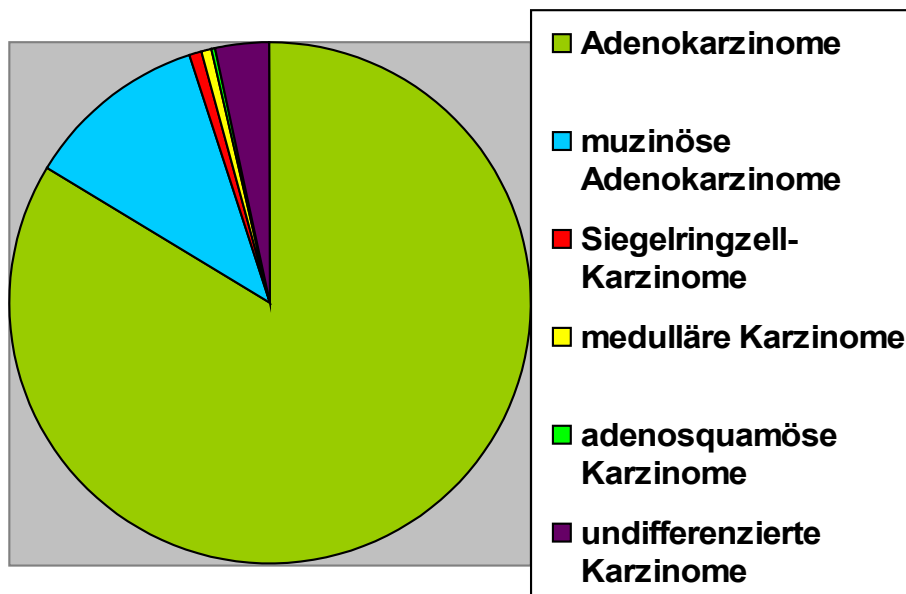


Abb. 5

- 318 (84%) tubuläre Adenokarzinome
- 44 (12%) muzinöse Adenokarzinome
- 3 (1%) Siegelringzell-Karzinome
- 2 (1%) medulläre Karzinome
- 1 (0%) adenosquamöses Karzinom
- 13 (2%) undifferenzierte Karzinome

Betrachtet man den Anteil an muzinöser Differenzierung (unter 50% der Fläche) bei nicht-muzinösen Karzinomen kommt man insgesamt auf 70 (22%) von 317 konventionellen Adenokarzinomen. Diese wurden von uns, gemäß ihres muzinösen Anteils, weiter unterteilt: 32 (46%) Adenokarzinome zeigten einen muzinösen Anteil von $\leq 10\%$, 23 (33%) Adenokarzinome einen muzinösen Anteil von 11-25% und 15 (21%) Adenokarzinome einen muzinösen Anteil von 26-50%igen. Bei 247 Tumoren bestand keine muzinöse Differenzierung.

Insgesamt 158 (42%) KRK wiesen entweder eine Blut- oder eine Lymphgefäßinvasion auf. Bei 223 (59%) Tumoren konnten wir weder einen Veneneinbruch noch einen Lymphgefäßbefall feststellen. Im Detail wurden folgende Befunde erhoben: 126 (33%) der Tumoren präsentierten sich mit Lymphgefäßinvasionen, davon waren 56 (44%) intramural, 7 (6%) extramural und 63 (50%) kombiniert intra-/extramurale gelegen. Eine Blutgefäßinvasion war bei 87 (23%) der 381 Tumoren nachweisbar. Davon waren 14 (16%) intramural, 54 (62%) extramural sowie 19 (22%) kombiniert intra-/extramurale gelegen.

Eine Metastasierung in regionäre Lymphknoten lag bei 168 (44%) PatientInnen vor. In 83 (22%) Fällen wurden Metastasen in 1-3 Lymphknoten gefunden (pN1), in 85 (22%) Fällen in 4 oder mehr Lymphknoten (pN2).

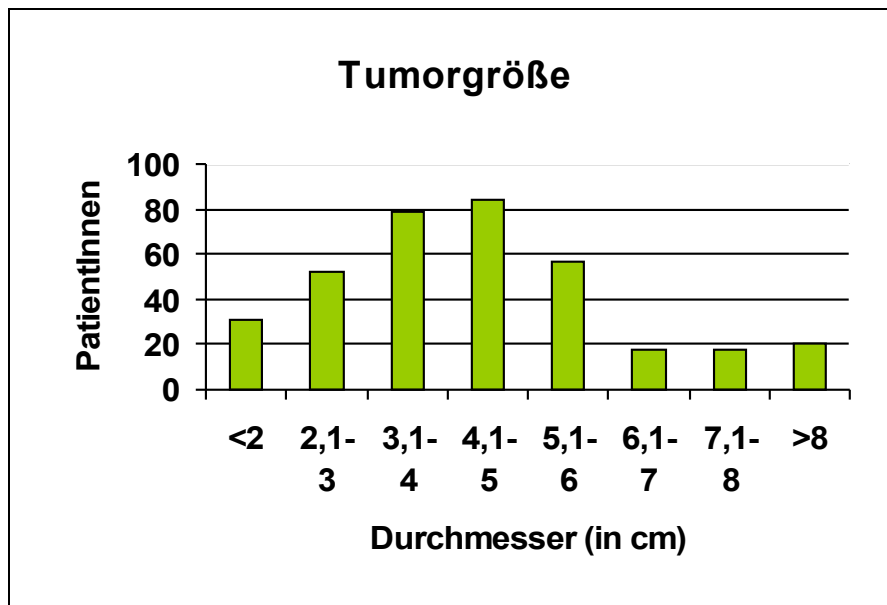


Abb. 6

Die Größenverteilung der KRK variierte innerhalb der Spannweite von 0,6 bis 16cm. Der Medianwert lag bei 4,5 cm, der Mittelwert mit 4,7 cm knapp darüber. 5 (1%) Tumoren zeigten einen Durchmesser von ≤ 1 cm, 26 (7%) einen von 1,1 bis 2 cm, 52 (15%) einen von 2,1 bis 3 cm, 79 (22%) einen von 3,1 bis 4 cm, 84 (23%) einen von 4,1 bis 5 cm, 57 (16%) einen von 5,1 bis 6 cm, 18 (5%) einen von 6,1 bis 7cm, 18 (5%) einen von 7,1 bis 8 cm, 6 (2%) einen Durchmesser von 8,1 bis 9 cm, 6 (2%) einen zwischen 9,1 und 10cm sowie 8 (2%) einen Durchmesser von >10 cm. In 22 Fällen (6%) war die Tumorgroesse unbekannt.

3.1.2. Immunhistochemie

Eine Expression von KOC im Zytoplasma der Tumorzellen bestand in 150 (40,5%) der 370 Primärtumoren. Im Detail ergab die Analyse eine Immunpositivität von $<10\%$ der Tumorzellen in 35 (23%), von 11-25% in 31 (21%), von 26-50% in 11 (7%), von 51-75% in 23 (15%), von 76-90% in 20 (13%) und von $>90\%$ in 30 (21%) der 150 positiven Primärtumoren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in 77 (51%) Fällen eine Immunpositivität von bis zu 50% erreicht wurde. In den verbleibenden 73 Primärtumoren (49%) wurde eine KOC-Expression von mehr als 50% nachgewiesen werden. Übertragen in unser Scoring-Schema lieferte unsere Analyse eine Anzahl

von 35 (23%) für den Score 1, 42 (28%) für den Score 2 und 73 (49%) Score 3. In 220 (59%) Fällen war der Primärtumor negativ für KOC.

Elf (3%) von den ursprünglich 381 Primärtumoren wurden als nicht auswertbar aus der Analyse ausgenommen. Bei zwei PatientInnen fehlten die Tumorblöcke und in den restlichen 9 Fällen war kein Tumorgewebe auf den TMA-Schnitten vorhanden (Kein Tumor in der Stanze, Material abgeschwommen etc.). Dies führte zu einer Gesamtzahl von 370 KRK, die für die finale immunhistochemische Untersuchung herangezogen werden konnten.

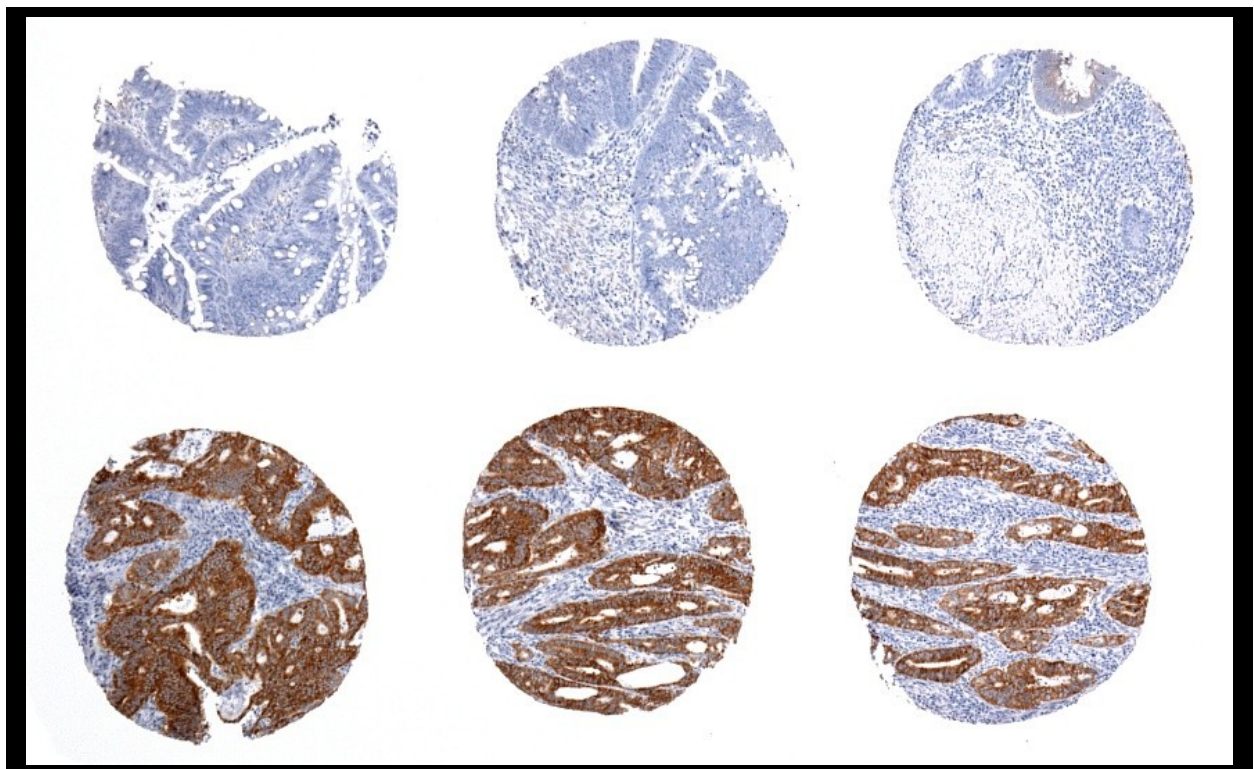


Abb.7: TMA-Beispiel anhand von 6 Gewebestanzten, in der oberen Reihe fokale Anfärbung (Score 1), in der unteren Reihe starke diffuse Immunreaktion (Score 3, Original x100).

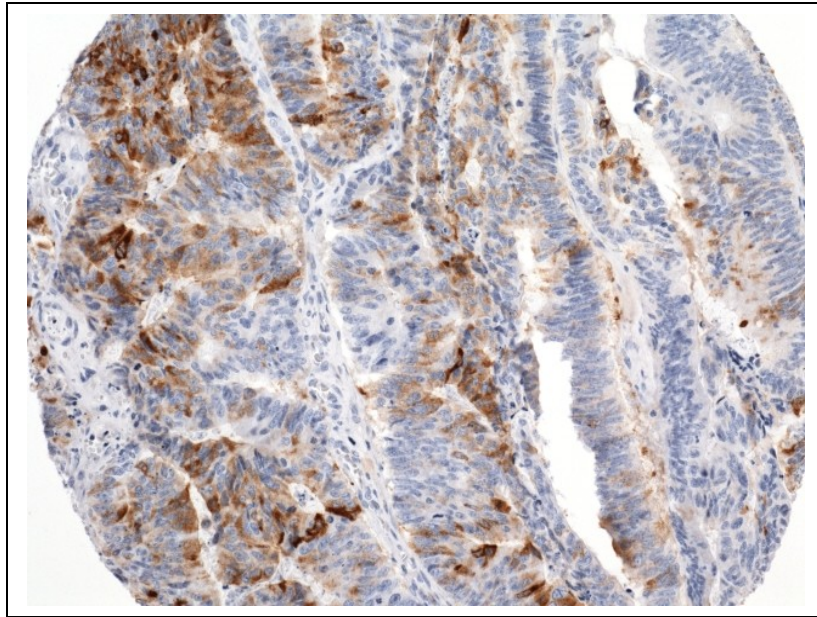


Abb. 8 : Mäßige KOC-Expression (Score 2) in einem klassischen Adenokarzinom (Original x200)

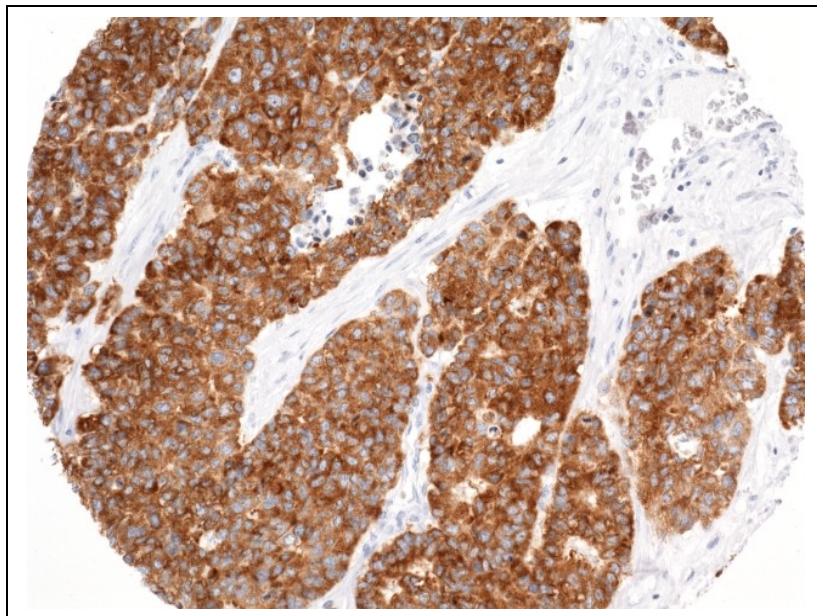


Abb. 9: Hochgradige KOC-Expression (Score 3) in einem klassischen Adenokarzinom (Original x200)

In manchen Fällen fiel eine ausgeprägte Heterogenität der KOC-Expression auf, während manche Stanzeln eine starke Anfärbbarkeit zeigten, war bei zugehörigen anderen Stanzeln eine schwache Färbung nachweisbar. Wenn dies der Fall war, wurde von uns der Mittelwert aller Stanzeln des betreffenden Tumors gewertet.

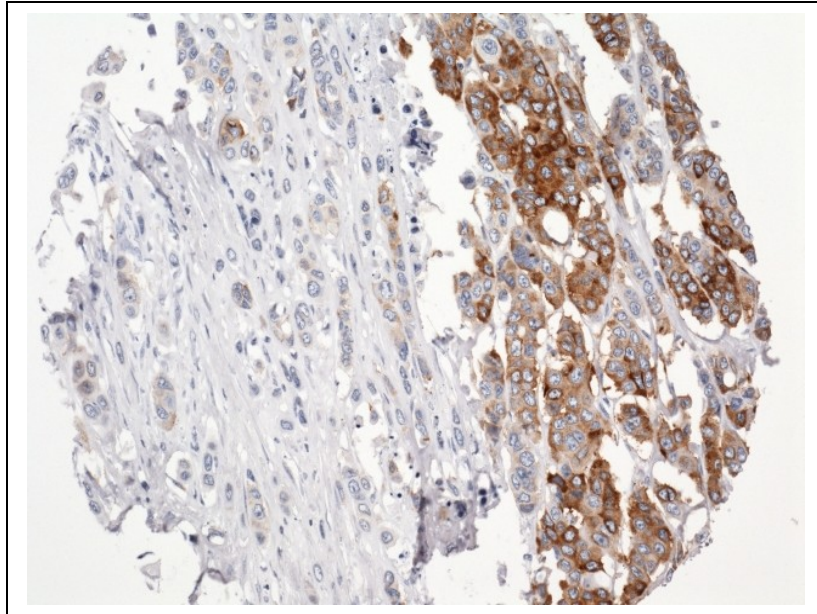


Abb. 10: Heterogene KOC-Expression (Original x200)

Bezüglich der Färbintensität zeigten 58 (41%) Tumoren eine schwache, 61 (43%) eine mittlere und 24 (17%) eine starke Intensität. Folgende Bilder zeigen Beispiele.

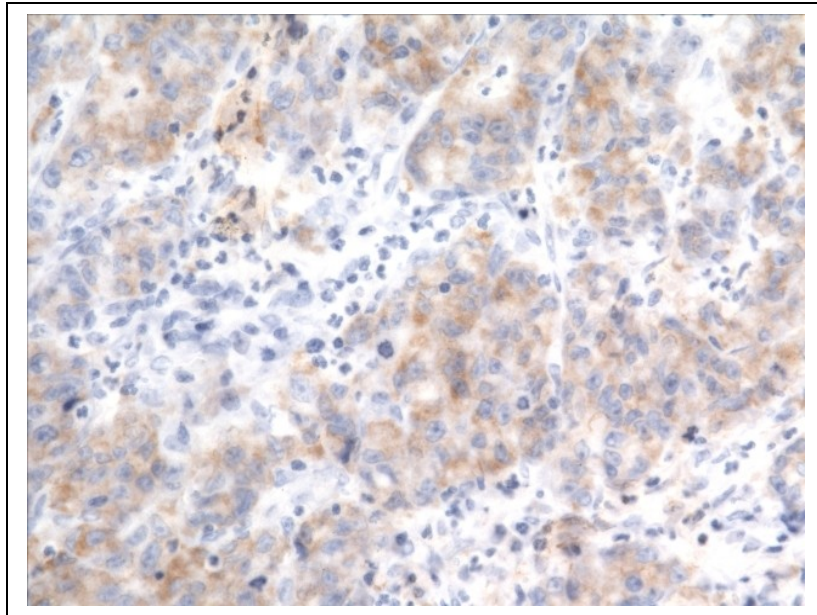


Abb. 11: Schwache Färbeintensität (Original x 400)

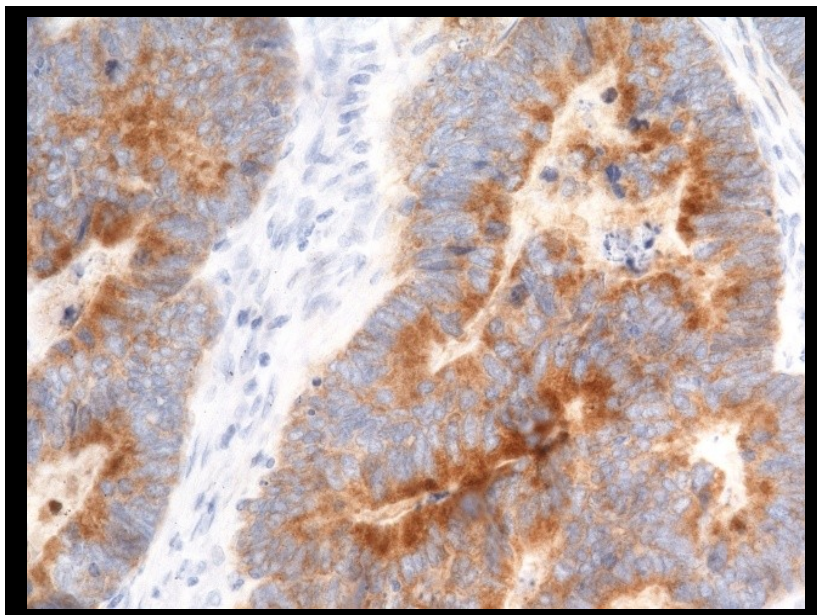


Abb. 12: Mittlere Färbeintensität (Original x 400)

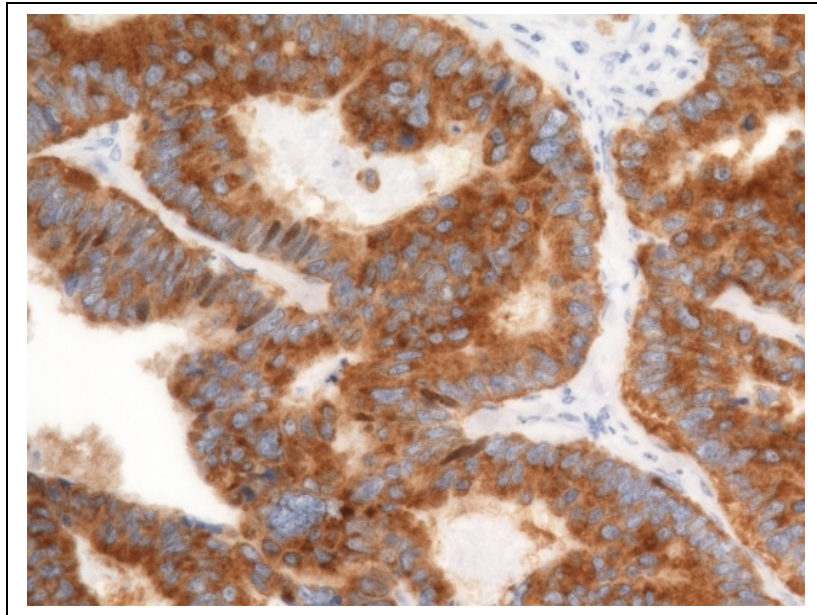


Abb. 13: Starke Färbeintensität (Original x 400)

Das zelluläre Färbemuster für anti-KOC ist normalerweise zytoplasmatisch, allerdings beobachteten wir in 13 (4%) der Fälle auch eine fokale nukleäre Färbung.

Korrelation mit Tumorparametern

Die KOC-Expression zeigte eine signifikante Assoziation ($p=0.001$) mit der Tumordifferenzierung. Des Weiteren bestand eine signifikante Assoziation dem Tumordurchmesser ($p=0,034$). Ein Trend konnte im Hinblick auf eine Assoziation mit einer Lymphgefäßinvasion ($p=0,084$) verzeichnet werden. Eine Zusammenfassung aller Daten zeigt Tabelle 3.

		Score 0		Score 1		Score 2		Score 3		p-Wert
		0 %		< 10 %		10 – 50 %		> 50 %		
T-Klassifikation	n									
T1	26	22	85%	2	8%	0	0,0%	2	8%	0,456
T2	67	42	63%	3	5%	9	13%	13	19%	
T3	214	120	56%	21	10%	29	14%	44	21%	
T4	63	32	51%	7	11%	13	21%	11	18%	
Tumordifferentierung	n									
G1	145	98	68%	10	7%	15	10%	22	15%	0,001
G2	140	82	59%	18	13%	20	14%	20	14%	
G3	61	28	46%	3	5%	12	20%	18	30%	
G4	24	8	33%	2	8%	4	17%	10	42%	
N-Klassifikation	n									
N neg	230	151	66%	19	8%	23	10%	37	16%	0,086
N pos	142	67	47%	14	10%	28	20%	33	23%	
Tumorstadium	n									
I	80	41	51%	9	11%	15	19%	15	19%	0,154
II	120	73	61%	11	9%	15	13%	21	18%	
III	147	83	57%	13	9%	21	14%	30	20%	
IV	21	18	86%	1	5%	2	10%	0	0%	
Lymphatische Invasion	n									
L0	249	155	62%	22	9%	31	12%	41	17%	0,084
L1	121	61	50%	11	9%	20	17%	29	24%	
Venöse Invasion	n									
V0	283	170	60%	24	9%	39	14%	50	18%	0,268
V1	87	46	53 %	9	10%	12	14%	20	23%	
Tumorgröße										
≤ 4.5 cm	191	119	62%	23	12%	20	11%	29	15%	0,034
> 4.5 cm	157	83	53%	10	6%	26	17%	38	24%	

Tab. 3

Vergleich Primärtumor und zugehörige Metastasen

Für 143 (39%) Primärtumoren standen auch Blöcke von Lymphknotenmetastasen für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung. Von diesen zeigten 58 (41%) Lymphknotenmetastasen eine Immunpositivität, 66 (46%) waren KOC-

negativ und 19 (13%) wurden als nicht auswertbar eingestuft. Bei zwei PatientInnen fehlten die Tumorblöcke und in den restlichen 17 Fällen war kein Tumorgewebe auf den TMA-Schnitten vorhanden (Kein Tumor in der Stanze, Material abgeschwommen etc.).

In 75 von 143 (52%) Fällen mit positivem Primärtumor waren auch die Lymphknotenmetastasen positiv für KOC.

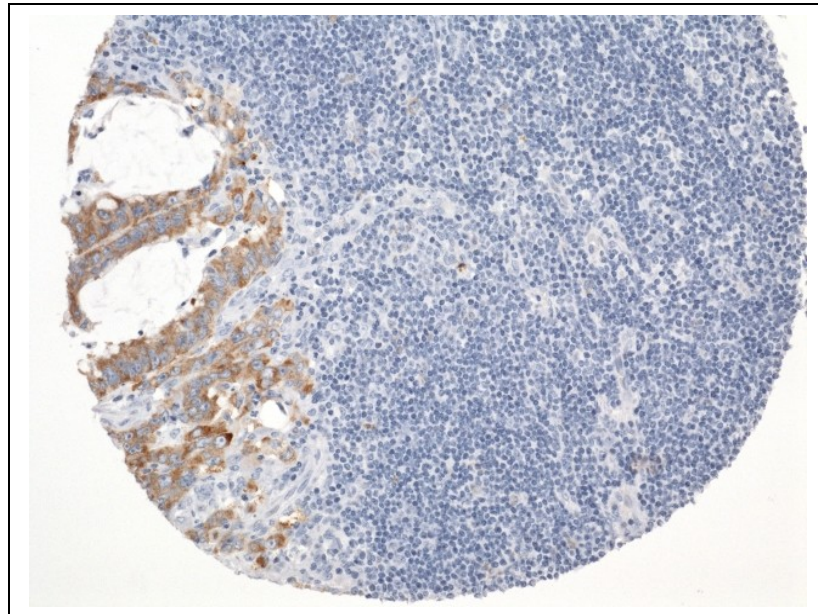


Abb. 14: Lymphknoten mit KOC-positiver KRK-Metastase. (Original x200)

In 48 von 58 (83%) Fällen mit negativem Primärtumor zeigten die Lymphknotenmetastasen eine negative KOC-Immunreaktion und waren in nur 10 (17%) Fällen positiv. Vergleicht man die KOC-Immunoreaktivität in den Primärtumoren mit der KOC-Immunoreaktivität in den Lymphknotenmetastasen, so findet man in bei allen 75 PatientInnen äquivalente Positivergebnisse. Bei 26 PatientInnen (35%) zeigte die Lymphknotenmetastase eine stärkere Expression als der dazugehörige Primärtumor. In 25 Fällen traf der umgekehrte Fall zu, nämlich eine stärkere Expression im Primärtumor als in der Lymphknotenmetastase und bei weiteren 24 PatientInnen verhielt sich die KOC-Expression sowohl im Primärtumor als auch in der Lymphknotenmetastase gleich.

Außerdem standen für die immunhistochemische Analyse in 43 (12%) Fällen Fernmetastasen zur Verfügung. Unter ihnen präsentierten sich 21 (49%)

Fernmetastasen mit einer KOC-Positivität, 18 (42%) waren KOC-negativ und 4 (9%) wurden als nicht auswertbar eingestuft. Bei diesen 4 PatientInnen war kein Tumorgewebe auf den TMA-Schnitten vorhanden (Kein Tumor in der Stanze, Material abgeschwommen etc.).

In 8 von 23 (35%) Fällen mit negativem Primärtumor zeigten die Fernmetastasen eine positive KOC-Immunreaktion. 15 (65%) Fernmetastasen wiesen bei negativem Primärtumor eine negative KOC-Immunreaktion auf.

In 6 (33%) von 18 Fällen mit positivem Primärtumor waren auch die Fernmetastasen positiv für KOC. In den verbleibenden 12 Fällen waren die Immunreaktion als negativ zu werten.

Wenn allerdings beide, sowohl der Primärtumor als auch die Fernmetastase eine KOC-Positivität aufweisen, so lässt sich eine Zunahme an dem Prozentsatz an positiven Zellen nachweisen. Im Detail heißt das für unser Kollektiv, 4 der 6 PatientInnen (67%) mit sowohl positiven Primärtumor als auch positiver Fernmetastase eine stärkere KOC-Expression in der Fernmetastase. Bei den restlichen 2 PatientInnen verhielt sich die KOC-Immunreaktion einmal im Primärtumor und in der Fernmetastase gleichsinnig und das andere Mal war sie im Primärtumor stärker ausgeprägt.

3.1.3. Follow-up

Bei 350 der insgesamt 381 PatientInnen (92%) waren Daten zum klinischen Verlauf verfügbar. Die mittlere und mediane Follow-up-Zeit betrug 56 und 45 Monate, die Spannweite betrug 0-15 Jahre. In 141 der 350 PatientInnen (40%) wurde eine Krankheitsprogression nachgewiesen. 118 (33%) der PatientInnen verstarben dabei an dem Karzinom, elf (3%) sind zum Zeitpunkt der Datenerhebung mit Metastasen am Leben, sieben (2%) zeigen keinen Hinweis auf eine Krankheitsprogression nach Metastastektomie und weitere fünf (1%) PatientInnen verstarben innerhalb von 30 Tagen nach der Operation. Die mittlere Zeit bis zur Progression war 15 Monate (Medianwert 7, Spannweite 0-88).

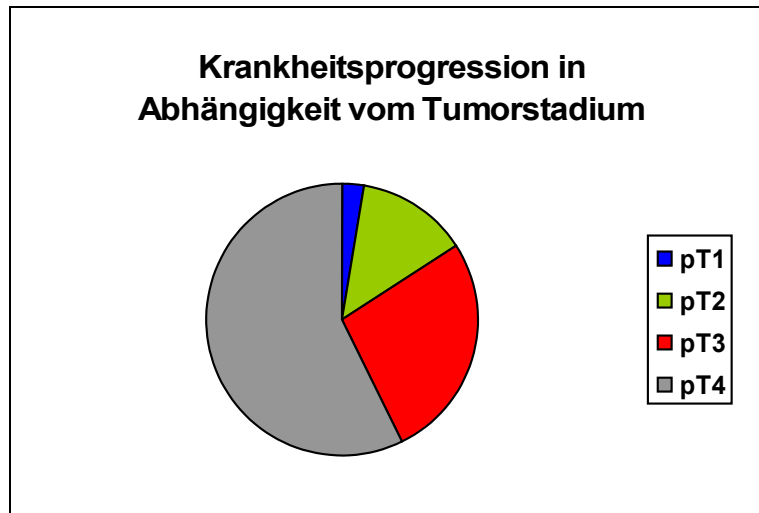


Abb. 15

Die Krankheitsprogression verhielt sich in Abhängigkeit vom Tumorstadium wie folgt: Ein/e Patient/in (4%) von 26 PatientInnen mit einem pT1-Karzinom, 13 (19%) von 68 mit einem pT2-Karzinom, 77 (40%) von 195 mit einem pT3-Karzinom und 50 (83%) von 60 mit einem pT4-Karzinom zeigten einen Progress ihrer Tumorerkrankung

Das progressionsfreie Überleben von PatientInnen mit einem KOC-positiven Karzinom betrug nach 120 Monaten 55% und bei PatientInnen mit einem KOC-negativen Karzinom 60% (siehe Abb. 9). In dem PatientInnenkollektiv mit einer KOC-Expression von <10% ergab sich ein progressionsfreies Überleben von 59% nach 120 Monaten und in der Gruppe mit einer KOC-Expression von >10% von 58% (siehe Abb. 10). Das progressionsfreie Überleben bei PatientInnen mit einer KOC-Expression <50% lag bei 57% und mit einer KOC-Expression >50% bei 58% (siehe Abb. 11).

Für das krankheitsspezifische Überleben ergaben sich sowohl für PatientInnen mit KOC-positiven Tumoren als auch für PatientInnen mit KOC-negativen Tumoren äquivalente Ergebnisse von 60% nach 120 Monaten (siehe Abb. 12).

Das krankheitsspezifische Überleben bei PatientInnen mit einer KOC-Expression von <10% betrug 59% und bei PatientInnen mit einer KOC-Expression von >10% bei 60% (siehe Abb. 13).

In dem PatientInnenkollektiv mit einer KOC-Expression von <50% ergab sich ein krankheitsspezifisches Überleben von 63% und in der Gruppe mit einer KOC-Expression von >50% von 59% (siehe Abb. 14).

Zusammenfassend zeigte in unserem Patientenkollektiv die KOC-Expression keine Beziehung mit dem Patientenüberleben, dies betrifft sowohl das progressionsfreie als auch das krankheitsspezifische Überleben. Sämtliche Unterschiede waren nicht signifikant.

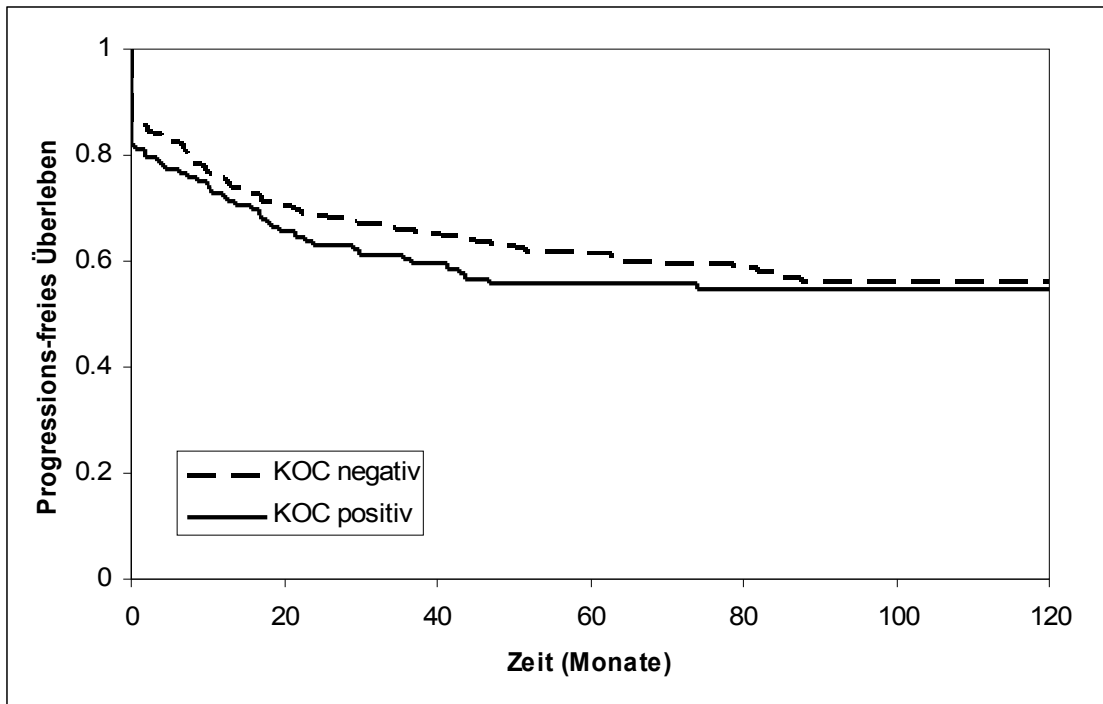


Abb. 16:

Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezügl. einer KOC-Expression ($p = 0,48$).

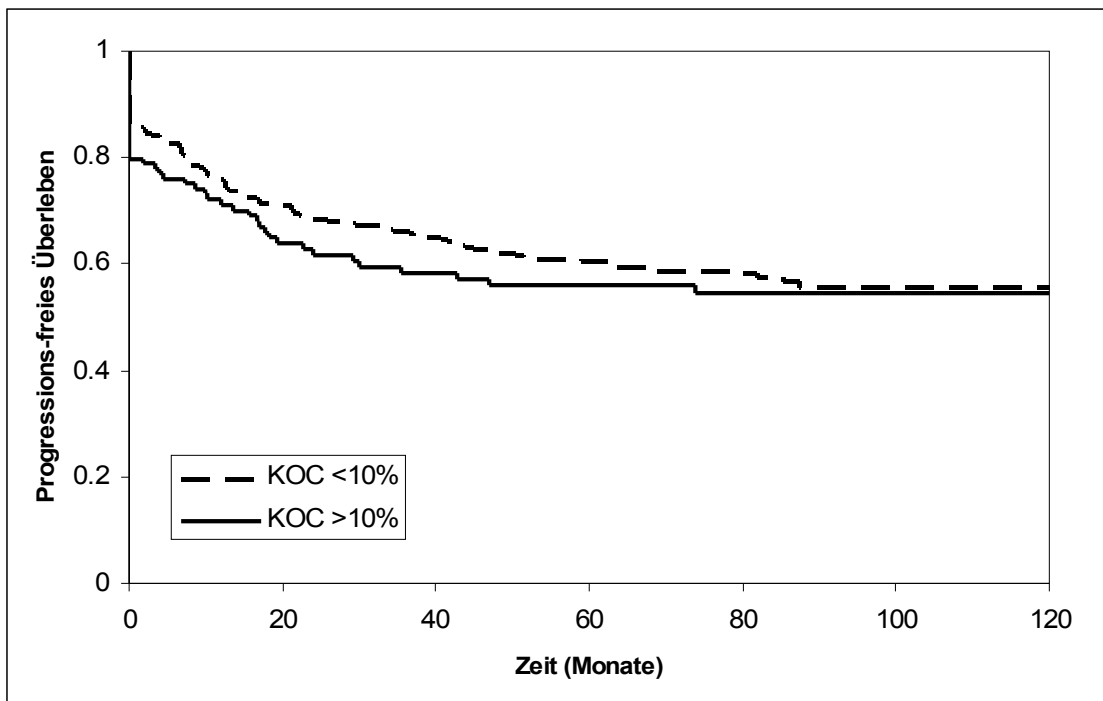


Abb. 17:

Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezügl. einer KOC-Expression von $>10\%$ ($p = 0,51$).

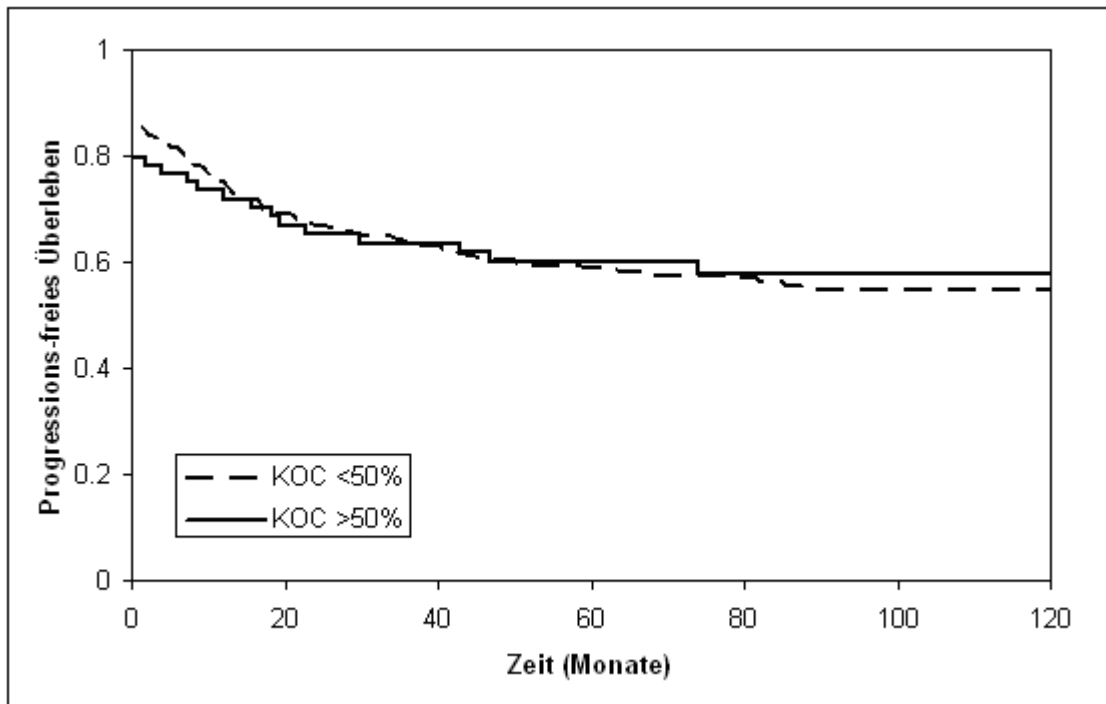


Abb. 18:

Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer KOC-Expression von >50% ($p = 0,91$).

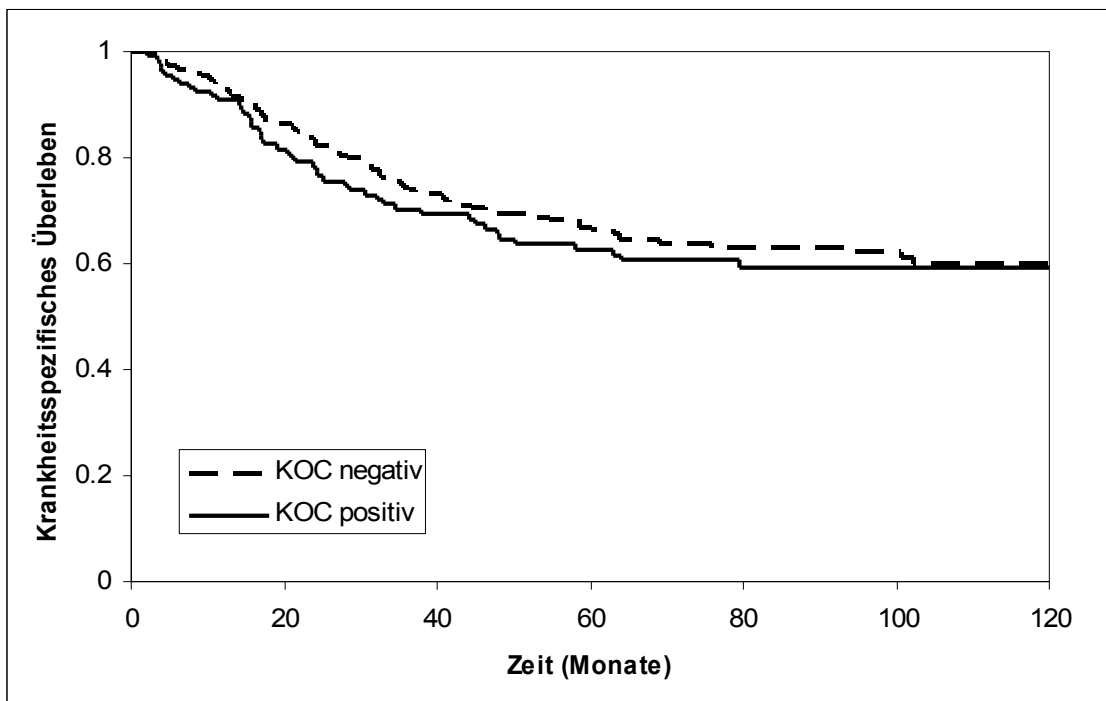


Abb. 19:

Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer KOC-Expression ($p = 0,56$).

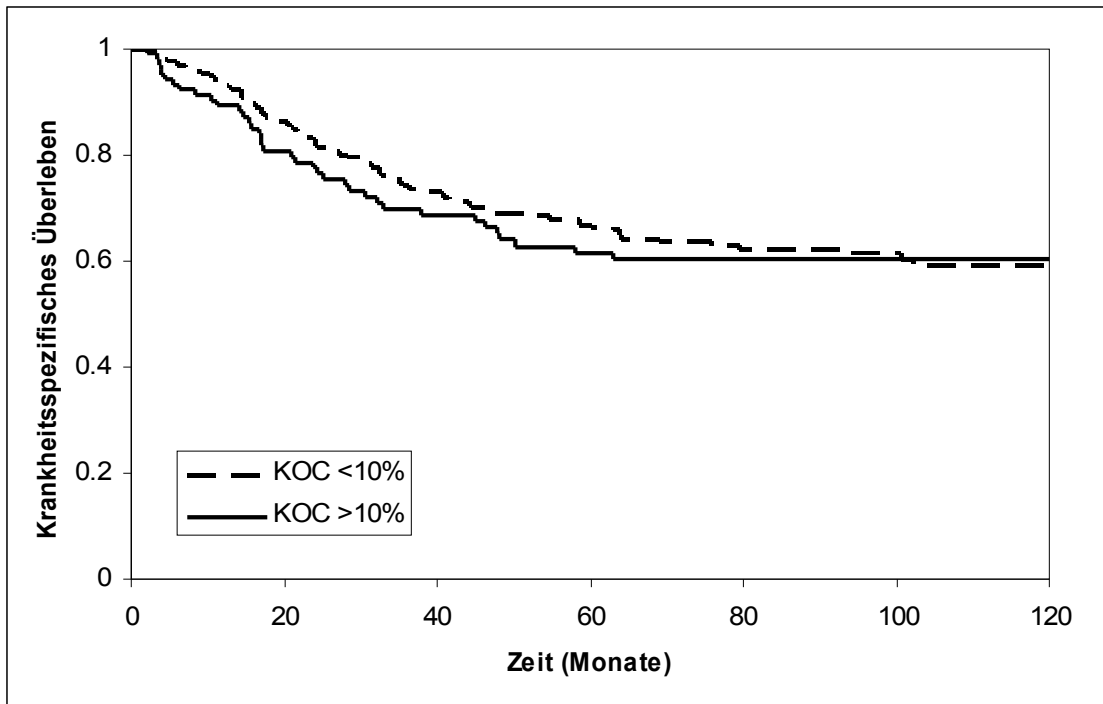


Abb. 20:

Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer KOC-Expression von >10% ($p = 0,64$).

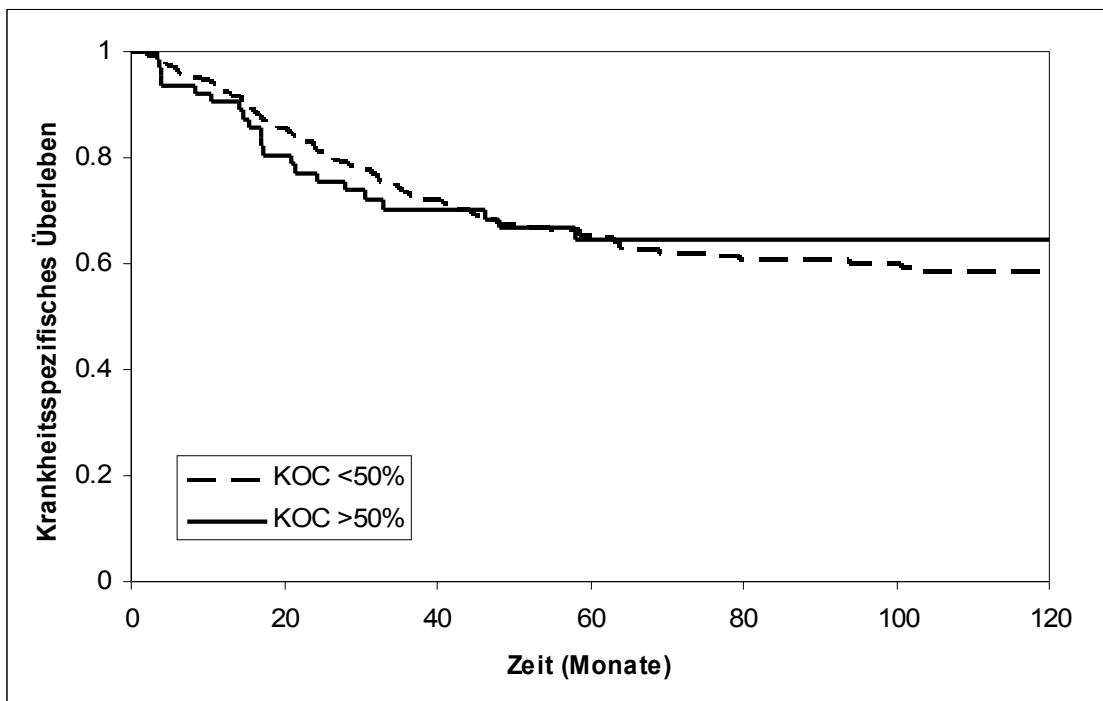


Abb. 21:

Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer KOC-Expression von >50% ($p = 0,77$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von „K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC/L523S), auch bekannt als IMP3 (Insulin-like Growth Factor II mRNA-bindendes Protein 3) beim KRK mittels Immunhistochemie analysiert und eine Korrelation mit konventionellen Tumorparametern und dem Überleben der betroffenen PatientInnen vorgenommen.

Verschiedene Aspekte zur individuellen Abschätzung von Progression und Prognose des KRK sind in den vergangenen Jahrzehnten erforscht worden. Durch Anwendung immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden konnten zahlreiche Faktoren in der molekularen Pathogenese des KRK beschrieben und hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Krankheitsverlauf und die Prognose betroffener PatientInnen evaluiert werden. So wurden in den letzten Jahren große Fortschritte in der Charakterisierung von Tumorsuppressorgenen, (Proto)Onkogenen, Zellzyklusregulatoren, Markern für Proliferation und Apoptose, Zelladhäsionsantigenen und Angiogenesefaktoren, speziell auch in Hinblick auf ihre prognostische Signifikanz, gemacht (8).

Trotzdem hängt auch heute noch die Therapieplanung beim KRK ganz wesentlich von den konventionellen pathohistologischen Eigenschaften des Tumors ab. Unter diesen ist die Klassifizierung der Läsionen im TNM-System der UICC das wichtigste und am besten evaluierte Instrument für Prognoseabschätzung und Therapie, und jeder neue Marker ist am „Goldstandard“ des TNM-Systems zu messen. Es ist allerdings bekannt, dass nicht jeder Patient eines bestimmten TNM-Stadiums tatsächlich auch die gleiche Chance hat zu überleben. Diese Kenntnis führte zu einer Vielzahl von Ansätzen, weitere Prognosefaktoren zu ermitteln, jeweils mit dem Ziel, eine präzisere Risikostratifizierung und dadurch auch individuellere Prognoseabschätzung zu erreichen und infolgedessen HochrisikopatientInnen zu identifizieren, die von neuen und maßgeschneiderteren Therapieansätzen profitieren könnten.

Laut McLeod handelt es sich bei einem Prognosefaktor um eine Variable, die Aufschlüsse über das Überleben gibt, die Resultate der (konventionellen) histopathologischen Untersuchung erweitert und der Therapieplanung nützt (15). Um zu eruieren, ob ein Parameter als Prognosefaktor geeignet ist, muss er unterschiedliche Voraussetzungen erfüllen. Besonders wichtig ist in diesem

Zusammenhang eine vom TNM-Stadium unabhängige Wertigkeit. Laut Richtlinien der European Group on Tumour Markers wird eine Auswertung in spezifischen Untergruppen empfohlen (116). Um nun als klinisch relevant eingestuft werden zu können, muss ein neuer Prognosefaktor verschiedene Anforderungen erfüllen, Duffy (117) gibt dazu folgende allgemeine Kriterien vor:

- 1) Der Faktor muss vom TNM-System unabhängig sein,
- 2) ein stärkerer Parameter für ein schlechteres Überleben sein und/oder
- 3) weitere prognostische Informationen zu den Subgruppen des TNM-Systems geben

Von verschiedenen Autoren wird die Berücksichtigung der klinischen Signifikanz eines neuen Prognosefaktors immer wieder hervorgehoben. Das College of American Pathologists (CAP) hat eine Aufgliederung der Prognosefaktoren in 3 Kategorien empfohlen (118). Diese Unterteilung wurde vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) abgewandelt und von Compton et al weiter ergänzt (33, 34). Sie sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Kategorie 1	In der Literatur fundiert untermauerte Faktoren, welche in der Therapie von PatientInnen berücksichtigt werden
Kategorie 2	Klinisch und/oder biologisch intensiv analysierte Faktoren: a: in klinischen Studien getestet b: biologische und Vergleichsstudien vorhanden, aber wenige klinische Outcomestudien
Kategorie 3	Weder Kriterien für Kategorie 1 noch für Kategorie 2 zutreffend
Kategorie 4	Faktoren, die gut untersucht wurden, aber keine prognostische Aussagekraft haben

Tab. 4 Kategorien von Prognosefaktoren (nach 33)

Eine Reihe konventioneller pathologischer Merkmale weisen beim KRK eine unabhängige prognostische Signifikanz auf (9). Als solche histologisch zu erfassenden Prädiktoren, die (wenngleich nicht ganz unumstritten) mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, gelten: Invasion lymphatischer und venöser Gefäße, perineurale Infiltration und eine (fokale) Dedifferenzierung im Bereich der

Invasionsfront. Mit einer signifikant besseren Überlebenschance ist hingegen eine lymphatische Infiltration des Tumors bzw. des peritumorösen Gewebes verbunden, wobei die Kriterien für die quantitative und qualitative Erfassung dieses Parameters in den verschiedenen Studien differieren (8, 10, 11). An dieser Stelle sind auch einzelne Studien zu erwähnen, die die Eosinophile als einen unabhängigen Parameter einer signifikant besseren Überlebenschance dokumentiert haben (113).

Zahlreiche molekulare Faktoren sind in den vergangenen Jahren in Hinblick auf ihre prognostische Aussagekraft beim KRK analysiert worden. Eine Auswahl ist im Folgenden dargestellt (9, 11):

Ki-ras, bcl-2, P21, c-myc, LOH 18q/DCC, MSI-H, LOH 1p, P27, LOH p53/17p, LOH 8p, BAX, Nm23-Gen, Thymidinphosphatase, Thymidilatsynthase.
--

Unter diesen molekularen Faktoren wurde in unterschiedlichen Studien für MSI-H, Thymidilatsynthase und LOH 18q/DCC eine unabhängige prognostische Relevanz (9, 11) nachgewiesen.

Jüngste Erfolge in der DNA-Microarray-Technologie haben zur Identifikation zahlreicher Tumor-assoziierten Gene geführt, unter ihnen ist „K homology domain containing protein overexpressed in cancer“ (KOC/L523S), auch bekannt als IMP3 (Insulin-like Growth Factor II mRNA-bindendes Protein 3). KOC ist ein onkofetales RNA-bindendes Protein bestehend aus 580 Aminosäuren, das vier K-Homologie-Domänen besitzt und durch ein 4.350-bp-mRNA-Transkript kodiert und vom *IGF2BP3*-Gen auf Chromosom 7p11.5 gebildet wird (62, 120). Während der Embryogenese steuert das 65–70-kDa-Protein die Transkripte des Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) und darüber hinaus wird es später in verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Tumoren, z.B. im Plattenepithelkarzinom der Lunge sowie im Adenokarzinom von Lunge und Pankreas, neu exprimiert (64, 63, 121, 122).

Seit seiner Entdeckung wurde die Rolle von KOC in der Karzinogenese intensiv *in vitro* und *in vivo* untersucht (62-65,67). Die zelluläre Wirkung von KOC ist folgende: KOC bindet an die Transkripte des IGF-II-Rezeptors und reguliert auf diesem Weg die IGF-Signaltransduktionskaskade. Weiterhin heftet sich KOC an die IGF-II binding protein mRNA und führt dadurch mittelbar zu erhöhter Zellproliferation

auf dem Boden einer ungehemmten IGF-II-Wirkung. Getriggert durch die Bindung von IGF-I oder IGF-II wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang getrieben, welche wiederum durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in eine gesteigerte Zellproliferation mündet (74, 85, 86).

Unter physiologischen Bedingungen wird KOC während der Embryogenese so gut wie in allen Geweben exprimiert und ist entscheidend am zellulären Wachstum beteiligt. Eine Loss-of-function-Analyse von KOC zeigte, dass das Molekül notwendig ist für Zelladhäsion und -fortbewegung (128). Gegen KOC gerichtete Antikörper führen in (adulten) nicht-neoplastischem Geweben zu einer spezifische Anfärbung; im Allgemeinen ist die Färbungsintensität jedoch schwach. Eine intensive Reaktivität zeigen Oozyten, Drüsenepithel des Magens sowie Plattenepithelzellen und Zellen der Keimzentren in den Tonsillen (62).

In zahlreichen Malignomen beobachtet man eine KOC mRNA-Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe (62, 63, 66). KOC wurde in den vergangenen Jahren dabei vor allem Hinblick auf seinen (differenzial)diagnostischen Wert untersucht. So wird KOC auch als molekularer Indikator für Malignität bezeichnet und besonders die Untersuchungen am Pankreas sind diesbezüglich viel versprechend: Beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas findet sich eine Überexpression im Tumorgewebe (im Vergleich mit Normalgewebe). Eine Untersuchung von Yantiss et al. hat darübergezeigt gezeigt, dass die Expression von KOC mit dem Tumorstadium linear korreliert ist (64). In anderen Neoplasien des Pankreas, wie z. B. endokrine Tumoren, seröse Zystadenome und solid-pseudopapilläre Tumoren, wurde einheitlich keine KOC-Immunreaktion gefunden (64). Bezogen auf das Pankreas scheint die Expression von KOC ein relativ spätes Ereignis in der neoplastischen Transformation duktaler Zellen zu sein. KOC hat sich somit als ein hochspezifischer und sensitiver Biomarker für das Pankreaskarzinom herausgestellt (62, 64).

Die Expression von KOC ist jedoch nicht auf pankreatische Adenokarzinome begrenzt. Eine Expression von KOC besteht weiters in Karzinomen des Magens, Kolons, der Lunge und auch in Weichteilsarkomen (62, 63, 66). Darüber hinaus wurde eine KOC mRNA-Expression in nicht-kleinzelligen Karzinomen der Lunge, in Kopf-Hals-Karzinomen, und zu einem geringeren Prozentsatz auch in Karzinomen der Leber und der Niere detektiert (64).

Beim konventionellen kolorektalen Adenokarzinom ist die Expression von KOC bislang nur wenig untersucht worden. Die klinische Signifikanz einer Expression

ist unklar. In unserem Patientenkollektiv wurde eine zytoplasmatische Expression von KOC in knapp 40% der Fälle beobachtet, in etwa der Hälfte dieser Fälle waren mehr als 50% der Tumorzellen spezifisch angefärbt. Eine statistische Assoziation bestand zwischen der Expression von KOC und der Tumordifferenzierung sowie der Tumorgroße. Ein Trend konnte im Hinblick auf eine Korrelation mit der lymphatischen Invasion verzeichnet werden. Keine Beziehung bestand zwischen der Expression von KOC und dem N-Status. Eine auffallende Diskrepanz ergab sich aber zwischen dem Färbeergebnis der Tumoren und ihren zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen.

Bei anderen Tumorentitäten widmeten sich einige Autoren der Assoziation der KOC-Expression mit konventionellen Tumorparametern. Bezüglich pankreatischer Neoplasien berichteten Yantiss et al (64) von einer signifikanten Beziehung zwischen der KOC-Expression und dem Tumorstadium. Weiters wurde festgehalten, dass die KOC-Expression bei praeinvasiven Läsionen (pankreatische intraepitheliale Neoplasie bzw. PanIN) mit dem Dysplasiegrad assoziiert war (64). Die derzeitige Literatur gibt keine Aufschlüsse über die prognostische Signifikanz einer KOC-Expression beim Pankreaskarzinom.

Bei Gallengangkarzinomen wurde keine statistisch signifikante Beziehung zwischen einer KOC-Expression und dem Tumorstadium gefunden. Dieses Ergebnis deckt sich mit unseren Befunden am KRK (133). Im Gegensatz zu unseren Daten wurde bei Gallengangkarzinomen aber auch keine Beziehung zur Tumordifferenzierung beobachtet (133).

Xu et al (70) untersuchten neuroendokrine pulmonale Tumoren in Hinblick auf eine Assoziation zwischen dem Grad der Differenzierung und dem Ausmaß der KOC-Expression. Ihre Ergebnisse zeigen dass KOC in gut differenzierten pulmonalen neuroendokrinen Karzinomen eine starke Expression aufweist, während es in mittelgradig bis niedrig-differenzierten Karzinomen nicht immunreaktiv ist. Die Beziehung zwischen der KOC-Expression und anderen Tumorparametern war nicht Gegenstand ihrer Untersuchung.

Pryor et al (119) berichten von einer schwachen positiven Assoziation zwischen dem Ausmaß der KOC-Expression und der Tumorgroße beim Merkelzellkarzinom: In dieser Studie fand sich eine signifikant stärkerere KOC-Expression bei Tumoren mit einer Größe über 1cm, verglichen mit Tumoren mit einer Größe unter 1cm (119). Allgemein wiesen die Merkelzellkarzinome ein ähnliches

Expressions-Muster wie high-grade neuroendokrine Karzinome der Lunge und extrapulmonale kleinzellige Karzinome auf. Die meisten der untersuchten Tumoren exprimierten KOC stark und diffus, was sich auch mit dem Expressionsmuster in high-grade neuroendokrinen Karzinomen deckt (68, 70).

Beim malignen Melanom zeigt sich ein Trend bezüglich einer Assoziation zwischen der KOC-Expression und dem Tumorstadium (125). Des Weiteren wird KOC signifikant häufiger in metastastischen Melanomen exprimiert (125). KOC ist somit beim malignen Melanom mit der Tumorphorogression assoziiert.

Bezogen auf das Nierenzellkarzinom zeigte die KOC-Expression eine signifikante Assoziation mit dem Tumorstadium und dem Tumordurchmesser, darüber hinaus fand sich eine signifikante Beziehung zum Differenzierungsgrad (69). In Nierenzellkarzinomen wird KOC als ein unabhängiger prognostischer Biomarker angesehen, der sowohl für die initiale Diagnosestellung als auch für die frühe Abschätzung des Metastasierungsrisikos herangezogen werden kann (68, 69). Eine zweite rezente Studie von Hoffmann et al (133) bestätigte die signifikante Beziehung zwischen dem Ausmaß der KOC-Expression und dem Tumorstadium und der Tumordifferenzierung. Des Weiteren wurde eine Assoziation auch mit einer regionalen Lymphknotenbeteiligung und dem Vorhandensein von Fernmetastasen nachgewiesen.

Eine Untersuchung von Jeng et al (129), die an über 300 Magenkarzinomen durchgeführt wurde, zeigte, dass die KOC-Expression eine Assoziation mit fortgeschrittenen Alter, großem Tumordurchmesser, tiefer Tumordinfiltration und positivem N-Status (129) aufweist. Darüber hinaus war eine KOC-Immunpositivität signifikant mit dem Tumorstadium assoziiert. Eine signifikante Beziehung zur Tumordifferenzierung wurde nicht nachgewiesen.

Eine immunhistochemische Analyse der KOC-Expression von Jeng et al (130) an 377 chirurgisch resezierten unifokalen hepatozellulären Karzinomen zeigte eine Korrelation mit hoher Alpha-Fetoprotein-Konzentration, einer Tumorgröße von >5cm, schlechter Differenzierung und hohem Tumorstadium.

In einer weiteren Studie von Slosar et al (134), die an follikulären Schilddrüsentumoren durchgeführt wurde, konnte keine signifikante Korrelation zwischen Tumorparametern und der KOC-Expression gefunden werden. KOC war in dieser Studie aber ein viel versprechender Antikörper in der differenzial-

diagnostischen Abgrenzung gutartiger und bösartiger Tumoren bzw. auch in der nosologischen Unterscheidung papillärer und follikulärer Malignome (134).

Beim Osteosarkom wurde KOC kürzlich von Do et al untersucht (135). Sie stellten eine Korrelation mit einem positiven M-Status fest. Darüber hinaus erwies sich KOC als unabhängiger Prognoseparameter in Bezug auf das Gesamtüberleben (135).

Beim Harnblasenkarzinom zeigte eine Untersuchung von Sitnikova et al (137) eine starke Assoziation mit dem Tumorstadium und der Tumordifferenzierung auf. Die Tumorgroße stand hingegen nicht in Zusammenhang mit einer KOC-Immunreaktivität (137).

Bezüglich des Vergleichs der KOC-Expression zwischen Primärtumor und zugehöriger Fernmetastase existieren bislang keine Arbeiten. Unsere Untersuchung war somit die erste, die auch Lymphknoten- und Fernmetastasen in die immunhistochemische Analyse miteinbezogen hat. Vergleichende Arbeiten sind notwendig, um die Signifikanz unserer Ergebnisse abschätzen zu können. Darüber hinaus muss geklärt werden, ob es sich bei der von uns beobachteten Diskrepanz zwischen dem Färbeergebnis der Primärtumoren und ihrer korrespondierenden Lymphknoten- und Fernmetastasen um einen echten biologischen Befund handelt, oder aber ob die von uns beobachteten Unterschiede in Zusammenhang mit der beobachteten intratumoralen Heterogenität stehen. Mit anderen Worten, die Befunddiskrepanz könnte bei ausgeprägter Heterogenität allein auf die von uns verwandte TMA-Methode zurückgehen; hier müssen ergänzende Färbungen an Großschnitten erfolgen.

Die fehlende Expression von KOC in normalem, reifen Gewebe und seine weitverbreitete Expression innerhalb eines weiten Spektrums von Malignomen macht KOC zu einer möglichen Zielstruktur biologischer Tumorthherapie. So beobachteten Liao et al. (67) *in vitro* eine reduzierte Proliferation von K562 Leukämie-Zellen nach siRNA Knockdown von KOC. Desweiteren postulierten Wang et al. (63), dass KOC in Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen der Lunge als ein mögliches zukünftiges Therapie-Target für eine Vakzine-Behandlung fungieren könnte, da sie eine durch KOC induzierte immunogene Antwort bei betroffenen PatientInnen beobachten konnten. Eine klinische Phase I Studie einer Immuntherapie, welche auf KOC in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen abzielt, wurde bereits durchgeführt (132). Alternative Therapieansätze ergeben sich vielleicht auch für eine Manipulation

am IGF-II-Rezeptor, über den KOC wirkt (102). Dies könnte eine therapeutische Basis in der Behandlung von vielen Malignomen sein, muss aber in der Zukunft noch genauer erforscht werden.

Darüber hinaus scheint es in Hinblick auf therapeutische Konzepte sinnvoll besonders Metastasen auf eine KOC-Immunreaktion zu testen. In diesem Zusammenhang sollte die Frage geklärt werden, ob vom Expressionmuster des Primärtumors auf das in der korrespondierenden Metastase geschlossen werden kann. Wenn dies der Fall sein sollte, könnte auf eine in vielen Fällen umständlich Biopsie der Metastase verzichtet werden. Auf die Problematik der in unserem Kollektiv beobachteten Befunddiskrepanz zwischen Primärtumoren und zugehörigen Metastasen wurde in der Diskussion oben bereits eingegangen; eine definitive Beurteilung ist diesbezüglich derzeit noch nicht möglich.

In unserem Patientenkollektiv zeigte die KOC-Expression keine Beziehung mit dem Patientenüberleben, dies betrifft sowohl das progressionsfreie als auch das krankheitsspezifische Überleben. Daten zum KRK finden sich in der Literatur diesbezüglich nicht, bei anderen Tumorentitäten wurde die prognostische Signifikanz von KOC jedoch untersucht. Unter ihnen ist das Nierenzellkarzinom. Hier wurde KOC als unabhängiger prognostischer Biomarker angesehen, der geeignet ist, betroffene PatientInnen für eine systemischen Therapie zu selektionieren (68, 69). Für das Magenkarzinom wurde ebenfalls eine prognostische Bedeutung nachgewiesen. So zeigten Jeng et al. (129) an über 300 Tumoren, dass die Expression von KOC ein unabhängiger Parameter für eine ungünstige Prognose darstellt. Auch in einer Studie an 377 chirurgisch resezierten unifokalen hepatozellulären Karzinomen war die Expression von KOC mit einem ungünstigen klinischen Verlauf hochsignifikant assoziiert (130). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass KOC eine wichtige Rolle in der Tumorinvasion und der Metastasierung von hepatozellulären Karzinomen spielt und die Expression im Tumorgewebe betroffener PatientInnen darüber hinaus einen starken prognostischen Faktor darstellt. Wie oben bereits angesprochen repräsentiert KOC auch beim malignen Melanom einen neuartigen Progressionsmarker, der eine wichtige Rolle im biologischen Verhalten dieses Tumors spielen könnte. Beim klarzelligen Typ des Ovarialkarzinoms hat sich KOC ebenfalls als ein neuer prognostischer Biomarker herausgestellt (136).

Die von uns am KRK gewonnenen Daten stehen somit im Widerspruch zu den Befunden an anderen Malignomen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass KOC beim kolorektalen Karzinom im Vergleich zu den anderen bislang untersuchten Malignomen tatsächlich keine prognostische Bedeutung aufweist. Hier sind weitere Studien (mit noch höherer PatientInnenzahl) erforderlich, um diese Fragestellung zu klären. Beim Studiendesign sollte darauf geachtet werden, dass die Anwendung von TMAs wegen der oben angesprochenen Heterogenität der Immunexpression möglicherweise nicht die ideale Methode darstellt. Eine immunhistochemische Färbung am Großschnitt sollte primär angestrebt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Hobday TJ, Erlichman C. Colorectal cancer. In: Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP et al. Prognostic factors in colorectal cancer. Wiley-Liss 2001; 267-280
2. Hauser H. Das Kolorektale Karzinom – Teil I: Epidemiologie, Präkanzerosen, Primär- und Sekundärprävention. J Gastroenterol Hepatol Erkr 2004; 6-11
3. Moeslein G/Schwab S. Encyclopedia of Cancer: Colon Cancer. Springer 2009; Verlag. 57-71
4. Fernandez E, Gallus S, La Vecchia C et al. Family history and environmental risk factors for colon cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2004 13:658-61
5. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, Fruit and Cancer Prevention: A Review. Journal of the American Dietetic Association 1996; 1027-39
6. Klimpfinger M, Hauser H, Hermanek P. Pathologie kolorektaler Präkanzerosen. Chirurgische Gastroenterologie 1992; 16-19
7. Otto HF. Kolon und Rektum. In:Böcker W, Denk H, Heitz PU. Pathologie. 2.Auflage 2000
8. Baldus SE. Klinisch-pathologische und molekulare Prognosefaktoren kolorektaler Karzinome. Pathologe 2003;24: 49-60
9. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? Dig Dis 1999; 67-79
10. Harrison JC, Dean PJ, El-Zeky F, Vander Zwaag R. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. 1994; Hum Pathol 498-505
11. Compton CC, Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. Mod Pathol 2003; 16:376-88
12. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. J Clin Pathol 2008; 61:561-569
13. Geißler M, Graeven U. Das kolorektale Karzinom. Thieme 2005; 1-4
14. Kahlenberg MS, Sullivan JM, Witmer DD, Petrelli NJ. Molecular prognostics in colorectal cancer. Surgical Oncology 2003; 12: 173-186
15. McLeod, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. British Journal of Cancer 1999; 79: 191-203

16. Chapuis HP, Dent OF, Fisher R, et al. A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer. *Br J Surg* 1985; 72:698-702
17. Newland R, Dent O, Lyttle M et al. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 1994; 73: 2076-82
18. Carlon C, Fabris G, Arslan-Pagnini C, et al. Prognostic correlations of operable carcinoma of the rectum. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 798-804
19. Talbot I, Ritchie S, Leighton MH, et al. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br J Surg* 1980; 67:439-442
20. Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, et al. Angiogenesis as an unfavourable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 78:226-231
21. Compton CC, Greene FL. The Staging of Colorectal Cancer: 2004 and Beyond. *Cancer J Clin* 2004; 54: 295-308
22. Goldstein NS, Hart J. Histologic features associated with lymph node metastasis in stage T1 and superficial T2 rectal adenocarcinomas in abdominoperineal resections. Identifying a subset of patients for whom treatment with adjuvant therapy or completion abdominoperineal resection should be considered after local excision. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 51-8
23. Thomas GHD, Dixon MG, Smeeton NC, Williams NS. Observer variation in the histological grading of rectal carcinoma. *J Clin Pathol* 1983; 36:385-91
24. Griffin M, Bergstralh, Coffey R, Beart RW, Melton LJ. Predictors of survival after curative resection of the colon and rectum. *Cancer* 1987; 60:2318-24
25. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1996; 83:46-50
26. Blenkinsopp W, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G, Fielding LP. Histopathology reporting in large bowel cancer. *J Clin Pathol* 1981; 34:509-513
27. Hase K, Shatney C, Johnson D, et al. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 627-635

28. Jass J, Atkin W, Cuzick J, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437–459
29. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, et al. An index for estimation the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989;63:539-43
30. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, et al. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1432-5
31. Zlobec I, Lugli A, Baker K, et al. Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol* 2007;212:260-8
32. Jass JR, Love SB, Northover JMA. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303–1306
33. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979–994.
34. Compton CC, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88: 1739–1757
35. Calaluce R, Miedema Bw, Yesus YW. Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *J Surg Oncol* 1998; 67:194-202
36. Tsavellas G, Patel H, Allen-Mersh TG. Detection and clinical significance of occult tumour cells in colorectal cancer. *Br J Surg* 2001; 88:1307-20
37. Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8: 539-47
38. Rüschoff J, Diemaier W, Bocker T et al. Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten? *Pathologe* 1998; 19:269-278
39. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767
40. Muller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002; 20:102-109

41. Fujita S, Moiya Y, Sugihara K, et al. Prognosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and the role of Japanese criteria for HNPCC. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:351-355
42. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996; 110:682-687
43. Rüschoff, J, Dietmaier W, Luttges J et al. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *Am J Pathol* 1997; 150:1815-25
44. Alexander J, Watanabe T, Wu TT et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158:527-535
45. Jass JR, Do KA, Simms LA et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; 42:673-79
46. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54:206-214
47. Grady WM, Rajput A, Myeroff L et al. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3101-04
48. Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG et al. Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: A study of the TGRbetall, BAX, hMSH3, hMSH6, IGR1IR and BLM genes. *Int J Cancer* 2000; 89: 230-235
49. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-876
50. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S et al. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; 31: 1506-14
51. Ilay M, Tomlinson IP, Novelli MR et al. Clinicopathological features and p53 expression in left-sided sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *J Pathol* 1996; 179:370-75
52. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:675-684

53. Haier J, Nasralla M, Nicolson GL. Cell surface molecules and their pronostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann Surg* 2000; 231:11-24
54. He TC, Sparks AB, Rago C et al. Identifikation of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-12
55. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:867-71
56. Lanza G, Matteuzzi M, Gafa, R et al. Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer. *In J Cancer* 1998; 79:390-95
57. Shibata D, Reale MA, Lavin P et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335:1727-32
58. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77:255-64
59. Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M et al. Evaluation of multiple biopathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer* 1999; 84:545-52
60. Manne U, Myers RB, Moron C et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74:346-358
61. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN et al. Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. *Int J Cancer* 2002; 99:597-602
62. Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, et al. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 1997; 14:2729-33
63. Wang T, Fan L, Watanabe Y, et al. L523S, an RNA-binding protein as a potential therapeutic target for lung cancer. *Br J Cancer* 2003; 88:887-894
64. Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR et al. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer) A novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesion of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:188-95
65. Zhang J, Chan EK. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinomas. *Autoimmun Rev* 2002; 1:146-153

66. Mueller F, Bommer M, Lacher U et al. KOC is a novel molecular indicator of malignancy. *Br J Cancer* 2003; 88:699-701
67. Liao B, Hu Y, Herrick DJ et al. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* 2005; 280:18517-24
68. Simon R, Bourne PA, Yang Q et al. Extrapulmonary small cell carcinomas express K homology domain containing protein overexpressed in cancer, but carcinoid tumors do not. *Human Pathol* 2007;38:1178-83
69. Jiang Z, Chu PG, Woda BA et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2006; 7:556-64
70. Xu H, Bourne P, Spaulding B, et al. High-grade neuroendocrine carcinomas of the lung express K homology domain containing protein overexpressin in cancer but carcinoid tumors do not. *Hum Pathol* 2007; 38:555-63
71. Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Moll Cell Biol* 1997; 17:2158-65
72. Peters G, Gongoll S, Langner C et al. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer. *Virchows Arch* 2003; 443:139-45
73. Coppola D, Ferber A Miura M et al. A functional IGF1 receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Moll Cell Biol* 1994; 14:4588-95
74. White MF, Kahn CR The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 269:1-4
75. Yu H, Rohan T Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 18:1472-89
76. Freier S, Weiss O, Flyvbjerg A et al. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut* 1999; 44:708-708
77. Guo YS, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. Characterization of insulin-like growth factor 1 receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 1992; 102:1101-08
78. Lahm H, Suardet L, Laurent PL et al. Growth regulation and costimulation of human colorectal cancer cell lines by insulin-like growth factor 1, 2 and transforming growth factor. *Br J Cancer* 1992; 65:341-46

79. Ferry RJ, Katz LEL, Grimberg A et al. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res* 1998; 31:192-202
80. Warren RS, Yuan H, Matti MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996; 27:29483-88
81. Barozzi C, Ravaioli M, D rrico A et al. Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma. *Cancer* 1995; 94:647-57
82. Baserga R. The insulin-like growth factor I: a key to tumor growth? *Cancer Res* 1995; 55:249-52
83. Liu B, Fang M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 2001; 20:1913-22
84. Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH. Insulin-like growth factor 1 modulated induction of apoptotic signalling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 1998; 139:1354-60
85. Kato H, Faria TN, Stannard B et al. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor. *J Biol Chem* 1993; 268:2655-61
86. Rubin R, Baserga R. Biology of disease: insulin-like growth factor 1 receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis and tumorigenicity. *Lab Invest* 1995; 73:311-31
87. Szepeshazi K, Schally AV, Groot K et al. Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit IGF-II production and growth of HT-29 human colon cancers. *Br J Cancer* 2000; 82:1724-31
88. Durai F, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int j Colorectal Dis* 2005; 20:203-220
89. Zhou R, Diehl D, Hoeflich A, Lahm H, Wolf E. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol* 2003; 178:177-93
90. Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 2002; 63:317-32

91. Grimberg A, Cohen P. Role of Insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2000; 183:1-9
92. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y et al. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12981-86
93. Peters U, Sinha R, Chatterjee N et al. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 2003; 361:1491-95
94. Palmqvist R, Stattin P, Rinaldi S et al. Plasma insulin, IGF-binding proteins-I and -2 and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Int J Cancer* 2003; 107:89-93
95. Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A et al. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1592-1600
96. Nomura AM, Stemmermann GN, Lee J, Pollak MN. Serum insulin-like growth factor I and subsequent risk of colorectal cancer among Japanese-American men. *Am J Epidemiol* 2003; 158:424-31
97. Teramukai S, Rohan T, Lee KY, Eguchi H, Oda T, Kono S. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding protein-3 and colorectal adenomas in Japanese men. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93:1187-94
98. Akagi Y, Liu W, Zerowski B, Xie K, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res* 1998; 58: 4008-14
99. Fukuda R, Hirota K, Fan F et al. Insulin-like growth factor I induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 38205-11
100. Collard TJ, Guy M, Butt AJ et al. Transcriptional upregulation of the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 by sodium butyrate increases IGF-independent apoptosis in human colonic adenoma-derived epithelial cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 393-401
101. Reinmuth N, Fan F, Liu W et al. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 2002; 82: 1377-89

102. Hassan AB, Macaulay VM. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 349-56
103. Reinmuth N, Liu W, Fan F et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3259-69
104. Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Human Pathol* 2003; 34: 803-8
105. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001; 131: 3109S-20S
106. Hakam A, Yeatman TJ, Lu L. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Human Pathol* 1999; 30: 1128-33
107. Guo YS, Jin GF, Townsend CM Jr et al. Insulin-like growth factor-II expression in carcinoma in colon cell lines: implications for autocrine actions. *J Am Coll Surg* 1995; 181:145-54
108. Weber MM, Fottner C, Liu SB et al. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 2002; 95:2086-95
109. Michell NP, Langman MJ, Eggo MC. Insulin-like growth factor and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *Br J Cancer* 1997; 76: 60-66
- 110 Bourdon J C. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 277-87
- 111 Shia j, Tang LH, Weiser MR. Is nonsmall cell type high-grade neuroendocrine carcinoma of the tubular gastrointestinal tract a distinct disease entity? *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 719-31
- 112 Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th ed. New York: Wiley-Liss inc., 2002
- 113 Fernandez-Acenero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88:1544-48
- 114 Köhne CH, D. Cunningham, CostanzoFD, Glimelius et al. Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracilbased treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients. *Ann Oncol* 2002; 13: 308-317

- 115 Thirion P, Cassano A, O'Dwyer PJ et al. Meta-analysis of alpha interferon plus 5-fluorouracil in advanced colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 244a
- 116 Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47:624-30
- 117 Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001; 38:225-62
- 118 Henson DE, Fielding LP, Grignon DJ et al. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Summary. Members of the Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med* 1995 119: 1109-12
- 119 Pryor JG, Simon RA, Bourne PA et al. Merkel cell carcinoma expresses K homology domain-containing protein overexpressed in cancer similar to other high-grade neuroendocrine carcinomas. *Human Pathology* 2009; 40: 238–243
- 120 Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J et al. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999;19: 1262–70
- 121 Mueller-Pillasch F, Pohl B, Wilda M et al. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. *Mech Dev* 1999; 88:95–9
- 122 Monk D, Bentley L, Beechey C et al. Characterisation of the growth regulating gene IMP3, a candidate for Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2002;39:575–81
- 123 Wang T, Hopkins D, Schmidt C et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene* 2000;19: 1519–28
- 124 Istvanic S, Fanger GR, Fraire AE, Khan A, Li C, Yantiss, RK. Spectrum of KOC (K Homology Domain Containing Protein Over-Expressed in Cancer) immunostaining among carcinomas of different sites. *Mod Pathol* 2005;18: 298A–9A
- 125 Pryor JG, Bourne PA, Yang O, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2008; 21: 431-7
- 126 Hanley KZ, Facik MS, Bourne PA, Yang O, Spaulding BO, Bonfiglio TA, Xu H. Utility of anti-L523S antibody in the diagnosis of benign and malignant serous effusions. *Cancer* 2008;114:49-56

- 127 Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumors of the Digestive System, Lyon: IARC Press, 2000:105-119
- 128 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7
- 129 Jeng YM, Wang TH, Lu SH, Yuan RH, Hsu HC. Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2009 96: 66-73
- 130 Jeng YM, Chang CC, Hu FC, Chou HY, Kao HL, Wang TH, Hsu HC. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 48:1118-27
- 131 Nemunaitis J, Meyers T, Senzer N, Cunningham C, West H, Vallieres E et al. Phase I trial of sequential administration of recombinant DNA and adenovirus expressing L523S protein in early stage non-small-cell lung cancer. *Mol Ther* 2006; 13: 1185–1191
- 132 Riener MO, Fritzsche FR, Clavien PA et al. IMP3 expression in lesions of the biliary tract: a marker for high-grade dysplasia and an independent prognostic factor in bile duct carcinomas. *Human Pathol* 2009; 19
- 133 Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, et al. External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2008;112:1471-9
- 134 Slosar M, Vohra P, Prasad M et al. Insulin-Like Growth Factor mRNA Binding Protein 3 (IMP3) is Differentially Expressed in Benign and Malignant Follicular Patterned Thyroid Tumors. *Endocr Pathol* 2009
- 135 Do SI, Kim YW, Park HR, Park YK. Expression of insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 (IMP3) in osteosarcoma. *Oncol Res*. 2008, 17: 269-72
- 136 Köbel M, Xu H, Bourne PA et al. IGF2BP3 (IMP3) expression is a marker of unfavorable prognosis in ovarian carcinoma of clear cell subtype. *Mod Pathol*. 2009; 22:469-75

137 Sitnikova L, Mendese G, Liu Q et al. IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. Clin Cancer Res 2008, 14:1701-6.

Lebenslauf

Name: Verena Sarah Pollheimer

Geburtsdatum: 21.10.1983

Geburtsort: Braunau/Inn

Schulausbildung:

1990-1994: Besuch der Volksschule Lochen

1994-1998: Besuch der Hauptschule Munderfing

1998-2002: Besuch des BORG Neurmarkt/Wallersee

Schulabschluss mit Matura

Studium:

09/ 2002 Beginn des Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Universität Graz

07/ 2003: Erste Diplomprüfung

2006-2008: Studienbegleitende, wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für
Pathologie Graz

07/2006: Kongressaufenthalt und Vortrag in Triest

04/2007: Beginn der Diplomarbeit: Analyse von „K homology domain containing
protein overexpressed in cancer“ (KOC/L523S) beim kolorektalen
Karzinom

02/2008: Kongressaufenthalt und Posterpräsentation in Berlin

07/2008: Kongressaufenthalt und Vortrag in Barcelona

09/2008: Kongressaufenthalt und Posterpräsentation in Graz

09/2008: Zweite Diplomprüfung

2008-2009: Praktisches Jahr am Univ. Klinikum Graz

Praktisches Jahr:

10 Wochen: Universitätsklinik für Innere Medizin, Abteilung für Rheumatologie (Graz)

5 Wochen: Allgemeinmedizinische Famulatur in der Lehrpraxis von Dr. med.
Ursula Miggitsch

5 Wochen: Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Abteilung für
Kinderkardiologie (Graz)

10 Wochen Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin (Graz)

Famulaturen:

Allgemeinen Inneren und Pulmologischen, Abteilung der Medizinischen
Universitätsklinik (Graz), Juli 2006

Allgemeine Radiologische Diagnostik, Magnetresonanz, Strahlentherapie,
Radioonkologie, Vaskuläre und Interventionelle Radiologie (Graz),
Februar 2007

Abteilung für Neurologie BHB (Linz), Juli/August 2007

Institut für Pathologie (Graz), Februar 2008

Spezielle Studienmodule:

Erkrankungen des Knochens und der Gelenke (Ao.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Hans
Dimai)

Case-based Learning in Klinik und Praxis (Univ.-Prof. Dr. med. univ. Josef Smolle)

Der Krebspatient im interdisziplinären Betreuungskonzept (Univ.-Prof. Dr.med.univ.
Karin S. Kapp)

Klinisch-topografische Anatomie der Eingeweide (O.Univ.-Prof. Dr.med.univ.
Friedrich Anderhuber)

Klinisch-topografische Anatomie der Extremitäten (O.Univ.-Prof. Dr.med.univ.
Friedrich Anderhuber)

Vertiefte Ausbildungen:

Innere Medizin (Univ.-Doz. Dr. Falko Skrabal)

Tumor- und Neurobiologie (O.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Helmut Tritthart)

Prognosefaktoren in der Tumorbologie (Univ. Doz. Dr. med. Cord Langner)

Chronobiologie und Chronomedizin (Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Maxillian Moser)

Magnetresonanz in der Neuroradiologie (Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.med.univ. Josef
Simbrunner)

Onkologische radiologische Fallbesprechung (O.Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. Rainer
Rienmueller)

Alpin- und Höhenmedizin (Ao.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Wolfgang Domej)

Entwicklungsneurologie (Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Christa Einspieler)

Pathophysiologie der Niere (Univ.-Prof. Dr.phil. Anton Sadjak)

Sprachen:

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Fließend (in Wort und Schrift)

Italienisch: Grundkenntnisse