

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Abteilung Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. M. Schwab**

**Immunhistochemische
Untersuchung zur Erythropoietin-Rezeptor-Expression
in humanen kolorektalen Karzinomen
und deren Korrelation mit dem Patienten-Überleben**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stephanie Ulrike Preschany
aus
Stuttgart Bad-Cannstatt**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bitzer

Für Rolf

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungen und Tabellen	v
1. Einleitung	1
2. Stand der Wissenschaft	3
2.1. Struktur des Epo-Moleküls und des Epo-Rezeptors	3
2.2. Mechanismen und Signalwirkung des Epo-Rezeptors	4
2.3. Therapeutischer Einsatz von Epo und seine Konsequenzen	6
2.4. Kolorektales Karzinom	8
3. Material und Methoden	12
3.1. Patienten und Gewebeproben	12
3.2. Studiendesign	13
3.3. Fixierung der Tumorproben	13
3.4. Statistische Auswertung	15
3.4.1 Auswertung der immunhistochemischen Epo-R-Färbung	15
3.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Epo-Färbung	16
3.4.3 Primäre und sekundäre Zielgrößen	16
3.4.4 Auswertungsstrategie	16
4. Ergebnisse	18
4.1. Patienten und klinische Daten	18
4.2. Epo-R- und Epo-Immunhistochemie	23
4.3. Prognostischer Wert der Epo-R- und Epo-Expression	26
5. Diskussion	29
6. Zusammenfassung	36

7. Literaturverzeichnis	vii
8. Danksagung	xvi
9. Lebenslauf	xvii

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
AUC	Area under the Curve
CEA	Karzino-embryonales Antigen
CIS-3	Cytokine-inducible SH2 Proteine 3
Epo	Erythropoietin
Epo-R	Erythropoietin-Rezeptor
Epo-R-Expression	Erythropoietin-Rezeptor-Expression
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
GRB2	Growth-Factor-Receptor-Binding Protein 2
HCP	Haematopoietic Cell Phosphatase
IRS	Immunoreactivity Score
JAK2	Janus Kinase 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAP/ERK-Kinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PBS	Peroxidase-Blocking Solution
PTP1C	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1C
rEpo	rekombinantes Epo
RAF-1	Rat Fibrosarcoma-1
Ras	Rat Sarcoma Oncogen
RBK	Robert-Bosch-Krankenhaus
rEpo	rekombinantes Epo
SD	Standardabweichung
SHC	SRC-homology and collagen
SHP1	Src-Homology Tyrosine Phosphatase 1
SOS-1	Son of Sevenless 1

STAT5	Signal Transducers and Activators of Transcription 5
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TNM	Tumor, Node, Metastasis
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1

Signaltransduktion über STAT-5 bei Bindung von Epo an seinen Rezeptor.

Abbildung 2

(a) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-R-Färbelevels in Tumormukosa. (b) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-R-Färbelevels in tumorfreier Mukosa. (c) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-Färbelevel in Tumormukosa. (d) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-Färbelevel in tumorfreier Mukosa.

Abbildung 3

(a) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und dem Stadium (Log-Rank = 41,2; $P < 0,000001$). (b) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und der Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen. Keine signifikante Korrelation zwischen der Epo-R-Expression und dem Gesamtüberleben. (c) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und der Epo-Expression in kolorektalen Karzinomen. Keine Korrelation zwischen der Epo-Expression und dem Gesamtüberleben.

Abbildung 4

(a) Epo-R-Expression in normaler Darmmukosa. (b) Kolorektales Adenokarzinom ohne Epo-Expression. (c) Kolorektales Adenokarzinom mit mittelstarker Epo-R-Expression. (d) Kolorektales Adenokarzinom mit starker Epo-R-Expression. (e) Tumorgewebe (kolorektales Adenokarzinom) innerhalb normaler Darmmukosa. (f) Kolorektales Adenokarzinom mit geringer Epo-Expression.

Tabelle 1

Alter der Studienpatienten und Follow-up-Dauer.

Tabelle 2

Konventionelle Prognosefaktoren der Studienpatienten (univariate Analyse).

Tabelle 3

Cox-Regressionsanalyse für eine multivariate Überlebensanalyse.

Tabelle 4

Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen und die univariate Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten.

Tabelle 5

Kolinearitätstest

Tabelle 6

Übersicht zu Studien, in denen an verschiedenen malignen Tumoren die Korrelation zwischen der Epo- bzw. Epo-R-Expression und dem Gesamtüberleben sowie dem Rezidiv-freien Überleben untersucht wurde.

1. Einleitung

Jährlich erkranken mehr als 420 000 Menschen neu an Krebs. Hierbei gehören kolorektale Karzinome weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Hinter Prostatakrebs beim Mann (48 650) und Brustkrebs bei Frauen (55 150) steht mit etwa 35 600 Neuerkrankungen bei Männern und 35 800 Neuerkrankungen bei Frauen Darmkrebs an zweiter Stelle der häufigsten Krebsarten in Deutschland (Layer, Kopp, Müller-Schimpfle, 2008). Er ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache.

Epo wird oft bei Krebspatienten mit Anämie eingesetzt, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass die Gabe von Epo den Hb-Wert signifikant erhöht, die Anzahl von Bluttransfusionen senkt und die Lebensqualität erhöht. Während viele Studien diese Erkenntnisse bestätigen, gibt es auch einige Studien, die den Vorteil einer Epo-Behandlung bei Tumorpatienten in Frage stellen (z.B. Bohlius et al., 2009). Epo wird unter anderem mit einem erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse, erhöhter Tumorprogression und Tumorangiogenese in Verbindung gebracht.

Die tumorfördernde Wirkung von Epo steht einigen Studien zufolge in Zusammenhang mit der in vielen Geweben nachgewiesenen Epo-Rezeptor-Expression. Diese Expression wurde nicht nur in blutbildenden Geweben wie Niere oder Knochenmark nachgewiesen, sondern auch in Tumorgeweben der Brust, Leber, Lunge etc. Wenn die Epo-R-Expression, wie in einigen Studien vermutet, tatsächlich Einfluss auf Tumorwachstum oder Tumorangiogenese hat, dann liegt es nahe deren Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten zu untersuchen. Bisher ist an kolorektalen Karzinomen dieser Zusammenhang nicht untersucht worden. Für diese Studie ergab sich deshalb folgende Fragestellung: Ist die Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert?

Liegt hier ein Zusammenhang vor, könnte die Epo-R-Expression nicht nur als Faktor für die Tumorprognose gelten, es müsste auch genau untersucht werden, ob eine Anämie-Behandlung mit Epo weiterhin sinnvoll wäre (vgl.

hierzu Denis und Lartigau, 2004). In Kapitel 2 wird ein Überblick über den aktuellen Stand der Wissenschaft hinsichtlich Epo, Epo-R und den therapeutischen Gebrauch von Epo gegeben.

Kapitel 3 beschäftigt sich mit Material und Vorgehensweise in der Studie, deren Ergebnisse in Kapitel 4 präsentiert und in Kapitel 5 diskutiert werden. Kapitel 6 stellt in der Zusammenfassung kurz Fragestellung, Ziel und Ergebnis der Studie dar. Das Literaturverzeichnis findet sich abschließend in Kapitel 7.

2. Stand der Wissenschaft

2.1. Struktur des Epo-Moleküls und des Epo-Rezeptors

Erythropoietin (Epo) ist ein Glykoprotein-Hormon mit einer Molekularmasse von 30400 Da. Es fungiert als wichtigster Regulator der Erythropoese durch Wachstumsstimulation, Unterdrückung der Apoptose und die induzierte Differenzierung der Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen (Lacomb und Mayeux, 1999).

Beim Menschen codiert die Epo-mRNA für ein Protein mit 193 Aminosäuren, von denen während der Reifung 27 abgetrennt werden. Daraus resultiert schließlich das reife Protein mit einer Struktur aus 166 Aminosäuren. Das Epo-Molekül beinhaltet zwei strukturstabilisierende Disulfid-Brücken zwischen den AS 7 und 161 sowie 29 und 33, deren Abbau einen Verlust der Bioaktivität bedeutet. Zusätzlich ist das Epo-Molekül an den Positionen 24, 38 und 83 N- und an Position 126 O-glykosyliert. Während der O-gebundene Zucker keine wichtige Funktion einnimmt, sind die N- gebundenen Zucker für die Stabilität des Epo-Moleküls im Blutkreislauf unerlässlich (Sasaki et al.; 2000; Mulcahy, 2001). Nicht-glykosyliertes Epo ist zwar biologisch aktiv, hat aber eine extrem kurze Halbwertszeit.

Epo wird vor allem in der Niere von peritubulären Zellen gebildet (Bachmann et al., 1993). Es findet sich allerdings, wie auch sein Rezeptor, in etlichen nicht blutbildenden Geweben und Zellen, so z. B. in der Leber, im Uterus und ZNS, in vaskulären Endothelzellen und soliden Tumoren (Farrell und Lee, 2004; Lappin, 2003; Lappin et al., 2002).

Der Epo-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Cytokin-Rezeptoren (Leyland-Jones, 2002). Zu dieser Familie gehören außerdem Rezeptoren anderer blutbildender Wachstumsfaktoren wie Wachstumshormone, Prolaktin, G-CSF, GM-CSF, Thrombopoietin, Onkostatine M und verschiedene Interleukine. Mehrere ausgeprägte Eigenschaften verbinden die Rezeptoren dieser Familie. Dazu gehören extrazelluläre, Liganden-bindende Domänen mit konservierten Cystein-Resten, ein konserviertes Motiv, WSXWS, das sich nahe der transmembranären Domäne befindet, ein einzelner transmembranärer Bereich

und eine intrazelluläre Domäne.

Die funktionelle Epo-R-Expression wurde in vielen nicht-blutbildenden Zelltypen gezeigt. Dazu gehören Gefäßendothelzellen (Anagnostou et al., 1994), glatte Muskelzellen (Ammarguella et al., 1996), Zellen der Skelettmuskulatur (Ogilvie et al., 2000), Myozyten der Herzmuskulatur (Parsa et al., 2004), Neurone (Nagai et al., 2001), retinale Photorezeptoren (Grimm et al., 2002), Stromazellen der Leber (Ohneda et al., 1993), Plazenta (Sawyer et al., 1998) und Niere (Westenfelder et al., 1999) sowie Makrophagen (Haroon et al., 2003). Epo-Rezeptoren können auf den Epo-produzierenden Zellen selbst (= autokrine Regulation) oder an Zellen eines benachbarten Gewebes (= parakrine Regulation) lokalisiert sein (Shingo et al., 2001). Die Epo-R-Expression und deren Signaltransduktion in blutbildenden Geweben sind entscheidend für die reguläre Erythropoese von Säugetieren (Wu et al., 1995).

2.2. Mechanismen und Signalwirkung des Epo-Rezeptors

Epo bindet an seinen Rezeptor und es kommt zur Homodimerisierung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Dadurch wird die Janus-Kinase 2 (JAK2), eine Tyrosinkinase, phosphoryliert und aktiviert (Remy et al., 1999; Witthuhn, 1993). JAK2 phosphoryliert anschließend Tyrosin-OH-Gruppen des Rezeptors und STAT5-Proteine. STAT5 dimerisiert und transloziert in den Kern. Dort bindet es an spezifische Regulations-Sequenzen und aktiviert die Transkription der Zielgene (siehe Abbildung 3) (Klingmüller et al., 1996).

Der zweite wichtige, durch Epo beeinflusste Signaltransduktionsweg ist der über das Ras-Onkogen. JAK2 phosphoryliert verschiedene intrazelluläre Proteine, darunter auch die intrazelluläre Domäne des Epo-Rezeptors.

Die Aktivierung des Ras-Signaltransduktionswegs beinhaltet:

Phosphorylierung von SRC-homology and collagen (SHC) (Tauchi et al., 1995; Barber et al., 2001), Komplexbildung von SHC mit Growth-Factor-Receptor-Binding Protein 2 (GRB2), Son of Sevenless 1 (SOS-1) und Rat Sarcoma Oncogen (Ras), Aktivierung von RAF-1, MAP/ERK-Kinase (MEK), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) und schließlich die Aktivierung der

Transkription (Klingmüller, 1997; Yoshimura et al., 1998; Constantinescu et al., 2001).

Die Signalübertragung des Epo-Rezeptors wird gehemmt durch Cytokine-inducible SH2 Protein 3 (CIS-3), das an den phosphorylierten Epo-Rezeptor und JAK2 bindet (Sasaki et al., 2000). Haematopoietic Cell Phosphatase (HCP) = Src-Homology Tyrosine Phosphatase 1 (SHP1) = Protein-Tyrosine Phosphatase 1 (PTP1C) bindet an den phosphorylierten Epo-Rezeptor, worauf der Rezeptor seine Konformation ändert und JAK2 dephosphoryliert wird. Haematopoietic Cell Phosphatase) HCP wirkt also als negativer Regulator auf die Epo-Signalkaskade (Klingmüller et al., 1995).

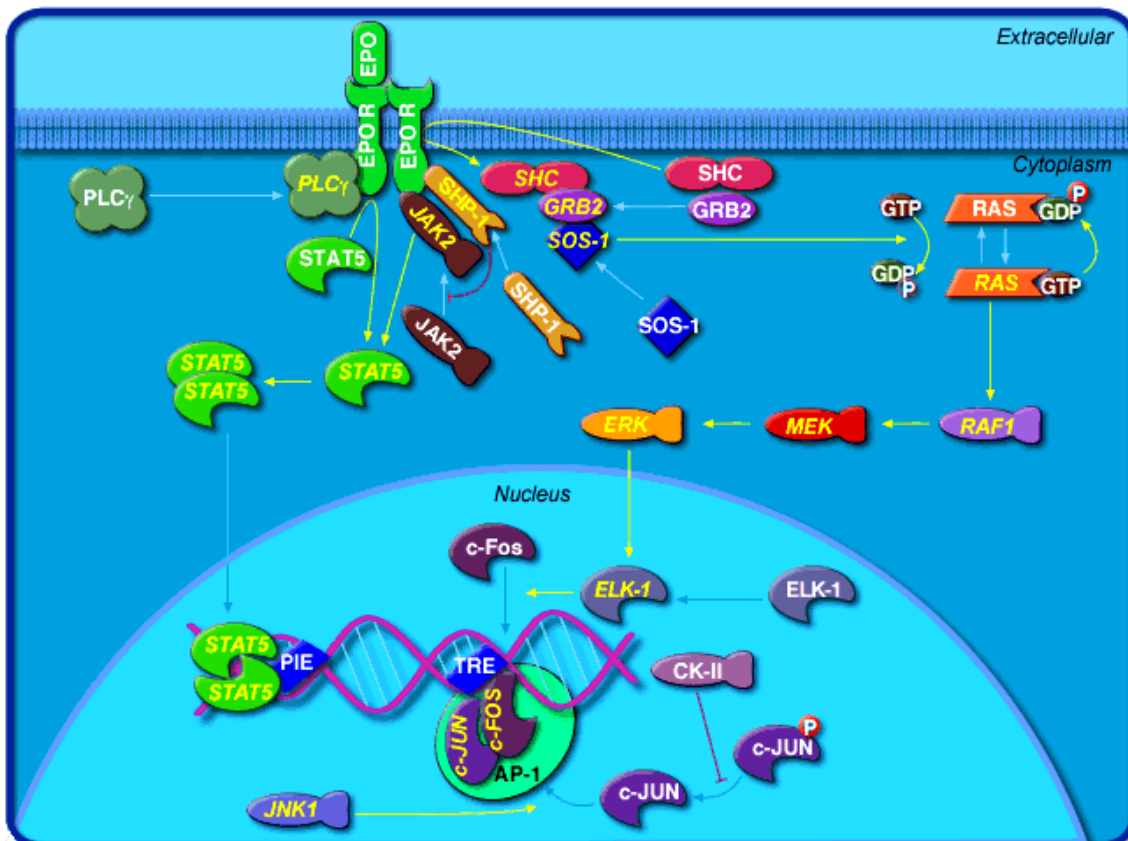


Abb. 1

Signaltransduktion über STAT-5 bei Bindung von Epo an seinen Rezeptor
 modifiziert nach Kosi Gramatikoff, PhD; BioCarta, www.BioCarta.com

2.3. Therapeutischer Einsatz von Epo und seine Konsequenzen

Während Epo nach seiner Einführung auf den Markt 1987 noch als „Wunderdroge“ in der Behandlung onkologischer Patienten galt, ist der therapeutische Einsatz von Epo bei Krebs mit begleitender Anämie heute umstritten, da sich Studien zur Sicherheit von Epo häufig widersprechen.

In einer randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Studie mit 375 chemotherapeutisch behandelten Krebspatienten mit Anämie, zeigte die Epoetin-alpha-Gruppe ein besseres 1-Jahres-Gesamtüberleben als die Placebogruppe (Littlewood et al., 2001; Dammacco et al., 2001; Abels, 1992). Zum gleichen Ergebnis kommt eine 2005 erschienene Meta-Analyse von 27 randomisierten kontrollierten Studien mit insgesamt 3287 Patienten, die einen leichten Trend zeigte, dass Epo eventuell das Gesamtüberleben verbessert (Bohlius et al., 2005).

Eine neuere Studie an Patienten mit Kopf- und Halskrebs zeigte wiederum, dass rekombinantes Epo (rEpo) zwar die Anämie bei Tumorpatienten ausglich, aber die Beherrschung der Erkrankung oder das Überleben nicht verbesserte (Henke et al., 2003).

Eine große multizentrische, doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte klinische Studie zeigte in der Epoetin-alpha-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe ein niedrigeres 1-Jahres-Gesamtüberleben (Leyland-Jones et al., 2005). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen weitere Studien, die eine verringerte Überlebenschance und erhöhte Tumorprogression bei Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe zeigte, die mit Epoetin alpha oder Epoetin beta behandelt wurden (Bohlius et al., 2006; Glaspy et al., 2004).

Einige präklinische Studien haben über direkte Effekte wie die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktion oder Stimulation der Proliferation oder Migration von rEpo auf Krebszellen berichtet. Andere wiederum fanden keine signifikanten Effekte von Epo-Epo-R auf die Tumorzellproliferation. In vaskulären Endothelzellen war die Epo-R-Expression mit der Fähigkeit von Epo assoziiert, intrazelluläre Signale zu stimulieren und angiogenetische Antworten in zahlreichen experimentellen Modellen zu fördern. Eine jüngst veröffentlichte

Studie berichtete, dass Epo in die pathologische Angiogenese der proliferativen diabetischen Retinopathie verwickelt ist (Hardee et al., 2006; Lester et al., 2005; LaMontagne et al., 2006; Feldmann et al., 2006; Gewirtz et al., 2006).

Obwohl die Rolle von Epo für die Tumor-Angiogenese bereits angedeutet wurde (Yasuda et al., 2001, 2002, 2003; Tovari et al., 2005), ist sein Potential als Zielfaktor und direkter pathogenetischer Faktor einer Tumorneovaskularisation nicht bewiesen.

Auch über die Auswirkungen der Epo-R-Expression in Tumorzellen und -geweben ist sich die Wissenschaft nicht einig. Eine Epo-R-Expression wurde in Tumorzelllinien und Tumorgewebe von Brust (Acs et al., 2001; Arcasoy et al., 2002; Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003), Niere (Westphal et al., 2002; Westenfelder et al., 2000), Colon (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003), Magen (Yasuda et al., 2003), Pankreas (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003), Prostata (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003; Feldman et al., 2006), weiblichen Geschlechtsorganen (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003; Acs et al., 2003; Yasuda et al., 2002; Yasuda et al., 2001), Leber (Westphal et al., 2002; Batra et al., 2003), Lunge (Yasuda et al., 2003), Gehirn (Westphal et al., 2002; Batra et al., 2003), von Melanozyten (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003; Selzer et al., 2000; Kumar et al., 2005), Kopf-Hals-Tumoren (Lai et al., 2005) und blutbildenden Neoplasien (Westphal et al., 2002; Yasuda et al., 2003) beschrieben.

In-vitro-Tests haben die Signalübertragung von Epo auf Epo-R mit der Modulation von Tumorproliferation (Acs et al., 2001; Westenfelder et al., 2000), Chemosensitivität (Carvalho et al., 2005) und Radiosensitivität (Pajonk et al., 2004) in Verbindung gebracht. Jüngste Studien deuten an, dass die Epo-R-Signalwirkung für die Tumorgenese von Brustkrebs wichtig sein könnte (Arcasoy et al., 2002) und Hypoxie-induzierte Apoptose in vitro verringert, wodurch die Aggressivität und Tumorprogression von Endometriumkarzinomen gesteigert wird (Acs et al., 2004). Zellzyklus-Analysen zeigten einen Abfall der in Apoptose gehenden Zellen und gleichzeitig einen Anstieg der Konzentration von rekombinantem Epo (Hardee et al., 2006).

Hardee et al. beobachteten außerdem, dass die Expression von aktivem Epo-

R129C (aktive Mutation auf Position 129 des Epo-Rezeptors) in Mammakarzinomzellen mit einer erhöhten angiogenetischen Antwort und erhöhtem Tumorwachstum einhergeht (Hardee et al., 2007).

2.4. Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Karzinome der Welt. In der Europäischen Union liegt es nach dem Mammakarzinom bei Frauen und dem Bronchialkarzinom bei Männern an zweiter Stelle (Heitkamp et al., 2001).

Die Inzidenz in Deutschland liegt bei ca. 25 pro 100 000 Einwohner pro Jahr, mit einem Häufigkeitsanstieg ab dem 40. Lebensjahr. Ab dem 8. Lebensjahrzehnt liegt die Inzidenz sogar bei 400 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Vor allem in den westlichen Industriestaaten tritt das kolorektale Karzinom häufig auf, während es in den so genannten Entwicklungsländern eher selten ist. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist bei ca. 25 % der Patienten das Karzinom bereits metastasiert. Klinische Beschwerden sind vor allem Müdigkeit, Schwäche und Leistungsabfall infolge der Tumoranämie. Gastrointestinale Symptome wie okkulte Blutverluste (Lokalisation: proximales Kolon), Änderung der Stuhlgewohnheiten, Hämatochezie (Lokalisation: distales Kolon) treten erst sehr spät auf.

Zu etwa 60 % findet sich das kolorektale Karzinom im Rektum, zu ca. 20 % im Sigma, zu ca. 10 % im Zäkum/Colon ascendens und zu weiteren ca. 10% im übrigen Kolon. Eine Ausbreitung erfolgt einerseits kontinuierlich vor allem in oraler Richtung (Infiltration der Blase, der Ureteren, der Prostata, des Uterus und der Ovarien durch das Rektumkarzinom), andererseits durch lymphogene Metastasierung. Die Metastasierung läuft über drei Wege: zu den paraaortalen Lymphknoten (LK) (hoch sitzende Karzinome), zusätzlich lateral in die Becken-LK (in der mittleren Etage sitzende Karzinome) und zusätzlich in die inguinalen LK (tief sitzende Karzinome, diese haben die schlechteste Prognose). Außerdem kann eine hämatogene Ausbreitung stattfinden, die vor allem in die Leber erfolgt. Von dort kommt es dann sekundär zu einer Metastasierung in die Lunge.

95 % der Karzinome sind Adenokarzinome, 5 % gehören zu den

Plattenepithelkarzinomen des Analkanals, zu Leiomyosarkomen, malignen Karzinoiden, malignen Melanomen sowie Kaposi-Sarkomen des Gastrointestinal-Trakts bei AIDS.

Umweltfaktoren spielen bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms eine entscheidende Rolle. Es gibt eine Reihe von epidemiologischen Studien, die zeigen, dass sich das Risiko umweltabhängig ändert (Whittemore et al, 1990).

Genetische Faktoren (Adenom-Karzinom-Sequenz) sind für zwei Sonderformen des

Kolonkarzinoms nachgewiesen. Für die Polyposis-Syndrome (FAP = familiäre adenomatöse Polypose) und für eine seltene, autosomal-dominant vererbte Sonderform des Kolonkarzinoms (sogenanntes Lynch-Syndrom bzw. HNPCC = Hereditary non-polyposis colorectal cancer). Das relative und absolute Risiko für Patienten mit juveniler Polyposis wurde nun erstmals von amerikanischen Wissenschaftlern untersucht, die mit Hilfe einer Personen-Jahr-Analyse die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bei Patienten mit juveniler Polyposis mit der normalen Population verglichen. Man kam zu dem Ergebnis, dass Patienten mit juveniler Polyposis ein deutlich erhöhtes relatives und absolutes Risiko haben, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, so dass bereits in jungen Jahren eine engmaschige Überwachung und Kontrolle erforderlich ist (Brosens et al., 2007).

Zu den aktuell bekannten Risikofaktoren gehören Alter (steigende Inzidenz ab dem 40. Lebensjahr), kolorektale Adenome, kolorektale Karzinome in der Familienanamnese (laut Kato et al. bei mindestens 10% der Patienten; Kato et al., 1990), anderen Autoren zufolge bei mindestens 25% (Heitkamp et al., 2001)), Colitis ulcerosa und die Familiäre Adenopolyposis coli (Karzinomrisiko 100 %).

Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, zu fetthaltige Kost, fehlende körperliche Aktivität, regelmäßiger Alkoholkonsum (>45 g pro Tag 1,5faches Risiko), Ruhr, Lymphgranuloma inguinale und intestinale Schistosomiasis (Müller, Chirurgie für Studium und Praxis).

Die Klassifikation des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach Dukes (A-D) und dem TNM-System. Zu den diagnostischen Möglichkeiten gehören die

körperliche Untersuchung, der Nachweis von okkultem Blut, die Koloskopie, transrektale Sonographie und CT. Der Tumormarker CEA (karzino-embryonales Antigen) ist zur Primärdiagnostik nicht geeignet, da CEA im Frühstadium oft nicht exprimiert wird und wird deshalb vor allem zur Verlaufskontrolle verwendet.

Die chirurgische Therapie ist bis heute der Goldstandard. Je nach Lokalisation wird eine radikale Resektion des Tumors durchgeführt, bei Rektumkarzinomen wird nur dann kein Kolostoma angelegt, wenn der Tumor mindestens 2 cm vom Anus entfernt reseziert werden kann. Strahlen- und Chemotherapie wird in der Regel erst ab einem

Stadium Dukes C postoperativ durchgeführt. Bei Rektumkarzinomen kann im Stadium Dukes B und C die Überlebensrate mit kombinierter Strahlen- und Chemotherapie erhöht werden.

Prognostisch ist eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 55% bei allen kolorektalen Karzinomen zu nennen. Je nach Stadium variiert die 5-JÜR zwischen 80% im Stadium T₁₋₂ und 5-20% bei Fernmetastasen.

Nachsorgeprogramme sollen das Risiko für ein Tumorrezidiv verringern und finden deshalb postoperativ zwei Jahre lang statt. Vierteljährlich wird auf okkultes Blut kontrolliert, CEA überprüft, die Leber sonographiert, ein Röntgen-Thorax und eine Koloskopie (nach 6 – 12 Monaten) durchgeführt.

Zur Prophylaxe des kolorektalen Karzinoms wird für Erwachsene ab dem 50. Lebensjahr eine Vorsorgeuntersuchung empfohlen, die Anamnese, digitale rektale Untersuchung und fäkal-okkulten Bluttest einschließt. Einige Studien deuten an, dass die Koloskopie hinsichtlich Effektivität, Kosten und Compliance als Screeningmethode am besten geeignet sei (z. B. Vijan et al., 2001).

Eine Koloskopie wird ab dem 55. Lebensjahr durchgeführt und muss nach unauffälligem Ergebnis erst nach 10 Jahren erneut stattfinden. Bei Entdeckung von adenomatösen Polypen oder Polypen in der Anamnese sollte die Koloskopie alle 3 Jahre stattfinden. Liegt eine Veranlagung für HNPCC (Hereditary non-polyposis colorectal cancer) vor oder leidet der Patient an FAP (familiäre adenomatöse Polypose) sollte die Koloskopie ab dem 25. Lebensjahr bzw. ab dem 10. Lebensjahr jährlich erfolgen und bei FAP zusätzlich eine

prophylaktische Proktokolektomie im Alter von 18 – 22 Jahren erfolgen.

Zur Prophylaxe gehört außerdem die Aufklärung über sämtliche oben genannten Risikofaktoren und deren Vermeidung. In einer Arbeit von Heitkamp et al. 2001 wurden Studien der letzten 15 Jahre analysiert, die sich mit dem Zusammenhang zwischen der Inzidenz kolorektaler Karzinome und körperlicher Aktivität befassen um zu klären, ob diese zur Prävention geeignet ist. Hier erschien der Zusammenhang von körperlicher Aktivität und Karzinomerkrankungen am wahrscheinlichsten beim Kolonkarzinom und weniger beim Rektumkarzinom. Trotz diverser Einschränkungen, die es bei den verschiedenen analysierten Studien gab, war das Ergebnis so deutlich, dass körperliche Aktivität zur Prävention empfohlen werden konnte (Dt Ärztebl 2001;98:A 612-18[Heft 10]).

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Gewebeproben

Die 450 Gewebeproben der Studie wurden von der Abteilung für Klinische Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses (RBK) Stuttgart zur Verfügung gestellt.

Die Abteilung verfügt über eine Sammlung von ca. 946 Gewebeproben aus primären kolorektalen Karzinomen von Patienten, die zwischen 1987 und 1997 am RBK konsekutiv operiert wurden. In der dazugehörigen Datenbank sind außerdem das Tumor-Stadium und die Überlebenszeit des Patienten (Follow-up) eingetragen. Keiner der Patienten wurde mit Chemo- oder Radiotherapie vorbehandelt keiner erhielt rekombinantes Epo. 520 der 946 Patienten (55,0%) wurden aus folgenden Gründen ausgeschlossen: (I) Fehlendes Follow-up oder unvollständige Daten (n=113), (II) kein Tumor im Gewebeblock (n=27), (III) fehlende gesunde Mucosa im Untersuchungspräparat (n=273), (IV) fehlende archivierte Gewebelöcke oder nicht verwertbares Tumormaterial (n=107). Die klinischen Daten wurden den entsprechenden Arztbriefen und den Berichten der Abteilung für Klinische Pathologie entnommen.

Sämtliche Arten von kolorektalen Karzinomen wurden in die Studie eingeschlossen: Adenokarzinome (undifferenziert), muzinöse Adenokarzinome, Siegelzellkarzinome, squamöse Karzinome und Basalzellkarzinome. Im Falle der Adenokarzinome wurde eine Unterklassifikation gemacht und Adenokarzinome mit mehr als 50% Drüsengewebe, das extrazellulären Mukus produziert, wurden als muzinöses Adenokarzinom klassifiziert.

Das Patientenüberleben wurde ab dem Zeitpunkt des operativen Eingriffs bis zum Tod der Patienten erfasst. Patienten, die aufgrund der Tumorerkrankung oder unbekannter Ursachen verstarben, wurden als tot gewertet. Patienten, die nicht am Tumor sondern anderer Ursachen wegen verstarben, wurden als Überlebende mit einer Überlebenszeit vom Zeitpunkt des operativen Eingriffs bis zum Tod gewertet.

Das durchschnittliche Follow-up aller Patienten betrug $49,5 \pm 52,9$ (SD) Monate (Median: 24,5 Monate). Das durchschnittliche Follow-up der Überlebenden

betrug $58,0 \pm 56,7$ (SD) Monate (Median: 44,4 Monate). Die Überlebenszeit für Nicht-Überlebende betrug $32,1 \pm 39,0$ (SD) Monate (Median: 16,2 Monate).

Alle Gewebeschnitte und die damit verbundenen Daten wurden in anonymer Form und ohne Kenntnis individueller Daten ausgewertet.

3.2. Studiendesign

Die Studie wurde als retrospektive Kohortenstudie mit immunhistochemischen Färbungen durchgeführt.

3.3. Fixierung der Tumorproben

Alle Gewebeschnitte wurden direkt nach der operativen Entfernung in vierprozentigem Formalin fixiert. In den ersten Jahren (vor 1993) wurde ungepuffertes Formalin verwendet, ab 1993 verwendete man gepuffertes Formalin.

Eine durch Fixation oder Lagerungszeit entstandene Verzerrung der Ergebnisse wurde durch einen Vergleich von Fällen vor und nach 1993 in Bezug auf Epo-R- und Epo-Expression ausgeschlossen.

Epo-R/Epo-Immunhistochemie

Die Hämatoxylin-Eosin-Schnitte wurden nach der Formalin-Fixierung (24-72 h) durchgeführt. Um Epo-R sichtbar zu machen, wurde ein hochspezifischer polyklonaler Kaninchen-Antikörper (sc-695; Verdünnung 1:50 Santa-Cruz, Heidelberg, Deutschland) verwendet (Acs et al., 2001). Für Epo benutzte man einen hochspezifischen monoklonalen Maus-Antikörper (4297-5005; Verdünnung 1:200 Biotrend, Köln, Deutschland) (Sue et al., 1983).

Die Immunfärbung wurde mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode wie unten beschrieben durchgeführt (Hsu et al., 1981).

Nach Blockierung der endogenen Peroxidase durch H_2O_2 /Methanol wurden die Objektträger über Nacht mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Ein zweiter Anti-Kaninchen-Antikörper (K5007; Dako, Hamburg, Deutschland) wurde in

einer Verdünnung von 1:10 000 verwendet. Um den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex sichtbar zu machen, benutzte man ein Dextran-Polymer, gekoppelt mit Peroxidase, was eine dunkelbraune Färbung ergab.

Um die Epo-R-/Epo-Expression durch die Immunhistochemie zu quantifizieren, wurde das REAL™EnVision™System (Dako, Hamburg, Deutschland) nach vorgegebenem Protokoll verwendet (siehe Kasten 1).

Um die Spezifität der Immunfärbungen zu testen, wurden folgende Kontrollversuche durchgeführt:

- (i) Weglassen des primären Antikörpers;
- (ii) Weglassen des sekundären Antikörpers;
- (iii) Weglassen des Peroxidase-Blockier-Mediums;
- (iv) Weglassen von (i), (ii) und (iii).

In keinem der Fälle konnte eine Färbung beobachtet werden. Zur positiven Kontrolle wurde eine intestinale Metaplasie und normales Nierengewebe verwendet, was zu ähnliche Ergebnissen führte.

Kasten 1: Durchführungsprotokoll der immunhistochemischen Färbungen

Durchführung

- zur Epitopdemaskierung Paraffinschnitte (1:10 verdünnt mit ChemMate™ Target Retrieval Solution) 30 min in Microclear (Fa. Vogel, Deutschland) inkubieren
- mit absteigender Alkoholreihe (100, 96, 70% EtOH) Microclear je 5 min auswaschen
- spülen in TBS-Puffer ("tris buffered saline tween" 80) + 0,1% Tween (80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris) in 800 ml aqua dest. auflösen, auf 1 l auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
- Gebrauchslösung 1:10 verdünnt in aqua dest + 0,1% Tween 80 (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua dest. + 1 ml Tween 80)

Vorbehandlung

- Vorbehandlungspuffer pH 6 (Dako BioTek Solutions, USA) 20 min im Gartopf vorwärmen
- Schnitte 30 min im Gartopf inkubieren und anschließend 20 min abkühlen lassen
- alle Objektträger 3 mal in TBST spülen
- pro Schnitt 100 µl Peroxidase-Blocking (H₂O₂/Methanol) (Fa. DAKO BioTek Solutions, USA) auftragen und 5 min inkubieren

- spülen in aqua dest. und 5 min in TBST stellen und spülen
- pro Schnitt 100 µl Epo-R rabbit polyclonal antibody (verdünnt 1:50) (sc-695, Fa. Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) 30 min inkubieren
- in aqua dest. spülen und 5 min in TBST stellen und spülen
- rabbit antibody (1:10 000) 30 min inkubieren
- mit aqua dest. spülen und 5 min in TBST stellen und spülen
- Substrat Chromogen (auf 1 ml Substrat Puffer 1 Tropfen Chromogen) 10 min
- wässern 5 min
- mit filtriertem Hämalaun gegenfärben
- wässern 5 min
- mit aufsteigender Alkoholreihe (70, 96, 100% EtOH) je 5 min entwässern
- MikrocLEAR 5 min (Entparaffinisierung)
- eindecken der Schnitte mit Gurr DePeX Mounting Medium (Fa. BDH, USA)

3.4. Statistische Auswertung

3.4.1. Auswertung der immunhistochemischen Epo-R-Färbung

426 immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte wurden mit den Transmissionslichtmikroskopen Leica Orthoplan (Fa. Leica, Deutschland) und Leica DM2000 (Fa. Leica, Deutschland) von zwei Untersuchern ausgewertet, die bezüglich der Patientendaten und der Ergebnisse des jeweilig anderen verblindet waren. Die Auswertung der Epo-R-Expression in den epithelialen Tumorzellen wurde, leicht verändert, nach einer Methode von Remmele und Stegner (1987) durchgeführt. Die Intensität der Färbung (intensity of staining) wurde mit 0 (negativ) (Abbildung 4b), 1 (wenig) (Abbildung 4c), 2 (mittel) und 3 (stark) (Abbildung 4d) beschrieben, das Ausmaß der Färbung (extent of staining) als Anteil positiv gefärbten Tumorgewebes in Prozent (0-100%).

Der Epo-R-Immunreactivity-Score (IRS-Epo-R) von 0-300 wurde durch Multiplikation des Intensity-Scores (0-3) und der Extent-Percentage (0-100) berechnet. Sämtliche Bewertungen und mögliche Cut-off-Punkte für IRS-Epo-R (Tabelle 4) wurden analysiert um den Zusammenhang zwischen Epo-R-positivem und Epo-R-negativem Tumorgewebe und der Patientenüberlebenszeit zu untersuchen.

3.4.2. Auswertung der immunhistochemischen Epo-Färbung

Zur Beurteilung der 426 Gewebeschnitte wurde wieder ein Transmissionslichtmikroskop Leica Orthoplan (Fa. Leica, Deutschland) verwendet und zwei Untersucher werteten ohne Angaben zu Patienten und Ergebnis des anderen aus. Intensität und Ausmaß der Epo-Färbung sowohl im Tumorgewebe wie auch in der gesunden Mucosa wurden mit 0 (negativ), (+) (grenzwertig), + (schwach) (Abbildung 4f), ++ (mittel) bzw. +++ (stark) bezeichnet.

3.4.3. Primäre und sekundäre Zielgrößen

Als primäre Zielgröße wurde die Korrelation zwischen IRS-Epo-R und der Überlebenszeit [Monate] in Abhängigkeit vom Tumorstadium der Patienten (Stadium I-IV bzw. Dukes A-D) untersucht.

Als sekundäre Zielgrößen wurden einerseits Lokalisation und Intensität der Epo-Expression im Tumorgewebe, sowie der intraindividuelle Vergleich der Epo-R- und Epo-Expression zwischen Tumorgewebe und gesunder Mucosa ausgewertet.

3.4.4. Auswertungsstrategie

Die vorliegenden Daten wurden mit Hilfe des Statistik-Software-Programms SPSS (SPSS Software GmbH, München, Deutschland) bewertet.

Der Vergleich der einbezogenen und ausgeschlossenen Patienten bezüglich aller interessierender Merkmale (Geschlecht, Alter, Tumorstadium, TNM-Klassifikation, Grading, Tumorlokalisierung) wurde mit dem n*k-Kruskal-Wallis-Test vorgenommen, um eine Verzerrung durch Selektion auszuschließen.

Mit der Kaplan-Meier-Methode für univariate Überlebenszeit-Analysen und dem Cox-Regressionsmodell für multivariate Analysen wurde die Analyse der Überlebenszeit durchgeführt.

Überlebenszeitkurven wurden in Übereinstimmung mit der Kaplan-Meier-Methode erstellt und Vergleiche zwischen den einzelnen Kurven mit dem Log-Rank-Test durchgeführt. Die Berechnung des Gesamtüberlebens erfolgte vom Operationsdatum bis zum Tod oder zum Datum des letzten Patientenkontakts.

Das rezidivfreie Überleben wurde vom Operationsdatum bis zum Rezidiv, zum krebisbedingten Tod oder zum letzten Kontakt gemessen. Die multivariaten Analysen wurden mit der Cox-Regressions-Analyse durchgeführt.

Die Annahme proportionaler Risiken im Cox-Modell wurde für jeden prognostischen Faktor verifiziert. Alle p-Werte waren zweiseitig und Werte kleiner 0.05 wurden für sämtliche Parameter als signifikant betrachtet.

Die Inter- und Intraobserver-Variability wurde mit linearen Korrelationsanalysen errechnet, dabei werden r-Werte von 0,2 bis 0,4 als „ausreichend“, Werte von 0,4 bis 0,6 als „mäßig“ und Werte über 0,6 als „ausgezeichnet“ bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Patienten und klinische Daten

Einbezogene (n = 426) und ausgeschlossene (n = 520) Patienten unterschieden sich im Hinblick auf Durchschnittsalter, Tumorstadium, TNM-Klassifikation, Grading und Tumorlokalisierung nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

In dieser Studie betrug das Durchschnittsalter der einbezogenen Patienten 68,5 Jahre, der jüngste Patient war 30,9 Jahre, der älteste 100,7 Jahre alt. Die Überlebenszeit der Patienten (Follow-up) zeigte einen Mittelwert von 49,7 Monaten.

Tabelle 1: Alter der Studienpatienten und Follow-up-Dauer.

Variable	Mittelwert	Standard-abweichung	Median	Range
Alter	68,56 Jahre	11,36	69,09 Jahre	30,91-100,77
Follow-up	49,7 Monate	52,09	24,7 Monate	0-178,06

Die Prognosefaktoren der Studienpopulation finden sich in Tabelle 2. Die Überlebensrate der Patienten in Bezug auf das Tumorstadium der kolorektalen Karzinome (I – IV) sank im Verlauf von zehn Jahren signifikant.

Konventionelle Prognosefaktoren wie Alter, Tumorstadium (Abb. 3 (a)), TNM-Klassifikation, Lymphknoten, Metastasierung und Grading waren in der univariaten Kaplan Meier-Analyse erwartungsgemäß signifikant, während Geschlecht, Histologie (muzinös bzw. nicht-muzinös) und Lokalisation (rektal bzw. nicht-rektal) keine Signifikanz zeigten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Konventionelle Prognosefaktoren der Studienpatienten (univariate Analyse).

Variable	N	Fehlende Werte	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit in Prozent	Log rank	p*
<i>Geschlecht</i>	425	1			1,5	0,219
Männlich			201	47,3		
Weiblich			224	52,7		
<i>Alter</i>	425	1			6,5	0,011
Mittelwert: 68,6 Jahre						
Mittelwert: 69,1 Jahre						
SD: 11,4						
Jahre			217	51,1		
<Median (68,6 Jahre)			208	48,9		
>Median (68,6 Jahre)						
<i>Stadium</i>	415	11			43,1	<0,00001
I			125	30,1		
II			120	28,9		
III			152	36,6		
IV			18	4,3		
<i>pT</i>	416	10			29,69	<0,00001
T ₁			25	6,0		
T ₂			130	31,3		
T ₃			233	56,0		
T ₄			28	6,7		
<i>pN</i>	417	9			69,0	<0,00001
N ₀			253	60,67		
N ₁			115	27,6		
N ₂			49	11,8		
<i>pM</i>	414	12			5,3	0,0208
M ₀			396	95,7		

M ₁			18	4,3		
Grading	412	14			11,5	0,0032
G ₁			33	8,0		
G ₂			293	71,1		
G ₃			86	20,9		
Histologie	423	3			0,4	0,51
muzinös			57	13,5		
nicht-muzinös			366	86,5		
Lokalisation	407	19			0,4	0,53
rektal			130	31,9		
nicht-rektal			277	68,1		

* Der p-Wert zeigt die Signifikanz der Log-Rank-Statistik für die Unterschiede in der Überlebensverteilung an. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$.

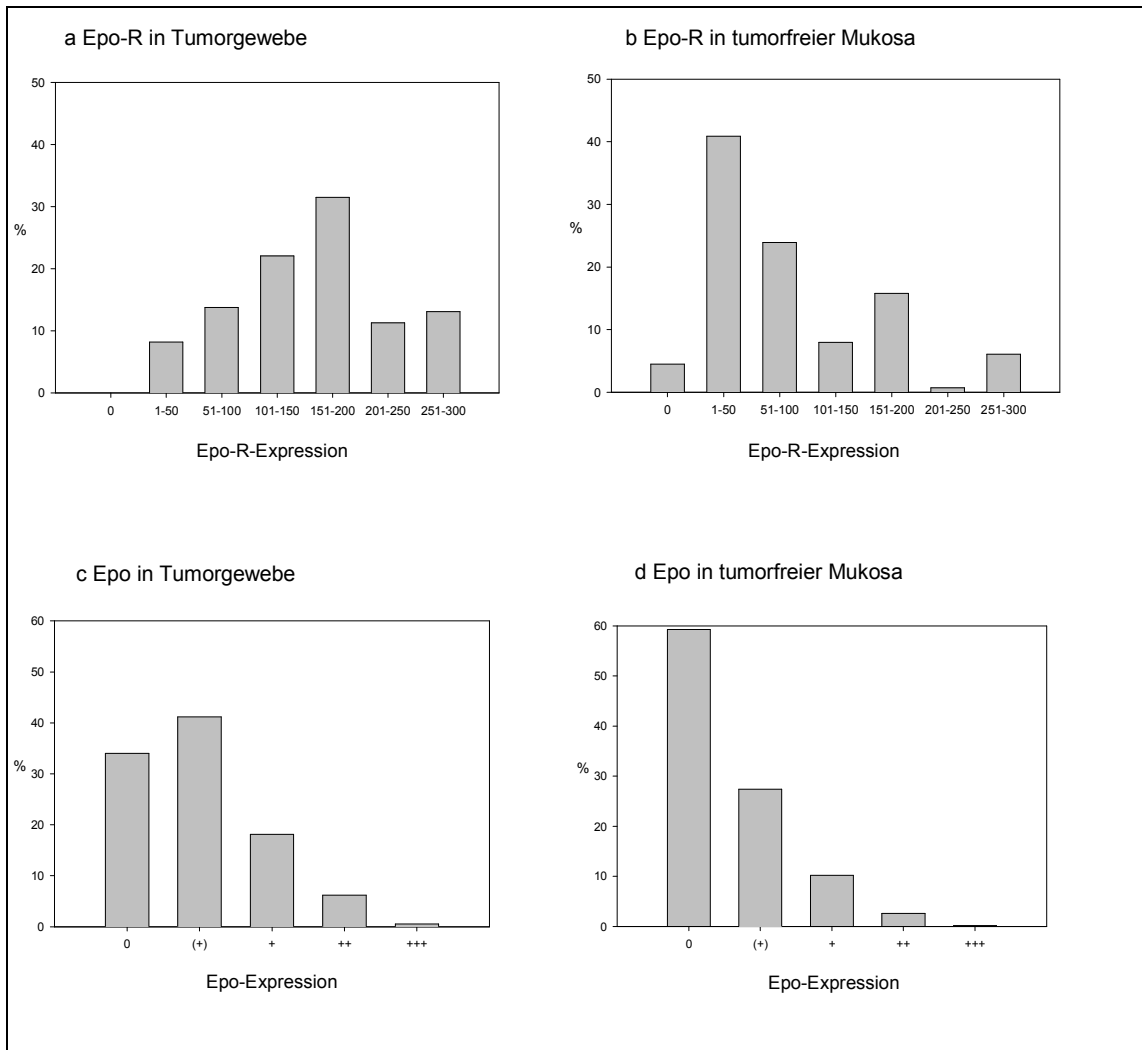


Abb. 2

- (a) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-R-Färbelevels in Tumormukosa.
- (b) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-R-Färbelevels in tumorfreier Mukosa.
- (c) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-Färbelevel in Tumormukosa.
- (d) Häufigkeitsverteilung semiquantitativer Epo-Färbelevel in tumorfreier Mukosa.

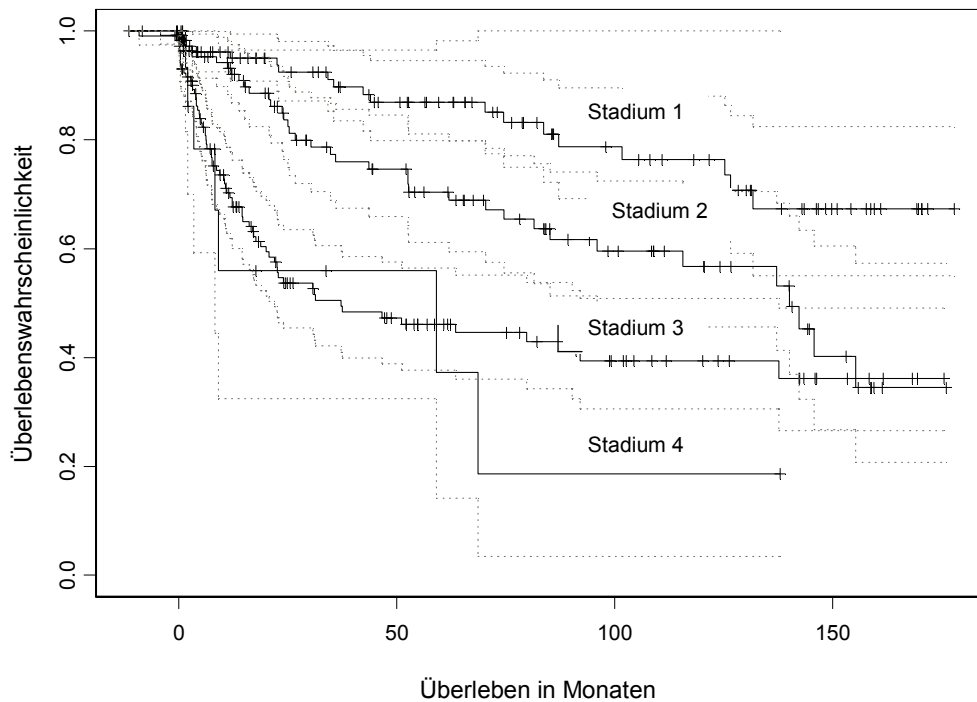


Abb. 3 (a) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und dem Stadium (Log-Rank = 41,2; $P < 0,000001$).

Wie schon in der univariaten Analyse beobachtet, waren Alter, Tumor und Lymphknoten in der Cox-Regressionsanalyse signifikant mit dem Überleben der Patienten korreliert. Bei Stadium, Metastasierung (M) und Grading (G) hingegen war dies nicht der Fall. Im Vergleich von muzinösen Adenokarzinomen mit allen anderen Tumorformen gab es keinen signifikanten Unterschied für das Gesamtüberleben der Patienten (Log-Rank 0,915; $p = 0,41$) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Cox-Regressionsanalyse für eine multivariate Überlebensanalyse.

Variable	z	P*
Geschlecht	1,663	0,096
Alter >69 Jahre	2,301	0,021[†]
Stadium	-0,608	0,54
T	3,099	0,0019[†]
N	3,996	0,00006[†]
M	1,356	0,17
Grading	1,019	0,31
Histologie, muzinös	0,826	0,41

Lokalisation, rektal	-0,313	0,75
Epo-R	-1,189	0,23
Epo	0,009	0,99
Epo-R · Epo	0,070	0,22

* Der p-Wert zeigt die Signifikanz der Unterschiede für die Überlebensverteilung an.

† Das Signifikanzniveau ist $p < 0.05$.

4.2. Epo-R- und Epo-Immunhistochemie

Alle 426 Gewebeschnitte (100%) zeigten eine Epo-R-Expression, deren Ausprägung sich individuell unterschied (Abb. 2 (a), Tabelle 4). Mit unserem Bewertungssystem zeigte die Epo-R-Expression annähernd eine Normalverteilung (Abb. 2 (a)). In der tumorfreien Mukosa konnte die Epo-R-Expression in fast allen Schnitten (94,8%) beobachtet werden, die meisten Epithelzellen exprimierten Epo-R jedoch nur sehr schwach (Abb. 2 (b)).

Die Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen war vor allem in den apikalen Bereichen der Tumorepithelien zu finden, außerdem in Zellen des Interstitiums - Endothelzellen und Fibroblasten eingeschlossen. Eine Häufung in Zellkernen konnte zusätzlich beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die verschiedenen histologischen Tumorarten war nur dann zu finden, wenn die Epo-R-Färbungen von muzinösen und nicht-muzinösen Adenokarzinomen verglichen wurden, wobei die Expression in muzinösen Karzinomen stärker war ($p = 0,0116$) (Tabelle 5).

Im Gegenteil zu den Epo-R-Färbungen waren 316 der 420 Tumorschnitte Epo-negativ (75,2 %) und in den restlichen Schnitten ($n = 104$; 24,8%) war die Epo-Färbung überwiegend sehr schwach ($n = 76$; 18,1%). Nur 26 der Epo-positiven Schnitte (6,2%) zeigten eine mittelstarke Anfärbung und bei nur zwei (0,5%) fand sich eine starke Epo-Expression (Abb. 2 (c)). In den meisten Fällen fand sich in der normalen Mukosa keine Epo-Expression (86,7%) (Abb. 2 (d)).

Tabelle 4: Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen und die univariate Analyse des Gesamtüberlebens der Patienten.

Zusammensetzung der Gruppen nach Epo-R-Färbung	Cut-off-Punkt(e) für die Epo-R-Expression (IRS-Epo-R Werte)	Absolute Zahlen	Log rank	Korrelation mit dem Überleben (p)
6 Gruppen	51, 101, 151, 201, 251	35, 59, 94, 134, 50, 56	8,3	0,14
3 Gruppen	101, 201	94, 228, 104	1,6	0,45
2 Gruppen	0-50 versus 51-300	35 ↔ 391	2,6	0,10
2 Gruppen	0-100 versus 101-300	94 ↔ 332	0,7	0,39
2 Gruppen	0-150 versus 151-300	188 ↔ 238	0,5	0,50
2 Gruppen	0-200 versus 201-300	322 ↔ 104	0,4	0,51
2 Gruppen	0-250 versus 251-300	370 ↔ 56	0,9	0,35

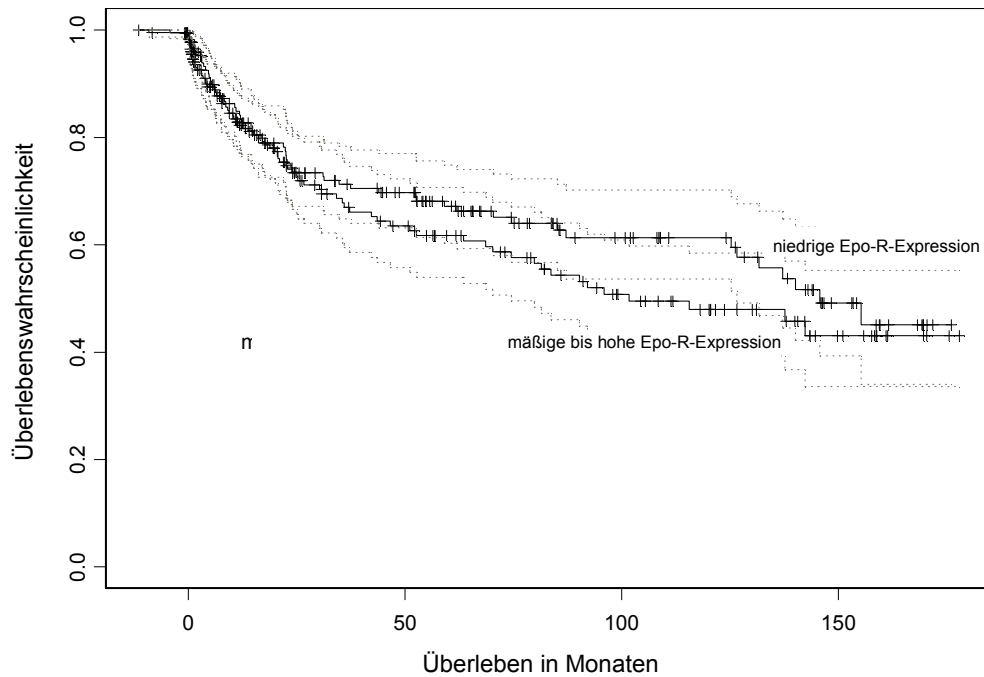


Abb. 3 (b) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und der Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen.
Keine signifikante Korrelation zwischen der Epo-R-Expression und dem Gesamtüberleben.

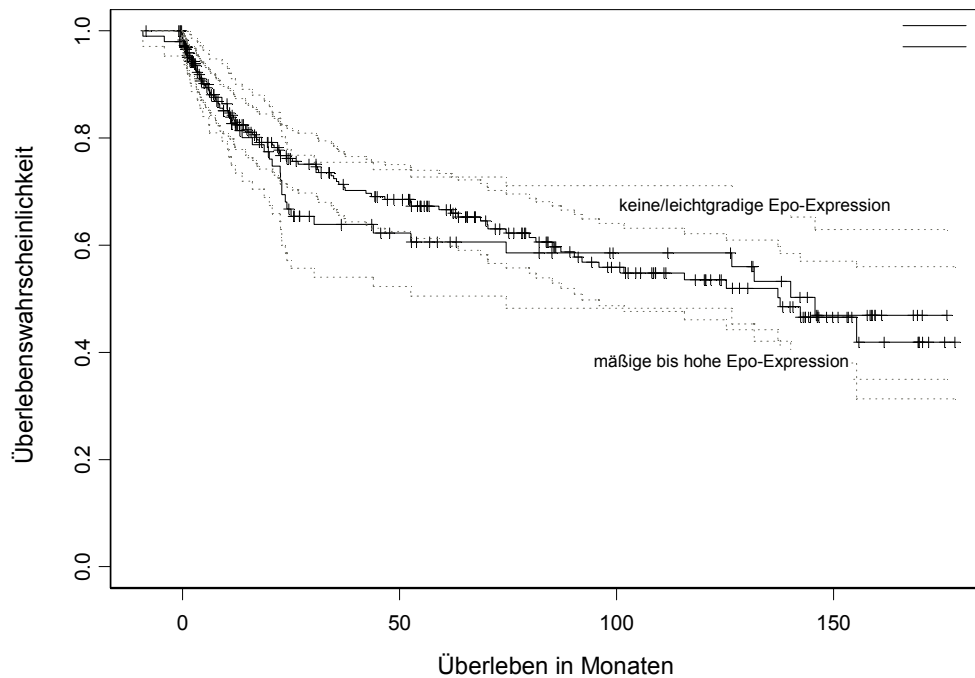


Abb. 3 (c) Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben der Patienten und der Epo-Expression in Kolorektalen Karzinomen.
Keine Korrelation zwischen der Epo-Expression und dem Gesamtüberleben.

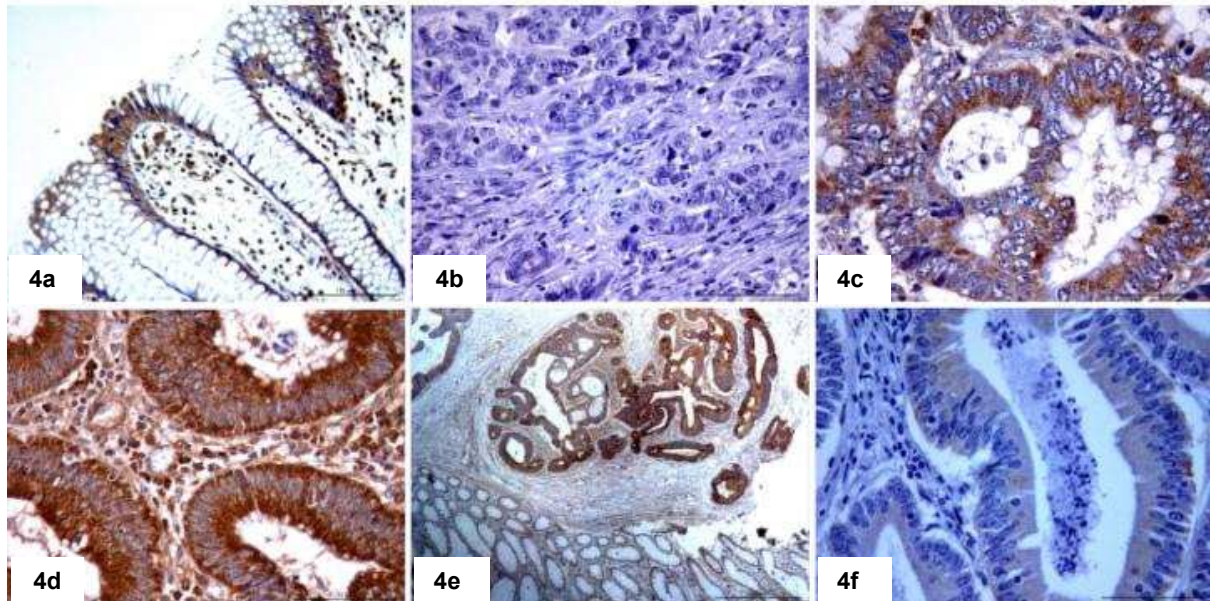


Abb. 4

(a) Epo-R-Expression in normaler Darmmukosa. (b) Kolorektales Adenokarzinom ohne Epo-Expression. (c) Kolorektales Adenokarzinom mit mittelstarker Epo-R-Expression. (d) Kolorektales Adenokarzinom mit starker Epo-R-Expression. (e) Tumorgewebe (kolorektales Adenokarzinom) innerhalb normaler Darmmukosa. (f) Kolorektales Adenokarzinom mit geringer Epo-Expression.

4.3. Prognostischer Wert der Epo-R- und Epo-Expression

Für den Kolinearitätstest wurde ein IRS-Epo-R-Cut-off-Punkt von 150 gewählt, damit die Gruppe mit schwacher Epo-R-Expression (d. h. IRS-Epo-R \leq 150) und die Gruppe mit mäßiger bis hoher Epo-R-Expression (d. h. IRS-Epo-R $>$ 150) ungefähr gleich groß waren. Bei dieser Einteilung wurde beobachtet, dass für M₁-Tumore ein Trend zur Epo-R-Expression besteht ($p = 0,0574$). Außerdem korreliert ein hohes Grading mit einer hohen Epo-R-Expression ($p = 0,0179$) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kolinearitätstest.

Variable	Häufigkeit von Epo-R-positiv in Prozent [%]	χ^2	p*	Kommentar
<i>Geschlecht</i> männlich weiblich	56 56	0,012	0,912	n. s.
<i>Alter</i> <Mittelwert (68,6 Jahre) >Mittelwert (68,6 Jahre)	54 57	0,346	0,556	n. s.
<i>Stadium</i> I II III IV	50 61 54 78	6,449	0,092	n. s.
<i>pT</i> T ₁ T ₂ T ₃ T ₄	40 54 60 46	5,462	0,141	n. s.
<i>pN</i> N ₀ N ₁ N ₂	56 56 57	0,036	0,982	n. s.
<i>pM</i> M ₀ M ₁	55 78	3,610	0,0574	Trend für M ₁ Tumore, Epo-R zu exprimieren
<i>Grading</i> G ₁ G ₂ G ₃	55 53 70	8,048	0,0179 [†]	Hohes Grading korreliert mit hoher Epo-R-Expression
<i>Histologie</i> muzinös nicht-muzinös	40 58	6,368	0,0116 [†]	Nicht muzinöse kolorektale Adenokarzinome exprimieren mehr Epo-R

* Der p-Wert zeigt die Signifikanz der χ^2 -Statistik für die Unterschiede in der Überlebensverteilung

[†] Das Signifikanzniveau beträgt p<0,05.

Bei Einbeziehung aller Variablen in eine multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass die Epo-R-Expression in Tumorepithelzellen nicht signifikant mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert war ($z = -1,189$; $p = 0,23$) (Tabelle 3).

Auch in der univariaten Analyse war die Epo-R-Expression nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Log-Rank zwischen 0,4 und 8,3; p zwischen 0,1 und 0,51) (Tabelle 4). Die Ergebnisse waren unabhängig vom Cut-off-Punkt, der für die jeweilige Auswertung gewählt wurde (Abbildung 3 (b), Tabelle 4).

Unabhängig vom Cut-off Punkt war die Epo-Expression nicht mit dem Outcome der Patienten korreliert (Log-Rank zwischen 0 und 4,2; P zwischen 0,24 und 0,86) (Abbildung 3 (c)).

In der Cox-Regressionsanalyse mit Epo und Epo-R und deren Interaktion fand sich keine Korrelation zwischen Outcome der Patienten und jeweiliger Expression der beiden Proteine (Epo-R; $z = -1,189$, $P = 0.23$; Epo, $z = 0.009$, $P = 0.99$; Epo-R * Epo, $z = 0.070$, $P = 0.22$) (Tabelle 3).

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten nimmt.

Dazu wurden 426 Gewebeschnitte von CRC-Patienten immunhistochemisch auf Epo und Epo-R angefärbt und ausgewertet.

Stärken der vorliegenden Studie sind die große Fallzahl (n = 426) und das strenge Auswertungssystem. Die klinischen Basischarakteristika wurden angemessen abgestimmt und die immunhistochemischen Färbungen durch sorgfältige Kontrollen überprüft. Die Auswertung erfolgte über zwei unabhängige Untersucher, die für alle klinischen Daten der Patienten verblindet waren.

In 100 % der Fälle fand sich eine Epo-R-Expression, während eine Epo-Expression nur in einem Viertel der Gewebeschnitte zu beobachten war. Dieses Ergebnis lässt sich mit einigen anderen Tumorstudien vergleichen, in denen auch über eine hohe Anzahl an Epo-R-positiven Gewebeschnitten berichtet wurde (92%-100%), während die Epo-Expression deutlich geringer war (50%-95,3%) (Acs et al., 2004; Saintigny et al., 2007; Leo et al., 2006; Winter et al., 2005; Arcasoy et al., 2005; Dagnon et al., 2005).

Unabhängig vom gewählten Cut-off-Punkt (Tabelle 4) konnte weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse ein Zusammenhang zwischen der Epo-R-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen werden (Abb. 3 (b)). Auch die Epo-Expression (Abb. 3 (c)) im Tumorgewebe kolorektaler Karzinome war in dieser Studie nicht mit einem erniedrigten Gesamtüberleben korreliert.

Bei einer kürzlich von der Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (FDA = Food and Drug Administration) veranlassten Sitzung wurden Bedenken über mögliche Risiken einer Epo-Behandlung bei Chemotherapiepatienten diskutiert (FDA 2007). Neben einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für thromboembolische Ereignisse wurden schon 1993, als Epo zum ersten Mal zur Behandlung von Tumorpatienten zugelassen wurde, eine mögliche beschleunigte Tumorprogression und eine verkürzte Überlebenszeit von Patienten zur

Kenntnis genommen.

Allerdings wurde den veröffentlichten Informationen der FDA erst im März 2007 eine „Black Box warning“ hinzugefügt. In diesen Informationen wurden ein erhöhtes Sterberisiko und Risiken für schwere kardiovaskuläre Ereignisse beschrieben, wenn ein Hämoglobinwert von mehr als 12 g/dl angestrebt wurde. Patienten sollten mit Epo also nicht behandelt werden, wenn der Hb-Wert 12 g/dl überschreitet (FDA-Alert 2007).

Erste Bedenken über einen nachteiligen Effekt von Epo bei der Behandlung von Krebspatienten kamen 2003 auf, als eine große multizentrische, doppelblinde Studie mit 351 Anämiepatienten mit Kopf-Hals-Karzinomen veröffentlicht wurde. In dieser randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie, in der Patienten mit Epoetin beta behandelt wurden, war das rezidivfreie und das Gesamtüberleben in dieser Gruppe wesentlich niedriger als in der Placebo-Gruppe (Henke et al., 2003). Eine ähnlich große Studie mit Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs, behandelt mit Epoetin alpha, zeigte ein niedrigeres 1-Jahres-Gesamtüberleben in dieser Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Leyland-Jones et al. 2005), was zu einem vorzeitigen Abbruch der Studie führte.

Vergleichbare Ergebnisse über die Nachteile einer Epo-Behandlung ergaben sich aus Studien mit Patienten mit metastasiertem, nicht kleinzelligem Lungenkrebs (Wright et al., 2007), lokal fortgeschrittenem Kopf-Hals-Krebs (Goldberg et al., 2007; Kjellén et al., 2006), lymphoproliferativem Krebs (FDA 2007) und nicht-myeloischem Krebs (FDA 2007). Desgleichen deuten Ex-Vivo-Untersuchungen bei primären Adenokarzinomen des Magens an, dass Epo einen trophischen Effekt auf die Tumolvaskularisation und damit auf die Progression des Tumors haben könnte (Ribatti et al., 2003). Eine vor kurzem veröffentlichte Meta-Analyse fand hingegen keine nachteiligen Effekte auf das Gesamtüberleben von Patienten, die mit Epo behandelt worden waren (Bohlius et al., 2005).

Infolge der vorausgesetzten Effekte von exogen zugeführtem Epo, waren mehrere Untersuchungen bestrebt die von Tumorzellen exprimierten Epo-Rezeptoren und die damit eigentlichen Faktoren für das Tumorstadium zu identifizieren und deren prognostische Rolle zu klären.

Bei einer Reihe von Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen wurden 104 Epo-R-positive und 50 Epo-R-negative Fälle untersucht. Jeweils 52 und 26 Patienten gehörten der Placebo-Gruppe an, die nicht mit Epo behandelt wurde.

Die unbehandelten Patienten zeigten alle, unabhängig von einer Epo-R-Expression der Tumorzellen, dasselbe Outcome ($p = 0,17$), was vergleichbar ist mit unseren Ergebnissen bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen (p zwischen 0,10 und 0,51, abhängig vom Cut-off-Punkt) (Tabelle 4).

Auch bei Cervix- ($n = 48$), Endometrium- ($n = 107$) und squamösen Kopf-Hals-Karzinomen ($n = 146$) wurden keine Auswirkungen des Epo-R-Expressions-Grades auf das Gesamtüberleben ($p = 0,136$; $p = 0,589$; $p = 0,98$) und das rezidivfreie Überleben ($p = 0,719$; $p = 0,178$; $p = 0,66$) (Acs et al., 2004; Leo et al., 2006; Winter et al., 2005).

Andererseits wurde in einer Studie mit 158 Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkrebs gezeigt, dass die hohe Epo-R-Expression im Tumor mit einer erniedrigten 5-Jahres-Überlebenszeit der Patienten einherging ($p = 0,01$) (Saintigny et al., 2007).

Im Gegensatz dazu zeigte eine begrenzte Zahl von jungen Patienten (Alter < 58 Jahre) mit Glioblastomen WHO Grad 4 bei einem hohen Epo-R-Expressions-Grad eine längere Überlebenszeit (Mittelbronn et al., 2007).

Man kann also davon ausgehen, dass noch nicht zufrieden stellend geklärt ist, welche Rolle und prognostische Relevanz Epo-R beim Tumorwachstum zukommt.

Über die Identifizierung von Epo und Epo-R in Tumorzellen hinaus sorgten die Ergebnisse einiger klinischer Studien bezüglich möglicher Effekte von Epo auf die Tumorprogredienz für Beunruhigung. Obwohl rekombinantes menschliches Epo in der Behandlung von Anämie bei Krebspatienten sehr erfolgreich eingesetzt wurde und wird, besonders als Ergänzung zu Chemotherapie (Cella et al., 2003), hinterfragte man seinen Gebrauch für solide Tumore wegen der beobachteten nachteiligen Konsequenzen in Bezug auf das Überleben von Krebszellen (Batra et al., 2003), Proliferation (Westenfelder et al., 2003), Angiogenese und Förderung von Tumorwachstum (Yasuda et al., 2003).

Ob das Auftreten von Epo-R in Tumorzellen klinische Relevanz hat, wenn exogen Epo zugeführt wird, wurde in einer Studie mit Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen erforscht, die mit Epoetin beta behandelt wurden. Henke et al. konnten nachweisen, dass Epo-R-positive Patienten, die mit Epo behandelt wurden, ein erniedrigtes rezidivfreies Überleben zeigten im Vergleich zu den Patienten in der Placebo-Gruppe (angepasstes relatives Risiko: 2,07; 95%-CI: 1,27 bis 3,36; $p < 0,01$).

Das Outcome der Epo-R-negativen Patienten wurde durch die Gabe von Epo nicht beeinträchtigt (angepasstes relatives Risiko: 0,94; CI: 0,47 bis 1,9; $p = 0,86$). Der Unterschied des Krankheitsoutcomes (ausgedrückt als der Behandlung zugeordnetes relatives Risiko) zwischen Epo-R-positiven und -negativen Patienten blieb jedoch grenzwertig ($p = 0,08$). Daraus wurde geschlossen, dass exogen zugeführtes Epo die Prognose dieser Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen, deren Zellen Epo-R-exprimieren, nachteilig beeinflusst (Henke et al., 2006).

Da unsere Patienten nicht mit Epo behandelt wurden, konnte dieser Aspekt in unserer Studie nicht untersucht werden. Da wir allerdings einen höheren Epo-R-Expressions-Grad in kolorektalen Tumorgewebeproben mit hohem Grading beobachtet haben, wären weitere Untersuchungen wünschenswert um mögliche nachteilige Effekte von exogen zugeführtem Epo abhängig vom Tumor-Grading aufzuklären.

Außerdem interessant ist die Betrachtung der endogenen Epo-Zufuhr. Für Tumoren, die Epo produzieren und Epo-R exprimieren, wie Cervixkarzinome (Leo et al., 2006), hepatozelluläre Karzinome (Muta et al., 1994; Sakisaka et al., 1993), nicht kleinzellige Lungenkarzinome (Saintigny et al., 2007), duktales Pankreaskarzinome (Kawai et al., 2000) und Nierenzellkarzinome (Hanada et al., 1998; Noguchi et al., 1999), wurde angenommen, dass sie ihr Wachstum autokrin oder parakrin selbst stimulieren (Arcasoy et al., 2002). Verschiedene In-Vitro- und Ex-Vivo-Untersuchungen, die Zelllinien und Gewebeschnitte von Kopf-Hals-Karzinomen (Arcasoy et al., 2005a), Glioblastomen (Mohyeldin et al., 2007), hepatozellulären Karzinomen (Ribatti et al., 2007), nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (Dagnon et al., 2005) und Mammakarzinomen (Acs et al.,

2002 und 2001) benutzten, scheinen diese Hypothese zu bestätigen. Obwohl also die Evidenz für diesen autokrin-parakrinen Einfluss endogenen Epo auf Tumorzellen mehrfach beobachtet wurde (Yasuda et al., 2003 und 2001), konnte eine kürzlich veröffentlichte In-Vivo-Studie den Einfluss von Epo auf das Tumorwachstum, die Proliferationsrate und die Tumorangiogenese nicht bestätigen (Hardee et al., 2006).

In Tumorgewebeproben von 139 Patienten mit squamösen Kopf-Hals-Karzinomen und 158 Patienten mit nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen beeinflusste eine hochgradige Epo-Expression die Überlebensrate nicht ($p = 0,59$ bzw. $p = 0,88$ für das Gesamt- und rezidivfreie Überleben (Winter et al., 2005); $p = 0,13$ für die 5-Jahres-Überlebensrate (Saintigny et al., 2007)), trotz eines hohen Anteils (99% bzw. 94%) an Epo-R-exprimierendem Tumorgewebe. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen überein. Es deutet darauf hin, dass das Wachstum kolorektaler Tumoren keiner autokrinen oder parakrinen Regulation durch eine Epo-/Epo-R-Signalwirkung

innerhalb des Tumorgewebes unterliegt.

Im Gegensatz dazu beobachteten Leo et al. in einer Studie mit 48 Patientinnen mit Cervixkarzinomen ein vermindertes Gesamtüberleben ($n = 46$; $p = 0,008$) und rezidivfreies Überleben ($n = 41$; $p = 0,043$) bei den Patientinnen mit einer hohen Epo-Expression im Tumorgewebe (Leo et al., 2006). In Endometriumkarzinomen ($n = 107$) bedeutete eine gesteigerte Epo-Expression ein vermindertes Überleben ($p = 0,008$), allerdings kein vermindertes rezidivfreies Überleben ($p = 0,231$) (Acs et al., 2004).

Die Rolle, die die Signalwirkung von Epo und Epo-R in Karzinomen spielt, ist bisher allerdings umstritten (Hardee et al., 2006; Lai et al., 2006), obwohl eine steigende Anzahl von Studien zeigt, dass eine Epo-/Epo-R-Signalwirkung über eine Vielzahl von Tumor fördernden Funktionen zu einer Krankheitsprogression beitragen kann.

In präklinischen Transplantatmodellen von Ovarial- und Uteruskarzinomen bewirkte die Blockade der Epo-Signalwirkung durch lokal lösliche Epo-R- oder Anti-Epo-Antikörper einen Apoptoseanstieg von Tumorzellen (Yasuda et al.,

2001). In einem „rat mammary adenocarcinoma model“ konnte das Tumorwachstum durch Epo-R-/Epo-Inhibitoren verzögert werden (Arcasoy et al., 2002).

Es wurde daher empfohlen Patienten, die an Epo-R-exprimierenden Karzinomen leiden, nur begrenzt mit Epo zu behandeln (Pajonk et al., 2004). Da der Einfluss von Epo-/Epo-R- auf verschiedene Tumorarten unterschiedlich zu sein scheint und außerdem noch nicht vollständig verstanden wird, sind weitere Untersuchungen an normalen und Tumorzellen unbedingt notwendig.

Abschließend ist zu sagen, dass eine Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen nicht in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten steht. Aus diesem Grund kann die Epo-R-Expression nicht als prädiktiver Faktor für die Tumorprognose von Patienten mit kolorektalen Karzinomen verwendet werden.

Auf die Fragestellung, ob exogen zugeführtes Epo Einfluss auf das Gesamtüberleben von CRC-Patienten hat, die Epo-R exprimieren, kann diese Studie keine Antwort geben, da das Patientenkollektiv ausschließlich aus Patienten besteht, die nicht mit Epo behandelt wurden.

Weitere Studien müssen zeigen, ob eine Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen dann eine prognostische Relevanz hat, wenn CRC-Patienten mit Epo behandelt werden.

Bisher konnte außerdem keine Studie zufrieden stellend beantworten, warum Epo/Epo-R in verschiedenen Tumorgeweben unterschiedlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben von betroffenen Patienten hat (Saintigny et al., 2007; Leo et al., 2006; Winter et al., 2005; Arcasoy et al., 2005; Dagnon et al., 2005; Acs et al., 2004).

Auch hier wären weitere Studien sinnvoll, um die Indikation für Epo als wichtigstes Mittel zur Anämiebehandlung in Zukunft kritischer stellen zu können.

Tabelle 6: Übersicht zu Studien, in denen an verschiedenen malignen Tumoren die Korrelation zwischen der Epo- bzw. Epo-R-Expression und dem Gesamtüberleben sowie dem Rezidiv-freien Überleben untersucht wurde. Signifikanzniveau $p < 0,05$; k.A.= keine Angabe

Autor, Jahr	Tumor	Patientenzahl	Epo-positiv	Epo-R-positiv	Gesamtüberleben Epo-assoziiert (p)	Gesamtüberleben Epo-R-assoziiert (p)	Rezidiv-freies Überleben Epo-assoziiert (p)	Rezidiv-freies Überleben Epo-R-assoziiert (p)
Saintigny et al. 2007	Nicht-kleinzelliges Lungen-Karzinom (Stadium I)	158	79,1%	94,3%	0,13	0,01	k.A.	k.A.
Leo et al., 2006	Cervix-Karzinom	48	88%	92%	0,008	0,136	0,043	0,719
Winter et al., 2005	Squamöses Kopf-Hals-Karzinom	146	95%	99%	0,59	0,98	0,88	0,66
Arcasoy et al., 2005	Kopf-Hals-Karzinom	74	90%	97%	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Dagnon et al., 2005	Nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom	29	50%	96%	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Acs et al., 2004	Endometrium-Karzinom	107	95,3%	100%	0,037	0,398	0,605	0,172

6. Zusammenfassung

Viele Studien deuten darauf hin, dass eine Epo-Behandlung von Patienten mit unterschiedlichen Krebsleiden das Tumorstadium über im Tumorgewebe exprimierte Epo-Rezeptoren fördert. Diese Studie untersucht den Zusammenhang zwischen der Erythropoietin-Rezeptor-Expression in kolorektalen Karzinomen (CRC) und dem Gesamtüberleben der betroffenen Patienten.

Für die Untersuchung wurden 426 Gewebeschnitte von CRC-Patienten unter einem Transmissionslichtmikroskop ausgewertet. Die Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch angefärbt um Epo-R und Epo sichtbar zu machen.

Die Auswertung der Epo-R- und Epo-Expression erfolgte durch die Bewertung von „intensity“ und „extent of staining“. Anschließend wurden mehrere Cut-off-Einteilungen für die Epo-R-Expression auf eine Korrelation mit der Patientenüberlebenszeit überprüft.

Alle 426 Gewebeschnitte zeigten eine Epo-R-Expression, während die Expression von Epo nur in ca. einem Viertel der Schnitte zu finden war. Weder in der univariaten noch in der multivariaten Analyse konnte eine positive Korrelation zwischen der Epo-R-Expression in kolorektalen Tumorzellen und dem Gesamtüberleben der CRC-Patienten gezeigt werden.

Die Epo-R-Expression in kolorektalen Karzinomen hat somit keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten und kann auch nicht als Prognosefaktor für das Patienten-Outcome dienen.

Die in dieser Studie verwendeten Gewebeschnitte stammen von Patienten, die nicht mit Epo behandelt wurden. Weitere Studien müssen nun zeigen, ob die Epo-R-Expression bei mit Epo behandelten Patienten eine prognostische Relevanz hat.

7. Literaturverzeichnis

Abels RI. Recombinant human erythropoietin in the treatment of the anaemia of cancer. *Acta Haematol* 1992;87 Suppl 1:4-11.

Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001;61(9):3561-5.

Acs G, Chen M, Xu X, Acs P, Verma A, Koch CJ. Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;214(2):243-51.

Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, Acs P, McBroom J, Mohyeldin A, Liu S, Lu H and Verma A. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003;162:1789-1806.

Ammarguella F, Gogusev J, Drueke TB. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:687-92.

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3974-8.

Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA. Erythropoietin an erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clin Cancer Res* 2005; 11:20-7.

Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, Chou SC, Raleigh JA, Varia MA, Haroon ZA. Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* 2002;82:911-8.

Arcasoy MO, Amin K, Vollmer RT, et al. Erythropoietin an erythropoietin receptor expression in human prostate cancer. *Mod Pathol* 2005;18:421-30.

Arcasoy MO, Jiang X, Haroon ZA. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:999-1007.

Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem*. 1993;41(3):335-41.

Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103(3):921-6.

Barber DL, Beattie BK, Mason JM, Nguyen MH, Yoakim M, Neel BG, D'Andrea AD, Frank DA. A common epitope is shared by activated signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) and the phosphorylated erythropoietin receptor: implications for the docking model of STAT activation. *Blood* 2001 15;97(8):2230-7.

Batra S, Perelman N, Luck RL, Shimada H, Malik P. Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. *Lab Invest* 2003;83:1477-87.

Bohlius J, Langensiepen S, Schwarzer G, Seidenfeld J, Piper M, Bennett C, Engert A. Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(7):489-98.

Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B, Bennett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert A. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:708-714.

Brosens LA, van Hattem A, Hylind LM, Iacobuzio-Donahue C, Romans KE, Axilbund J, Cruz-Correa M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Giardiello FM. Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut* 2007;56(7):965-7. Epub 2007 Feb 15.

Carvalho G, Lefaucheur C, Cherbonnier C, Métivier D, Chapel A, Pallardy M, Bourgeade MF, Charpentier B, Hirsch F, Kroemer G. Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. *Oncogene* 2005;24(5):737-45.

Cella D, Zagari MJ, Vondoros, C, Gagnon DD, Hurzt HJ, Nortier JW. Epoetin α treatment results in clinically significant improvements in quality of life in anemic cancer patients when referenced to the general population. *J Clin Oncol* 2003;21:366-73.

Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol Cell*. 2001;7(2):377-85.

Dagnon K, Pacary E, Commo F et al. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005;11:993-9.

Dammacco F, Castoldi G, Rödger S. Efficacy of Epoetin alfa in the treatment of anaemia of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001;113(1):172-9.

Denis F, Lartigau E. Anaemia and radiation therapy. *Cancer Radiother* 2004;8 Suppl 1:S14-23.

Farell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:18-30.

Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006;66(2):135-45.

Gewirtz DA, Di X, Walker TD, Sawyer ST. Erythropoietin fails to interfere with the antiproliferative and cytotoxic effects of antitumor drugs. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 1):2232-8.

Glaspy J, Dunst J. Can erythropoietin therapy improve survival? *Oncology* 2004;67(suppl 1):5-11.

Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002;8:718-24.

Hanada T, Mimata H, Ohno H, Nasu N, Nakagawa M, Nomura Y. Erythropoietin-producing renal cell carcinoma arising from acquired cystic disease of the kidney. *Int J Urol* 1998;5:493-4; discussion 5.

Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(2):332-9.

Hardee ME, Cao Y, Fu P, Jiang X, Zhao Y, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Arcasoy MO. Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. *PLoS ONE* 2007;2:e549.

Hardee ME, Rabbani ZN, Arcasoy MO, Kirkpatrick JP, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Blackwell KL. Erythropoietin inhibits apoptosis in breast cancer cells via an Akt-dependent pathway without modulating in vivo chemosensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006;5(2):356-61.

Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol* 2003;163:993-1000.

Heitkamp, Hans-Christian; Bott, Miriam. Kolorektalkarzinome und körperliche Aktivität
Deutsches Ärzteblatt 98, Ausgabe 10 vom 09.03.2001, Seite A-612
MEDIZIN.

Henke M, Laszig R, Rübe C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003;362(9392):1255-60.

Henke M, Mattern D, Pepe M, Bézay C, Weissenberger C, Werner M, Pajonk F. Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J Clin Oncol* 2006;24:4708-13.

Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981;29(11):1349-53.

Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64(2):326-33.

Kato I, Tominaga S, Ikari A: A case-control study of male colorectal cancer in Aichi Prefecture, Japan: with special reference to occupational activity level, drinking habits and family history. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 115–121.

Kawai H, Kojima M, Yokota M et al. Erythropoietin-producing pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2000;21:427-9.

Khuri FR. Weighing the hazards of erythropoiesis stimulation in patients with cancer. *N Engl J Med* 2007;356:2445-8.

Klingmüller U, Bergelson S, Hsiao JG, Lodish HF. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Aug 6;93(16):8324-8.

Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995 Mar 10;80(5):729-38.

Klingmüller U, Wu H, Hsiao JG, Toker A, Duckworth BC, Cantley LC, Lodish HF. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3016-3021.

Kumar SM, Acs G, Fang D, Herlyn M, Elder DE, Xu X. Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma. *Am J Pathol* 2005;166:823-830.

Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(suppl 2):22-28.

Lai SY, Childs EE, Xi S, Coppelli FM, Gooding WE, Wells A, Ferris RL, Grandis JR. Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2005;24:4442-9.

LaMontagne KR, Butler J, Marshall DJ, Tullai J, Gechtman Z, Hall C, Meshaw A, Farrell FX. Recombinant Epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. *Mol Cancer Ther* 2006 Feb;5(2):347-55.

Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *The Oncologist* 2003;8(suppl 1):15-18.

Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. Epo's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *STEM CELLS* 2002;20:485-492.

Layer G, Kopp A, Müller-Schimpfle M. Kolorektales Karzinom, In: Layer G, van Kaick G, Delorme S. *Radiologische Diagnostik in der Onkologie, Band 2: Gastrointestinum, Urogenitaltrakt, Retroperitoneum*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008; 61-85.

Leo C, Horn LC, Rauscher C, Hentschel B, Liebmann A, Hildebrandt G, Höckel M. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:6894-900.

Lester RD, Jo M, Campana WM, Gonias SL. Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. *J Biol Chem* 2005;280(47):39273-7.

Leyland-Jones B. Breast Cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 2003;4:459-60.

Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. Maintaining normal haemoglobin levels with Epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: A survival study. *J Clin Oncol* 2005;23:5961-63.

Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B; Epoetin Alfa Study Group. For the Epoetin Alfa Study Group: Effects of Epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving non-platinum chemotherapy: Results of a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J Clin Oncol* 2004;19:2865-74.

Longmore GD. Do cancer cells express functional erythropoietin receptors? *Massachusetts Medical Society* 2007, *N Engl J Med* 2007;256:2447.

Matsuyama M, Yamazaki O, Horii K, Higaki I, Kawai S, Mikami S, Higashino M, Oka H, Nakai T, Inoue T. Erythrocytosis caused by an erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2000;75:197-202.

Mittelbronn M, Capper D, Bunz B, Dietz K, Goeppert B, Ajaaj R, Tabatabai G, Stubenvoll F, Schlaszus H, Merseburger AS, Becker R, Freudenstein D, Wick W, Weller M, Meyermann R and Simon P. De novo erythropoietin receptor (Epo-R) expression in human neoplastic glial cells decreases with grade of malignancy but is favourably associated with patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:299-307.

Mohyeldin A, Dalgard CL, Lu H, Mcfate T, Tait AS, Patel VC, Wong K, Rushing E, Roy S, Acs G, Verma A. Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin. *J Neurosurg* 2007;106:338-50.

Mohyeldin A, Lu H, Dalgard C et al. Erythropoietin signaling promotes invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2005;7:537-43.

Müller und Mitarbeiter. *Chirurgie für Studium und Praxis*. 9. Auflage 2008/2009.

Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 2001;28(suppl 8):19-23.

Muta H, Funakoshi A, Baba T, Uike N, Wakasugi H, Kozuru M, Jimi A. Gene expression of erythropoietin in hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 1994;33:427-31.

Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:386-92.

Noguchi Y, Goto T, Yufu Y, Uike N, Hasegawa Y, Fukuda T, Jimi A, Funakoshi A. Gene expression of erythropoietin in renal cell carcinoma. *Intern Med* 1999;38:991-4.

Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem* 2000;275:39754-61.

Ohneda O, Yanai N, Obinata M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res* 1993;208:327-31.

Pajonk F, Weil A, Sommer A, Suwinski R, Henke M. The erythropoietin-receptor pathway modulates survival of cancer cells. *Oncogene*. 2004;23(55):8987-91.

Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:20655-62.

Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999;283:990-93.

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. Kolorektales Karzinom. Basislehrbuch Innere Medizin, 3. Auflage 2004, 6.5.12:590-94.

Ribatti D, Marzullo A, Gentile A, Longo V, Nico B, Vacca A, Dammacco F. Erythropoietin/erythropoietin-receptor system is involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2007;50:591-6.

Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93(8):2627-36.

Saintigny P, Besse B, Callard P, Vergnaud AC, Czernichow S, Colombat M, Girard P, Validire P, Breau JL, Bernaudin JF, Soria JC. Erythropoietin and erythropoietin receptor coexpression is associated with poor survival in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:4825-31.

Sakisaka S, Watanabe M, Tateishi H, Harada M, Shakado S, Mimura Y, Gondo K, Yoshitake M, Noguchi K, Hino T, et al. Erythropoietin production in hepatocellular carcinoma cells associated with polycythemia: immunohistochemical evidence. *Hepatology* 1993;18:1357-62.

Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-1793.

Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (Epo) signaling by binding the Epo receptor and JAK2. *J Biol Chem* 2000;275:29338-29347.

Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989;74:103-9.

Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* 2000;10:421-426.

Sue JM, Sytkowski AJ. Site-specific antibodies to human erythropoietin directed toward the NH₂-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Jun;80(12):3651-5.

Tauchi T, Feng GS, Shen R, Hoatlin M, Bagby GC Jr, Kabat D, Lu L, Broxmeyer HE. Involvement of SH₂-containing phosphotyrosine phosphatase Syp in erythropoietin receptor signal transduction pathways. *J Biol Chem* 1995;270(10):5631-5.

Tovari J, Gilly R, Raso E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vago A, Timar J. Recombinant human erythropoietin alpha targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 2005;65(16):7186-93.

Vijan S, Hwang EW, Hofer TP, Hayward RA. Which colon cancer screening test? A comparison of costs, effectiveness, and compliance. *Am J Med* 2001;111(8):593-601.

Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000;58(2):647-57.

Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human rat and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999;55:808-20.

Westphal G, Niederberger E, Blum C, Wollman Y, Knoch TA, Rebel W, Debus J, Friedrich E. Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality. *Tumori* 2002;88:150-159.

Whittemore AS, Wu-Williams AH, Lee M, Zheng S, Gallagher RP, Jiao DA, Zhou L, Wang XH, Chen K, Jung D et al. Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 915–926.

Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227-236.

Wright JR, Ung YC, Julian JA, Pritchard KI, Whelan TJ, Smith C, Szechtman B, Roa W, Mulroy L, Rudinskas L, Gagnon B, Okawara GS, Levine MN. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol* 2007;25:1027-32.

Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995;83:59-67.

Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 2002;23(11):1797-805.

Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003;24(6):1021-9. Epub 2003. Erratum in: *Carcinogenesis* 2003;24(9):1567.

Yasuda, Y : Fujita, Y : Musha, T : Tanaka, H : Shiokawa, S : Nakamatsu, K : Mori, S : Matsuo, T : Nakamura, Y. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol* 2001;106:215-222.

Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, Fujita Y, Fujita H, Utsumi H, Matsuo T, Masuda S, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y. Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer* 2001;84(6):836-43.

Yoshimura A, Misawa H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol* 1998;5:171-176.

8. Danksagung

Herrn Professor C.H. Gleiter danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seinem Institut durchführen zu können und für die Durchsicht und Korrektur der Dissertation.

Herrn Dr. Richard Fux danke ich sehr für die Einführung in das Thema, die große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen während der Entstehung der Dissertation sowie für deren Korrektur.

Herrn Dr. Peter Fritz danke ich für die Bereitstellung der Gewebeschnitte und die tatkräftige Unterstützung bei Methodik und Auswertung des Materials.

Für die Anfärbung der Gewebeschnitte sowie vielfältige Hinweise und Informationen über Material und Technik bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Dr. Margarete Fischer-Bosch Instituts für Klinische Pharmakologie am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die große Unterstützung, die vielen Ratschläge und das Interesse an dieser Arbeit.

Meinem Mann, der mir immer mit Liebe und Rat zur Seite gestanden hat, danke ich im Besonderen.

9. Lebenslauf

Name: Stephanie Preschany
Geburtsort: Stuttgart Bad-Cannstatt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

04/2007 – 11/2008 **Universität Leipzig**
Studiengang Humanmedizin
Hauptstudium 10.Semester, Praktisches Jahr,
07.11.2008 Staatsexamen
10/2002 – 03/2007 **Eberhard Karls Universität Tübingen**
Studiengang Humanmedizin
Grundstudium, Hauptstudium 5. bis 9. Semester
09/2000 – 07/2002 **Gymnasium Korntal-Münchingen**
Leistungsfächer: Latein, Musik
Abitur: sehr gut
09/1993 – 08/2000 **Leibniz-Gymnasium, Stuttgart Feuerbach**

Erfahrung

Seit 01/2009 **Universitätsfrauenklinik Leipzig**
Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe
04/2008 – 07/2008 **Universitätsfrauenklinik Leipzig**
Praktisches Jahr, 3. Tertial: Gynäkologie
12/2007 – 04/2008 **Kantonspital Liestal, Schweiz**
Praktisches Jahr, 2. Tertial: Chirurgie
08/2007 – 12/2007 **Universitätsklinikum Leipzig**
Praktisches Jahr, 1. Tertial: Innere Medizin

03/2007 – 04/2007	Frauenarztpraxis Dr. med. Heinz Neeser, Stuttgart Famulatur
09/2006 – 10/2006	Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Famulatur
08/2006 – 09/2006	Universitätsklinikum Halle, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin Famulatur
09/2005	Universitätsklinikum Mannheim, Abteilung für Neurologie Famulatur
03/2005 – 04/2005	Frankfurter Diakonie-Kliniken, Markus-Krankenhaus, Abteilung für Kardiologie Famulatur

Sonstiges

Sprachen Englisch, Latein

Interessen Klassische Musik, Kunst und Geschichte