

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Molekulare Immunologie

Klinikum rechts der Isar

Univ-Prof. Dr. P. A. Knolle

Untersuchung zur Validität der konfokalen Laserimagingmikroskopie zur Beurteilung der Vaskularisierung in einem Mausmodell für das kolorektale Karzinom

Irina Anja Kerle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ-Prof. Dr. F. R. Greten
2. Univ-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 30.01.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der Abkürzungen	4
2	Einleitung	5
2.1	Epidemiologie	5
2.2	Risikofaktoren	6
2.3	Krankheitsverlauf	7
2.4	Staging und Prognose.....	7
2.5	Kanzerogenese.....	8
2.6	Therapiemöglichkeiten.....	11
2.6.1	Chirurgische Resektion	11
2.6.2	Neoadjuvante Chemotherapie.....	11
2.6.3	Adjuvante Chemotherapie.....	11
2.6.4	Palliative Therapie	12
2.7	Nachsorge	12
2.8	Screening.....	12
2.9	Endoskopieverfahren	13
2.9.1	Lichtkoloskopie.....	13
2.9.2	Chromoendoskopie	14
2.9.3	Narrow Band Imaging.....	15
2.9.4	Konfokale Lasermikroskopie	15
2.10	Anwendung der CLE im Kolon.....	17
2.11	Mauskoloskopie	18
2.12	Mausmodell Tp53 ^{ΔIEC}	19
3	Problemstellung	21
4	Material und Methodik.....	22

4.1	Mäuse	22
4.1.1	Adenom- und Karzinommäuse	22
4.1.2	Kolitismäuse	23
4.2	Koloskopie	23
4.2.1	Weißlichtendoskopie	23
4.2.2	CLE	24
4.3	Histologie	25
4.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	26
4.3.2	VE-Cadherin Färbung	27
4.4	Statistische Auswertung	28
4.4.1	Statistische Auswertung der CLE	28
4.4.2	Statistische Auswertung der VE-Cadherin Färbung.....	28
4.5	Therapie mit Sunitinib	29
5	Ergebnisse	31
5.1	Koloskopie	31
5.1.1	Koloskopie der Wildtypgruppe	31
5.1.2	Koloskopie der Adenomgruppe	32
5.1.3	Koloskopie der Karzinomgruppe	33
5.1.4	Koloskopie der Kolitisgruppe	34
5.2	Auswertung der erhobenen Daten der CLE	35
5.2.1	Konfokale Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinommäuse.....	35
5.2.2	Konfokale Daten der Kolitismäuse	35
5.2.3	Vergleich der CLE der Karzinomgruppe vor und nach der Behandlung mit Sunitinib	36
5.3	Histologische Aufbereitung	37

5.3.1	H.E.-Färbung.....	37
5.3.2	VE-Cadherin Färbung	38
5.4	Auswertung der erhobenen Daten der VE-Cadherin Färbung	39
5.4.1	Immunhistochemische Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinommäuse	39
5.4.2	Immunhistochemische Daten der Kolutismäuse.....	39
6	Diskussion	41
6.1	Messung der kolorektalen Vaskularisierung in vivo und in vitro	41
6.2	Vergleich der Ergebnisse	42
6.2.1	Auswertung der vaskulären Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinomgruppe	42
6.2.2	Auswertung der vaskulären Daten der Kolutisgruppe.....	43
6.2.3	Auswertung der Sunitinibtherapie.....	45
6.3	CLE.....	48
7	Zusammenfassung	51
8	Literaturverzeichnis.....	52
9	Dankvermerk	79
10	Publizierte Ergebnisse	80
11	Lebenslauf	81

1 Verzeichnis der Abkürzungen

AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
AOM	Azoxymethan
CLE	konfokale Laserendomikroskopie
DSS	Dextransulfat
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FOBT	Fäkaler Okkultblut Test
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNPCC	Nicht-polypöses Kolonkarzinomsyndrom
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
MVD	middle vessel density (mittlere Gefäßdichte)
PBS	Puffer und Laborreagenzien
PFA	Paraformaldehyd
TNM-Klassifikation	Tumor Nodes Metastasen-Klassifikation
UICC-Klassifikation	Union Internationale Contre Le Cancer-Klassifikation
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
Tp53 ^{ΔIEC}	Villin-Cre p53 Knockout

2 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) umfasst bösartige Neubildungen der Mukosa von Kolon und Rektum. Als Kolon (Dickdarm) wird der sich an das Ileum des Dünndarms anschließende Darmabschnitt bezeichnet, welcher sich aufgrund der unterschiedlichen Lagebeziehung zum Peritoneum von proximal bis distal in das intraperitoneale Caecum (Blinddarm), das sekundär retroperitoneale Colon ascendens, das intraperitoneale Colon transversum, das sekundär retroperitoneale Colon descendens und das intraperitoneale Colon sigmoideum einteilen lässt. Das Rektum (Mastdarm) ist ein 15 bis 18 cm langer, teils sekundär retroperitonealer, teils intraperitonealer Darmabschnitt, welcher sich dem aboralen Ende des Colon sigmoideum anschließt und distal in den Anus (After) übergeht. Circa 25 % der Kolonkarzinome befinden sich im Bereich des proximalen Kolons (Caecum, Colon ascendens, Colon transversum), während circa 75 % im Bereich des distalen Kolons (Colon descendens und vor allem Colon sigmoideum und Rektum) lokalisiert sind (Dumitrescu A 2011).

2.1 Epidemiologie

Obwohl die Inzidenz- und Mortalitätsraten international sehr variieren ist das KRK weltweit die am dritthäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen (Jemal A 2011). KRK sind zu 90 % Adenokarzinome. Die restlichen 10 % sind Siegelring- und Plattenepithelkarzinome sowie kleinzellige und undifferenzierte Karzinome. Die Inzidenz in Deutschland belief sich im Jahr 2004 auf über 37.000 Neuerkrankungen bei Männern und auf circa 36.000 Neuerkrankungen bei Frauen (Robert Koch Institut 2008). Bei beiden Geschlechtern handelt es sich in der Bundesrepublik um die zweithäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Todesursache, wobei bei Männern an erster Stelle das Bronchialkarzinom, bei Frauen hingegen das Mammakarzinom steht. Die Sterbefälle in Deutschland belaufen sich auf 28.000 pro Jahr (Haberland J 2010). Das mittlere Erkrankungsalter ist bei männlichen Patienten 69 Jahre und bei weiblichen Patienten 75 Jahre (Robert Koch Institut 2008). Die Inzidenz beginnt ab dem Alter von 40 zu 50 Jahren

signifikant zu steigen und die altersspezifische Inzidenz steigt in jeder darauffolgenden Dekade (Eddy DM 1990). Nachdem die geschätzten Erkrankungsraten von Männern und Frauen seit 1980 zunahmen, bleiben diese seit den letzten 10 Jahren unverändert. Die Sterberaten an KRK nahmen für beide Geschlechter jedoch kontinuierlich ab (Robert Koch Institut 2008). Im Vergleich zu den westlichen Industrienationen ist die Inzidenz des KRK in Asien und in einigen afrikanischen Ländern weitaus niedriger (Jemal A 2011), zeigt jedoch auf dem asiatischen Kontinent aufgrund der Westernisierung des Lebensstils eine steigende Tendenz (Yang J 2011). Das individuelle Erkrankungsrisiko gleicht sich dabei an die jeweilige regionale Inzidenzrate an und kann sich bei einer Umsiedelung wieder entsprechend verändern (Parkin DM 2005).

2.2 Risikofaktoren

Sichere Risikofaktoren sind der übermäßige Verzehr von rotem Fleisch und tierischen Fetten (Chan DS 2011). Eine generell ballaststoffarme Ernährung scheint ebenso das Krebsrisiko zu erhöhen (Kono S 2004), ihr Einfluss ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (World Cancer Research Fund 2007). Multifaktorielle Risikofaktoren für ein KRK sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Farraye FA 2010, Itzkowitz SH 2004) sowie kolorektale Adenome (Sillars-Hardebol AH 2011, Hermsen M 2002). Bei letzteren ist vor allen Dingen Anzahl, Größe und Grad der Dysplasie für ihre Entartung entscheidend. Die villösen (breitflächig-feinzottigen) Adenome besitzen mit 50 % ein höheres Entartungsrisiko als die tubulösen, pilzförmigen (1-4 %) und die tubulovillösen Mischformen (bis 10 %) (Winawer SJ 2006, Lieberman DA 2007, Loeve F 2005). Verwandte ersten Grades von Patienten mit einem KRK haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko zu erkranken (Winawer SJ 1996). Weitere Risikofaktoren sind Übergewicht (Sung MK 2011, Martínez ME 1997), Zustand nach Nierentransplantation in Assoziation mit der Einnahme von Immunsuppressiva (Webster AC 2007) sowie Nikotinabusus (Botteri E 2008). Zunehmende Daten weisen auf eine Verbindung zwischen Diabetes mellitus und erhöhten KRK-Inzidenzzahlen hin (He J 2010, Inoue M 2006).

Hereditäre Faktoren spielen mit 5 bis 10 % der KRK eine eher untergeordnete Rolle, führen jedoch bereits in jüngeren Jahren zur Krebsentwicklung. Beispiele dafür sind autosomal-dominante Erbkrankheiten wie die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) (Half E 2009), das nicht-polypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC bzw. Lynch-Syndrom) (Chung DC 2003) sowie das Gardner-, Hamilton- und Turcot-Syndrom. FAP macht 1 % (Half E 2009), HNPCC 5 % (Chung DC 2003) der KRK aus.

2.3 Krankheitsverlauf

Die Symptome treten meist erst bei fortgeschrittenem Tumorwachstum auf und sind leider uncharakteristisch. Häufig kommt es im Verlauf des Krebsleidens zu Änderungen der Stuhlgewohnheiten (Schoepfer A 2005), Obstipation (Leung WK 2006), Blutabgängen (Adler A 2007), Tenesmen (Robertson R 2006), konstant üblen Windgerüchen und Gewichtsverlust (Bjerregaard NC 2007). Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zur Leistungsminderung, Müdigkeit, chronischer Blutungsanämie, Ileuserscheinungen und Schmerzen durch Primärtumorausbreitung kommen (Speights VO 1991, Steinberg SM 1986).

2.4 Staging und Prognose

Das Staging der KRK erfolgt nach der TNM- und UICC-Klassifikation. Eine exakte Stadieneinteilung ist für die optimale Therapieentscheidung unablässig (McQueen AS 2011, Chapuis PH 2011). Zur Ermittlung des Lymphknotenstatus werden mindestens 12 regionäre Lymphknoten auf eventuelle Metastasierung untersucht (Fielding LP 1991).

Während die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten im UICC-Stadium I noch fast 95 % beträgt, sinkt diese im Stadium IV auf weniger als 5 %. Im Stadium III variieren die Überlebensraten in den 3 Stadienuntergliederungen, wobei die Größe des Primärtumors und die zunehmende Anzahl betroffener Lymphknoten die Prognose drastisch verschlechtern (Reinacher-Schick A 2009). Letztlich versterben etwa 40 % der Patienten an der Erkrankung (Robert Koch Institut 2008). Die 5-Jahres-Überlebensraten des Rektumkarzinoms sind ab dem UICC-Stadium II tendenziell etwas schlechter als die des Kolonkarzinoms.

2.5 Kanzerogenese

Die Mehrschrittttheorie beschreibt das Tumorwachstum als Resultat einer Verkettung von aufeinanderfolgenden Defekten in Genen, welche an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Dabei nimmt man an, dass diese Mutationen in einer einzigen Zelle stattfinden, welche durch ihre unkontrollierte Vermehrung daraufhin die gesunden Zellen verdrängt (monoklonale Entwicklungstheorie).

Protoonkogene sind an der Proliferations-, Mobilitäts- und Differenzierungsregulation einer Zelle beteiligt. Durch Mutation von Protoonkogenen entstehen Onkogene, welche unabhängig von einem Wachstumsfaktor konstitutiv exprimiert werden. Somit kommt es zum übermäßigen Wachstum und zur Entartung der Zelle. Tumorsuppressorgene haben eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstum. Durch Mutationen können diese inaktiviert werden, was zu einer enthemmten, unkontrollierten Zellproliferation führt. Die Entwicklung von KRK wird durch die Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben, welche eine Kumulation von Mutationen spezieller Protoonkogene und Tumorsuppressorgene zusammenfasst (Fearon ER und Vogelstein B 1990) (siehe Abb. 1).

Adenom-Karzinom-Sequenz

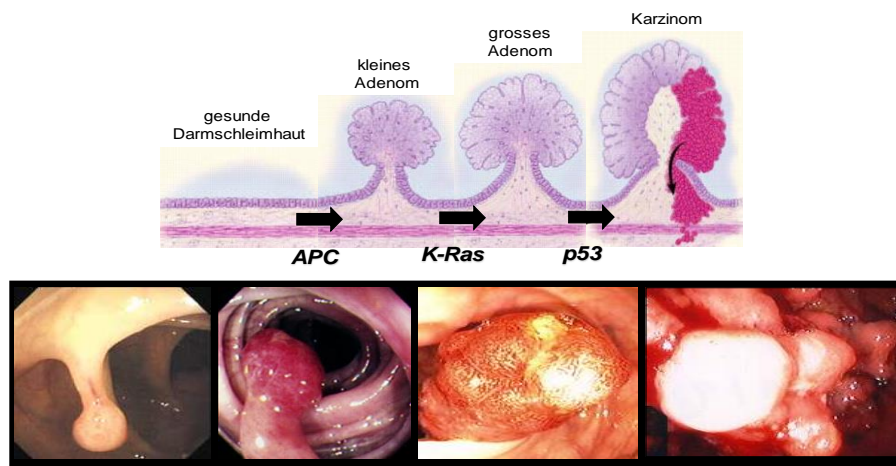


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolorektums mit den charakteristischen aufeinanderfolgenden Mutationen von Tumorsuppressor- und Onkogenen. Nicht zu sehen auf dieser vereinfachten Darstellung ist der Verlust des DCC-Tumorsuppressorgens

Durch die Mutation des Tumorsuppressorgens APC entwickelt sich im Kolonepithel ein Adenom und folglich wurde die Aktivierung des Wnt-Signalwegs als eine Art

Pförtnerfunktion der kolorektalen Karzinogenese vermutet (Kwong LN 2009, Fodde R 2001). Adenome sind benigne Tumoren aus Epithel und Drüsengewebe, welche basal von der Muscularis mucosae begrenzt werden. Durch zusätzliche Mutation des Protoonkogens K-Ras und der Tumorsuppressorgene SMAD4 und DCC kommt es zum kontinuierlichen Wachstum der Adenome und zur Entwicklung dysplastischer Zellverbände. Bei ausbleibender Entfernung der Adenome kann sich daraus ein Carcinoma in situ (präinvasives Karzinom) entwickeln (Smith G 2002). Durch den entscheidenden Verlust des Tumorsuppressorgens p53 entsteht schließlich ein invasiv und infiltrativ wachsendes Karzinom, welches metastasieren kann (Williams AC 1993).

Abgesehen von den aufeinanderfolgenden Mutationen der Adenom-Karzinom-Sequenz stellt ein entzündliches Umfeld eine weitere Voraussetzung für die verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung dar (Grivennikov SI 2010, Hanahan D und Weinberg RA 2011) und wird als eine Basis für Invasion und Metastasierung angesehen (Joyce JA und Pollard JW 2009). Die Aktivierung spezieller Onkogene initiiert eine intrinsische inflammatorische Reaktion, welche durch die Expression tumorfördernder Chemokine und Zytokine sowie durch die Rekrutierung von Immunzellen zur Stimulation von Fibroblasten, Matrixumbau, Angiogenese und der Freisetzung löslicher Botenstoffe führt, die das Überleben von entstehenden malignen Zellen auf parakrine Weise fördern (Mantovani A 2008; Grivennikov SI 2010). Zwei der zentralen Signalwege der inflammatorischen Tumorumgebung sind die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3, welche viele präkanzeröse Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Angiogenese und Invasion kontrollieren (Bollrath J und Greten FR 2009). Ab einer Größe von 2mm benötigt der Tumor eine eigene Gefäßversorgung (Gimbrone MA 1972). Die zusätzliche Gefäßversorgung ist essentiell für die Ernährung durch Perfusion und somit für das weitere Wachstum des Tumors (Ferrara N 2000). Ide et al beobachteten bereits in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts, dass starkes Tumorstadium einhergeht mit extensiver Neovaskularisation (Ide AG 1939). Es zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Mitoserate von Tumorzellen und der Menge an durch das vaskuläre Endothel diffundierten Sauerstoff und Nährstoffen (Tannock IF 1968). Früh wurde die Hypothese aufgestellt, dass vaskularisationsstimulierende Faktoren existieren,

welche von den Tumorzellen exprimiert werden (Ide AG 1939, Algire GH 1945). Folkman et al unternahmen bereits Anfang der siebziger Jahre den Versuch der Isolierung von Tumorangiogenesefaktoren (Folkman J 1971) und im Laufe der nächsten zwanzig Jahre wurden viele dieser proangiogenen Faktoren wie fibroblast growth factor FGF (Gospodarowicz D 1978), endothelial cell growth factor (ECGF) (Maciag 1979 T, D'Amore PA 1981, Barritault D 1981, Klagsbrun M und Smith S 1980), heparin-binding growth Faktoren aFGF (Thomas KA 1985) und bFGF (Esch F 1985), Angiogenin (Fett W 1985), transforming growth factor TGFs, TGF- α (Marquardt H 1984) und TGF- β (Derynck R 1985) sowie vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ferrara N 1989) entdeckt. Die Tumorzellen produzieren diese Faktoren, welche die Endothelzellen zur Proliferation und Migration stimulieren. Fibroblasten im Stroma des Tumors exprimieren ebenfalls angiogenesefördernde Proteine wie epidermal growth factor Rezeptorliganden (EGFR), hepatocyte growth factor (HGF) und Heregulin. Endothelzellen produzieren platelet derived growth factor-B (PDGF-B), welcher die Rekrutierung von Perizyten in das neu entstehende Gefäßbett fördert (Ferrara N 2005). Gefäße innerhalb eines Karzinoms sind in ihrem Durchmesser meist größer und verlaufen irregulärer als die Gefäße der physiologischen Mukosa (Cuenod CA 2006). Bei ausreichender Blutversorgung kommt es im Laufe der Zeit zur Invasion des normalen Gewebes sowie zur Metastasierung (Nguyen DX 2009). Die Metastasierung des KRK erfolgt sowohl über den hämatogenen als auch über den lymphogenen Weg (Weitz J 2000, McMahon CJ 2010). Bis auf den distalen Rektumabschnitt erfolgt der venöse Abfluss über die Vena portae. Somit sind erste Metastasen meist in der Leber zu finden (Hess KR 2006). Das distale Rektum liegt im venösen Abflussgebiet der Vena cava inferior und metastasiert daher zuerst in die Lunge (Kirke R 2007). Die lymphogene Metastasierung des oberen Rektumdrittels erfolgt in die paraaortalen Lymphknoten, die des mittleren Rektumdrittels führt zur zusätzlichen Metastasenbildung in der Beckenwand. Das untere Rektumdrittel besitzt eine weitere lymphogene Abflussstraße über die inguinalen Lymphknoten, in welchen sich ebenfalls Metastasen bilden können (Grinnell RS 1950).

2.6 Therapiemöglichkeiten

2.6.1 Chirurgische Resektion

Für die Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate ist die chirurgische Tumorresektion von großer Bedeutung (Wilkinson N 2008). Bis auf das UICC-Stadium IV, in welchem bereits Fernmetastasen vorhanden sind, wird eine vollständige Entfernung des Tumors (R_0 -Resektion) angestrebt. Entscheidend für das Ausmaß der Darmresektion ist neben der Größe des Primärtumors die Entfernung des regionalen Lymphabflussgebiets (Wright FC 2009). Je nach individuellem Befund können adhärente Organe oder neu entdeckte Fernmetastasen ebenfalls reseziert werden. Trotz allem entwickeln nach alleiniger chirurgischer Therapie je nach Studie 35,2 % bis 54,9 % der Patienten ein lokales Tumorrezidiv (Figueredo A 2003, Secco GB 2002).

2.6.2 Neoadjuvante Chemotherapie

Eine präoperative Radiochemotherapie wird bei Rektumkarzinomen ab dem UICC-Stadium II durchgeführt (Sauer R 2004). Mit Hilfe dieser zusätzlichen Therapiemaßnahme kann das Auftreten von Lokalrezidiven um 50 % gesenkt und die 10-Jahresüberlebensrate um weitere 10 % erhöht werden. Beim KRK ist das Chemotherapeutikum der Wahl der Antimetabolit 5-Fluoruracil (5-FU), der zur Gruppe der Fluorpyrimidine gehört. Die aktuelle Standardtherapie besteht aus einer 6-monatigen intravenösen Gabe von Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin (FOLFOX) in Form von zwölf 14 tägigen Zyklen (Conroy T 2010).

2.6.3 Adjuvante Chemotherapie

Indikation für eine postoperative, adjuvante Chemotherapie besteht beim Kolonkarzinom ab dem UICC-Stadium III sowie beim Rektumkarzinom, insofern keine neoadjuvante Radiochemotherapie stattgefunden hat (Schmiegel W 2008). Mit Hilfe der aktuellen Kombinationstherapie konnte eine 5-Jahrestumorfreiheit von circa 70 % erreicht werden (Gill S 2004). Zusätzlich scheint eine regelmäßige Einnahme

von Acetylsalicyl Säure (Aspirin®) das postoperative Rezidivrisiko und die Mortalität zu senken (Rothwell PM 2010).

2.6.4 Palliative Therapie

Ein palliatives Therapiekonzept ist vor allem bei Erkrankungen im UICC-Stadium IV angezeigt, in welchem aufgrund der Fernmetastasen keine kurative Therapie mehr möglich ist. Palliative operative Eingriffe sind die Erstellung von Umgehungsanastomosen und die Anlage eines Anus praeter (Cook AD 2005). Beim Rektumkarzinom werden Kryo- (Orth K 1992), Laser- (Jakobs R 2002) und Elektrotherapien sowie endoskopische Stenteinlagen durchgeführt (Katsanos K 2011). Zusätzlich werden je nach Allgemeinzustand Polychemotherapien durchgeführt (Köhne CH 2003). Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Therapie mit halbsynthetisch hergestellten VEGF- und EGFR-Antikörpern (Bevacizumab, Cetuximab) (Heinemann V 2010; Van Cutsem E 2011). Darüber hinaus können Sonographie- und Computertomographie-gesteuerte Therapieverfahren wie die laserinduzierte Thermoablation (LITT) (Vogl TJ 2004), die Radiofrequenzablation (RFA) (Leung EY 2010) und die transarterielle Chemoembolisation (TACE) (Vogl T 2001) zum Einsatz kommen.

2.7 Nachsorge

Die Häufigkeit der Nachsorgeuntersuchungen ist vom Tumorstadium abhängig. Die Nachsorgeuntersuchungen bestehen im Einzelnen aus der Spiegelbestimmung des Tumormarkers CEA, einer Koloskopie, einer Leberultraschalluntersuchung, einer Röntgen-Thorax-Aufnahme sowie einer zusätzlichen computertomografischen Aufnahme des Beckens beim Rektumkarzinom (Pita Fernández S 2010).

2.8 Screening

Bei Personen mit einem durchschnittlichen Erkrankungsrisiko (leere Familienanamnese für KRK beziehungsweise Polypen oder Adenome) sollte ab dem 50. Lebensjahr eine Krebsvorsorgeuntersuchung in Form einer Koloskopie durchgeführt werden (Schmiegel W 2008). Bei negativem Befund sollte die

Koloskopie alle 10 Jahre (Rex DK 2000), bei positivem Befund (Erkennung und Abtragung von Polypen) alle 5 Jahre wiederholt werden (Brooks DD 2008). Patienten, welche die Durchführung einer Koloskopie ablehnen, sollten alle 5 Jahre eine Rektosigmoidoskopie (endoskopische Untersuchung des Rektums und des Sigmas) sowie jährlich einen FOBT (Fäkaler Okkultblut-Test, Guaiak-Verfahren) durchführen lassen. Patienten, welche jegliche endoskopische Untersuchung ablehnen, sollten jährlich einen FOBT durchführen lassen. Ein positiver FOBT zieht eine Koloskopie nach sich (Schmiegel W 2008). Risikopatienten sollten sich bereits ab dem 40. Lebensjahr im Abstand von 5 Jahren einer Koloskopie unterziehen (Wilschut JA 2011). Patienten, welche an FAP oder am HNPCC-Syndrom leiden, sollten bereits ab dem 10. Lebensjahr beziehungsweise ab dem 25. Lebensjahr jährlich eine Koloskopie durchführen lassen (American Gastroenterological Association 2001, Johnson PM 2006). Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa sollte nach einer seit über 8 Jahren bestehenden Pankolitis sowie einer seit 15 Jahren bestehenden linksseitigen Kolitis eine jährliche Koloskopie mit anschließenden Biopsieentnahmen erfolgen.

2.9 Endoskopieverfahren

2.9.1 Lichtkoloskopie

Das aktuelle Modell besteht aus einem vollflexiblen, etwa 1 cm dünnen und circa 120 cm langen Arbeitsgang. Zumeist ist ein Videochip integriert, welcher die Aufnahme und spätere Wiedergabe der durchgeführten Koloskopie ermöglicht. Das Koloskop ist mit Spül- und Absaugvorrichtungen ausgestattet. Über den Arbeitskanal können Zangen und Schlingen eingeführt werden um Gewebeproben entnehmen oder Adenome abtragen zu können. Ferner kann eine Ultraschallsonde zur Durchführung einer Endosonographie eingeführt werden. Aktuelle Koloskope besitzen eine Zoomfunktion, durch welche eine 115 bis zu 200-fache Vergrößerung des Normalbildes gewährleistet wird. Diese starken Vergrößerungen ermöglichen eine detailgenaue Beurteilung der Oberflächenstruktur ohne Überstrahlung des endoskopischen Bildes. Somit können erforderliche Interventionen exakter durchgeführt werden.

2.9.2 Chromoendoskopie

Die Chromoendoskopie ermöglicht durch die topische Applikation von Farbstoffen über einen speziellen Sprühkatheter (z.B. Olympus PW-5L, Olympus America, Inc., Melville, New York) die Charakterisierung der Mukosa während einer laufenden Endoskopie (Fennerty MB 1994). Die Lugolsche Lösung färbt glykogenhaltige Plattenepithelzellen und eignet sich zur Detektion von Refluxösophagitis, Plattenepithelzell dysplasien und -karzinomen des Ösophagus (Hashimoto CL 2005, Fukuhara T 2010). Methylenblau wird von Intestinal- und Kolonepithelzellen aktiv absorbiert und dient der Detektion von Barrettmukosa im Ösophagus, intraepithelialer Neoplasien im Kolon sowie der Darstellung des Zottenverlusts im Intestinum bei Zöliakie (Niveloni S 1998, Masaki T 1994). Indigokarmin ist ein nicht absorptiver Farbstoff, welcher sich durch die Anreicherung in den Krypten des gastrointestinalen Epithels zur Darstellung kolorektaler Neoplasien und hyperplastischer beziehungsweise adenomatöser Polypen eignet (Axelrad AM 1996, Ratiu N 2007, Park SY 2008). Toluidinblau führt durch die Färbung zellulärer Nukleoli zur Hervorhebung maligner zellulärer Prozesse in Plattenepithelzellen des Ösophagus (Seitz JF 1990), zur Differenzierung gastraler Ulzera (Giler S 1978) und zur Detektion von Barrettmukosa (Chobanian SJ 1987). Kongorot ist ein pH sensibler Farbstoff, welcher durch einen Farbumschlag in der Präsenz säureproduzierender Epithelien die Detektion gastraler Atrophien und Frühkarzinome (Tatsuta M 1984) sowie intestinaler Metaplasien (Toth E 1995) unterstützt. Ein weiterer pH abhängiger Farbstoff ist Phenolrot, welcher durch die simultane Applikation von Harnsäure in Form eines Farbumschlags eine Spaltung der Harnsäure zu NH_3 und CO_2 durch eine gastrale *Helicobacter pylori* Infektion sichtbar macht (Iseki K 1998, Kohli Y 1994). Um die chromoendoskopische Untersuchung der Mukosa weiter zu präzisieren, können die genannten sowie weitere, nicht aufgeführte Farbstoffe individuell miteinander kombiniert werden (Stevens PD 1994, Sharma P 2003). Limitationen des Verfahrens bestehen in einer hohen Interobserver-Variabilität (Meining A 2004) und einem Mangel an standardisierten Klassifikationssystemen, wodurch die Effektivität der Chromoendoskopie bis dato nicht objektiv reproduzierbar dargestellt werden konnte (Dos Santos CE 2010, Takenaka R 2009, Matsumoto T 2009).

2.9.3 Narrow Band Imaging

Das Narrow Band Imaging (NBI) ist ein System zur Visualisierung der oberflächlichen Gefäßzeichnung der Mukosa während einer konventionellen Weißlichtendoskopie. Die trichromatischen, optischen Filter des NBI (500, 445, 415 nm) lassen nur die Spektralanteile des sichtbaren Lichtes passieren, welche durch die Blutgefäße der Mukosa des Gastrointestinaltrakts maximal absorbiert werden. Die umliegenden, nicht durchblutenden Mukosaareale reflektieren verhältnismäßig große Anteile dieses Lichtes, sodass sich ein maximaler Kontrast zu den Blutgefäßen ergibt. Aufgrund der charakteristischen Gefäßstrukturveränderungen von Tumoren ist es möglich während der Koloskopie neoplastische und nichtneoplastische kolorektale Läsionen mit Hilfe des NBI-Verfahrens zu differenzieren. Häufig lässt sich durch seinen Einsatz jedoch keine signifikante Verbesserung der Detektionsrate der Weißlichtkoloskopie erzeugen (Sabbagh LC 2011, Nagorni A 2012, East JE 2012).

2.9.4 Konfokale Lasermikroskopie

Die Konfokale Lasermikroskopie (CLE) ermöglicht die mikroskopische Darstellung der Kolonmukosa während einer gewöhnlichen Lichtkoloskopie mit Hilfe einer Lasersonde (Becker V 2007). Aktuell sind zwei kommerziell verfügbare Systeme erhältlich: Beim „Tip-integrated“ System (*Pentax*, Japan, in Kooperation mit Opstican, Australien) ist die Lasereinheit in der Spitze eines konventionellen Koloskops integriert. Hervorzuheben sind die hohe Auflösung sowie die flexible Tiefe der konfokalen Bildebene. Durch die integrierte Lasereinheit im vorderen Teil des Koloskops sind die ersten 5 cm jedoch nicht flexibel, so dass insbesondere im oberen GI-Trakt nicht jeder Bereich eingesehen werden kann (Kitabatake S 2006). In diesem Projekt wurde mit dem proben-basierten konfokalen Laserendomikroskop (CLE, *Cellvizio*®, Confocal Miniprobe Mauna Kea Technologies, Frankreich) gearbeitet. Es handelt sich dabei um eine Sonde, an deren Spitze das Laserlicht appliziert wird. Diese Sonde lässt sich durch den Arbeitskanal eines konventionellen Lichtkoloskops auf die zu untersuchende Stelle im Gewebe führen. Dieses Verfahren bietet eine große Flexibilität und macht ein spontanes Einsetzen der Lasermikroskopie während einer Lichtkoloskopie möglich. Die Darstellung des mikroskopischen Mukosaaufbaus mittels CLE erfolgt durch die Kontrastierung der im

Gewebe befindlichen Gefäße. Zu diesem Zweck wird eine intravenöse Applikation des systemischen Kontrastmittels Fluoreszein durchgeführt. Fluoreszein ist eine leicht azidotische, hydrophile Färbesubstanz, welche innerhalb weniger Sekunden nach der intravenösen Applikation stark an das Serumalbumin bindet und somit das mukosale Gefäßbett zur Darstellung bringt (Gheonea DI 2011). Mit dem Einsatz von Fluoreszein ist die Bildqualität der CLE während der ersten 10 Minuten am höchsten (Becker V 2007). Der von der Sonde applizierte Laserstrahl dringt bis zu einer sondenspezifisch vordefinierten Tiefe (0-50 µm, 55-65 µm, 40-70 µm) in das zu untersuchende Gewebe ein, wodurch das sich in den Gefäßen dieser Ebene befindende Fluoreszein emittiert. Das emittierte Licht wird vom Detektor des Laserkoloskops empfangen. Mit Hilfe einer integrierten Blende wird emittiertes Licht anderer Ebenen herausgefiltert. Dadurch wird eine eindeutige horizontale (konfokale) Schnittebene mit definierter Schichtdicke durch das Gewebe erzeugt. Die einzelnen detektierten Lichtpunkte werden zu einem Rasterbild zusammengefügt, welches dem mikroskopischen Bild der jeweiligen Gewebsebene entspricht. Es stehen verschiedene Sonden mit vordefinierter Tiefe der konfokalen Bildebene sowie unterschiedliche Auflösungen für den jeweiligen Einsatzbereich zur Verfügung (siehe Tabelle 1). Mit einer Bildfrequenz von 12 Bildern pro Sekunde wird Videoqualität erreicht. Mit Hilfe eines speziellen Software-Algorithmus („Vessel Viewer“, Mauna Kea Technologies) können die mittlere Gefäßfläche, die Länge und der Durchmesser der einzelnen Gefäße in einem bestimmten Gewebsausschnitt ermittelt werden (Becker V 2008). Aufgrund der hohen Bildfrequenz der CLE können sogar die durch das Gefäß strömenden Erythrozyten sichtbar gemacht werden (Meining A 2007, Cannizzarro R 2012). Die CLE wird in Kliniken bereits im Ösophagus zur Untersuchung von intraepithelialen Neoplasien und Karzinomen verwendet (Becker V 2007) und zeigte beeindruckende Ergebnisse in der Diagnosestellung von Barrettmukosa und Frühkarzinomen (Kiesslich R et al 2006; Pohl H 2008). Die CLE eignet sich auch im Magen zur Unterscheidung von normaler Magenmukosa, intestinaler Metaplasie und Neoplasie (Yeoh KG 2005; Becker V 2007).

Produktname	Gastroflex™	Coloflex™	Cholangioflex™	AQ-Flex™	Alveoflex™
Kompatibler Arbeitskanal	≥ 2,8 mm	≥ 2,8 mm	≥ 1,2 mm	≥ 0,91 mm	≥ 1,9 mm
Länge	3 m	4 m	4 m	4 m	3 m
Einsatzbereich	ÖGD	ÖDG, Koloskopie	ERCP	Endosono- graphie, Feinnadel- aspiration	Broncho- skopie
Hauptpathologie	Barrett- ösophagus	Kolon- polypen, CED	Pankreatikobiliäre Strikturen	Pankreas- zysten	Periphere pulmonale Rundherde
Reichweite	240 µm	240 µm	325 µm	325 µm	600 µm
Konfokale Tiefe	55 - 65 µm	55 - 65 µm	40 - 70 µm	40 - 70 µm	0 - 50 µm
Auflösung	1 µm	1 µm	3,5 µm	3,5 µm	3,5 µm

Tabelle 1: Cellvizio® Confocal Miniprobes™ Summary Table,
http://www.synmed.co.uk/products/confocal_endomicroscopy/pdf/Cellvizio_Confocal_Miniprobes_Summary_Table_v1_EMEA.pdf.
(ÖGD = Ösophagogastroduodenoskopie, ERCP = Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatikographie, CED = Chronisch entzündliche Darmerkrankungen)

2.10 Anwendung der CLE im Kolon

Die Mukosa des Kolons ist charakterisiert durch die kryptenförmige Anordnung der sekretorischen Zellen und Epithelzellen. Durch die Fluoreszeinkontrastierung der Gefäße, welche sich im Stroma zwischen den Krypten befinden, erscheinen die Krypten im Querschnitt wie siebförmig angeordnete schwarze Kreise (siehe Abb. 2). Vaskuläre Veränderungen im Rahmen neoplastischen Wachstums können mit Hilfe der CLE dargestellt werden (Becker V 2007). Zwischen den Gefäßen stellt sich die neoplastisch veränderte Mukosa in Form von irregulären Epithelschichten und zunehmendem Verlust der physiologischen Kryptenstruktur dar. Anhand dieser Kriterien wurde eine Klassifikation erstellt, mit der retrospektiv in einer monozentrischen Studie neoplastische Veränderungen im Kolon mit einer Sensitivität von 97,4 % und einer Spezifität von 99,4 % erkannt werden konnten (Kiesslich R 2004). Darüber hinaus ermöglicht die CLE eine endomikroskopische Darstellung der Kollagenschichten unterhalb des Epithels. Im Falle bestehender entzündlicher

Prozesse (kollagene Kolitis) können gezieltere Biopsien durchgeführt werden (Kiesslich R 2006).

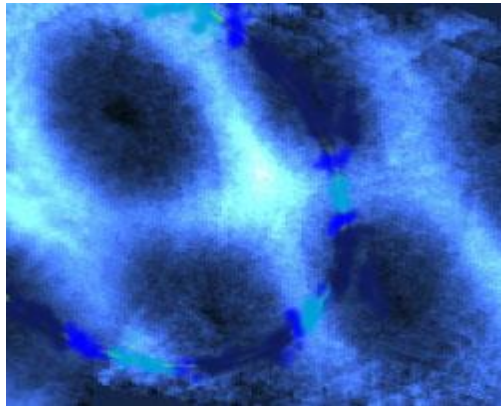


Abbildung 2: Lasermikroskopie-Aufnahme humaner physiologischer Kolonmukosa. Quelle: Becker V 2007

2.11 Mauskoloskopie

Mausmodelle für chronisch inflammatorische Darmentzündungen und Kolontumoren sind wichtige in vivo Modelle für die präklinische Forschung (Taketo MM 2006 und 2009, Wirtz S 2007). Eine endoskopische Darstellung des Mäusekolons ist somit sinnvoll. Im Laufe der letzten zehn Jahre wurde die Durchführung der Weißlichtkoloskopie an Mäusen von vielen Arbeitsgruppen durchgeführt (Huang EH 2002, Wirtz S 2002, Funovics MA 2003, Tumlinson AR 2006, Hariri LP 2006). Becker et al verfassten 2006 ein allgemeines Protokoll für hochauflösende Endoskopievorgänge in lebenden Mäusen (Becker C 2006). Sie zeigten, dass auch in den kleinen Dimensionen des Mäusekolons die Aufzeichnung von Bildern und Videos möglich ist, welche die Überwachung von Kolitisaktivität und Tumorgröße erlauben. Ferner wurde gezeigt, dass durch den Arbeitsgang des Koloskops die Entnahme von Biopsien sowie die lokale Applikation von Oberflächenfärbungen wie Methylenblau möglich ist (Becker C 2005). Somit sind eine Klassifikation von entzündlichen Vorgängen und das Grading von neoplastischem Wachstum im Mäusekolon in vivo möglich und haben nicht die zwangsläufige Tötung der Tiere und histologische Gewebsaufbereitung zur Folge. Dies vermindert die Zahl der zu verwendenden Tiere und ermöglicht die Beobachtung von inflammatorischem und neoplastischem Wachstum im Verlauf (Becker C 2006). Auch das Narrow Band Imaging (Waldner MJ 2011, Larghi A 2008) und die CLE (Jain RK 2002, Scaldaferrì F

2009, Goetz M 2010, Neurath MF 2010) wurden bereits erfolgreich im Mäusekolon angewandt. Durch die Züchtung spezieller transgener Mäuse und Knockout Mäuse kann die Rolle der jeweiligen Genmutation in der Entwicklung von Kolitis und Darmkrebs in vivo untersucht werden. Während der Koloskopie ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der Anatomie nur die ersten 4 Zentimeter des Mäusekolons einsehbar sind und dadurch nur Veränderungen im rektalen und distalen Kolonabschnitt einsehbar sind (Waldner MJ 2011). Das Endoskop sollte eine maximalen Arbeitsgangdicke von 3,5 mm nicht überschreiten und analog zu den Endoskopen, die für Patienten benutzt werden, eine integrierte Lichtquelle und Kamera besitzen, welche mit einem Monitor verbunden ist. Zur Entfaltung des Kolons kann NaCl 0,9 % Flüssigkeit, PBS (Puffer und Laborreagenzien) oder die Inflation von Luft sparsam verwendet werden. Die Platzierung des Arbeitsgangs 3 bis 5 mm vor die suspekte Läsion erlaubt eine genaue Darstellung dieser (Becker C 2006).

2.12 Mausmodell Tp53^{ΔIEC}

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von p53 in der Homöostase der intestinalen Epithelzellen und während der intestinalen Tumorentwicklung wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse des Genotyps Tp53^{ΔIEC} koloskopiert. Diese speziellen Knockout Mäuse entstehen aus einer Verpaarung zwischen Villin-Cre Mäusen (Madison BB 2002) und geflochten Tp53^{F/F} Mäusen (Jonkers J 2001) (siehe Abb. 3). Dabei wird p53 mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinations-Systems spezifisch in Villin-Gen exprimierenden Zellen inaktiviert. Villin ist ein Aktin bindendes Protein assoziiert mit dem Bürstensaum der Epithelzellen des Darmes sowie der proximalen und distalen Tubuli der Nierenrinde. Dabei ist die Rekombinase Cre an Villin gebunden und kann nur in Villin exprimierenden Zellen das geflochte p53-Gen ausschneiden. Den entstehenden Tp53^{ΔIEC} Mäusen fehlen die Exons 2 bis 10 des Tumorsuppressorgens p53 in ihren intestinalen Epithelzellen. In den Zellen der restlichen Gewebe bleibt p53 weiterhin aktiv. Die Hälfte der in diesem Projekt verwendeten Versuchstiere waren induzierbare Tp53^{ΔIEC} Mäuse. Diese Mäuse entstehen durch eine entsprechende Verpaarung von Villin-CreER^{T2} Mäusen mit p53 flox/flox Mäusen (Villin-CreER^{T2}/Tp53^{F/F}-Mäuse) (siehe Abb. 3). Bei Tieren mit induzierbarem Villin-Cre Knockout wurde Cre in den Zellen des Kolonepithels mit der

Ligandenbindungsdomäne von Estrogenrezeptoren fusioniert. Zur Induktion des kolonspezifischen p53-Knockout wurden diese Tiere mit Tamoxifen vorbehandelt. Tamoxifen, ein selektiver Estrogenrezeptormodulator, bindet an die modifizierten Estrogenrezeptoren, wodurch diese inklusive des Cre Rekombinase-Gens in den Zellkern transloziert werden (Feil R 1997, Metzger D 2001).

Ein Ziel der Erzeugung eines autochthonen, immunkompetenten Mausmodells, das glaubhaft die Morphologie und die genetischen Alterationen von menschlichen Tumorerkrankungen widerspiegelt, ist die funktionelle Untersuchung der biologischen Gegebenheiten in der Karzinogenese. Desweiteren kann ein Tiermodell mit diesen Fähigkeiten in präklinischen Studien zur Testung von neuen Medikamenten und chemischen Verbindungen benutzt werden, da ein solch komplexes Modell die therapeutische Effizienz verlässlicher vorhersagen kann als Xenograft- oder Transplantationsmodelle (Ellis LM und Fidler IJ 2010; Olive KP 2009). Die morphologische Erscheinung von p53 defizienten Kolontumoren von Mäusen als auch deren genetisches Profil haben große Ähnlichkeit mit dem invasiven Kolonkarzinom des Menschen. Folglich ermöglicht die AOM-initiierte $Tp53^{\Delta E/C}$ Maus durch die Möglichkeit der Analyse der verschiedenen Signalwege in den zellulären Untereinheiten des Tumormikroklimas die molekularen Mechanismen der Tumorentwicklung und -metastasierung besser zu verstehen. Zusätzlich eignet sich dieses Modell durch seine Tumorlokalisierung zur endoskopischen Überwachung im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Studien (Attardi LD 2005).

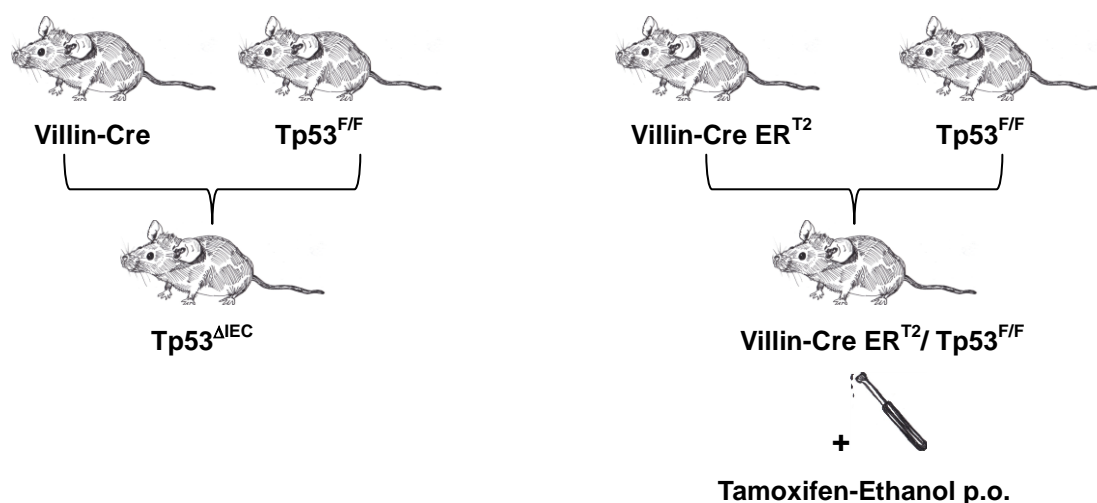


Abbildung 3: Kreuzungsschemata der verwendeten Mäuse mit Kolonepithelzellen spezifischem p53 Knockout

3 Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse des neuentwickelten Tp53^{ΔIEC} Knockout Modells mit der auf Miniprobebasierender konfokalen Laserendomikroskopie in vivo untersucht. Zentrales Thema ist die konfokale Darstellung der Angiogeneseprozesse in der Kolonmukosa und dem anschließenden Vergleich der vaskulären Gegebenheiten der karzinomatösen, adenomatösen, inflammatorischen und physiologischen kolorektalen Mukosa. Zur Überprüfung der Qualität konfokal ermittelter Ergebnisse wird ein Vergleich dieser Daten mit der immunhistochemisch aufbereiteten Kolonmukosa der einzelnen Tiergruppen als Goldstandard vollzogen. Durch die Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Sunitinib in der Karzinomgruppe wird eine therapeutisch wirksame antiangiogene Wirkung auf die kolorektale Karzinogenese evaluiert.

4 Material und Methodik

4.1 Mäuse

Die Mauskoloskopie mit anschließender histologischer Aufbereitung des Kolons stellt eine Intervention mit darauffolgender Organentnahme dar. Der Anzeigepflichtigkeit bei der Regierung von Oberbayern wurde nachgekommen.

4.1.1 Adenom- und Karzinommäuse

Die Tiere waren vom Maustyp $Tp53^{\Delta IEC}$ und $Villin-CreER^{T2}/Tp53^{F/F}$. Zur Induktion kolorektaler Neoplasien wurde den Tieren Azoxymethan (AOM) appliziert. Das Kanzerogen AOM induziert Mutationen im Exon 3 des CTNNB-Gens, was zu einer Stabilisierung von β -Catenin und somit zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt (Greten FR 2004), welcher eine der zentralen molekularen Prozesse der intestinalen Tumorentstehung darstellt (Fodde R 2001, Takahashi M 2000, Kishimoto Y 2002). Es stimuliert direkt Protoonkogene wie c-erbB-2, β Catenin, c-myc und Cyclin D1, deren verstärkte Expression eine direkte und indirekte onkogene Wirkung auf die Zellen der kolorektalen Mukosa haben, welche sich gegenseitig verstärken (Takahashi M 2004, Kishimoto Y 2002). Zusätzlich inhibiert AOM die GTPase Aktivität und somit den Abbau des Protoonkogens RasG (Takahashi M 2000, Kishimoto Y 2002).

Die $Villin-CreER^{T2}/Tp53^{F/F}$ -Mäuse wurden fünf Tage lang oral mit 100 μ l Tamoxifen-Ethanol vorbehandelt. Eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Applikation von AOM (20 μ l/gKG) erfolgte ab der 12. Lebenswoche am gleichen Wochentag in sechs aufeinander folgenden Wochen. Nach der letzten AOM-Substitution wurde die kolorektale Karzinogenese durch Wiegen an den Tagen 7, 14, 21, 28, 35 und 42 sowie durch die Beurteilung des Allgemeinzustands und des Verhaltens der Tiere überwacht. Die Adenommäuse wurden 11 Wochen, die Karzinommäuse wurden durchschnittlich 14 Wochen nach der ersten AOM-Applikation koloskopiert. Die Bestimmung des Zeitpunktes der interventionellen Durchführung war zusätzlich abhängig vom klinischen Zustand der Tiere.

4.1.2 Kolitismäuse

Drei Wildtypmäuse wurden für fünf aufeinanderfolgende Tage mit der Gabe von 3,5 % Dextransulfat (DSS), welches in das herkömmliche Trinkwasser gegeben wurde, vorbehandelt. DSS entsteht aus der Veresterung des Polysaccharids Dextran mit chlorschwefliger Säure (Angaben des Herstellers ICN Biomedicals). DSS wirkt direkt toxisch auf das Kolonepithel und beeinflusst die Interaktion von Immunzellen, Epithelzellen und extrazellulärer Matrix. Dadurch kommt es zu entzündlichen Veränderungen im Bereich des Kolons in Form von Erosionen und Ulzerationen des Mukosaepithels, Kryptenverlust sowie Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration (Cooper HS 1993; Ni J 1996). Klinische Zeichen einer DSS induzierten Kolitis sind Diarrhöen, Blutauflagerungen des Stuhls und Gewichtsverlust.

4.2 Koloskopie

4.2.1 Weißlichtendoskopie

Bei dem Lichtkoloskop handelte es sich um einen Prototyp eines flexiblen fiberoptischen Koloskops der Firma Storz mit einer Länge von 30 cm und einem Arbeitskanaldurchmesser von 3 mm. Die letzten 3 cm des Arbeitskanals waren flexibel und konnten mit Hilfe eines Reglers am Griff des Koloskops in zwei Ebenen bewegt werden. Die fiberoptischen Bilder wurden digitalisiert und auf einem mit dem Endoskop verbundenen Laptop gespeichert (siehe Abb. 4).

Präinterventionell wurden die Mäuse mit Hilfe einer Feedingkanüle fünf bis sechs Mal im Abstand von 30 Minuten mit der handelsüblichen Darmspüllösung Oralav® (B. Braun Melsungen AG) rektal gesäubert. Anschließend wurden die Tiere durch eine parenterale Injektion von 40 µl einer Kombinationslösung aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (MMF) narkotisiert:

- Medetomidin (Domitor®): α_2 -Agonist; muskelrelaxierendes, analgetisch und anxiolytisch wirkendes Sedativum aus der Gruppe der Imidazole. Konzentration 1mg/ml
- Midazolam (Dormicum®): analgetisch und anxiolytisch wirkendes Hypnotikum aus der Gruppe der Benzodiazepine. Konzentration 5 mg/ml

- Fentanyl (Fentanyl-Janssen®): analgetisch und sedierend wirkendes Opioid.
Konzentration 0,05 mg/ml

Um ein verletzungsfreies Eindringen des Koloskops zu gewährleisten, wurde Gleitgel auf den After der Tiere appliziert. Das Koloskop wurde vorsichtig 4 cm proximal in den Kolon geschoben. Dabei wurde die Mukosa auf das Bestehen von Polypen, Erosionen und Ulzerationen inspiziert. Zur besseren Darstellung des Kolons wurden zeitweilig 25 bis 50 µl 0,9 % NaCl-Lösung in den Arbeitskanal appliziert. Ein Koloskopiedurchgang dauerte im Durchschnitt 15 Minuten. Neben den oben aufgeführten Mausmodellen wurden zusätzlich Wildtypmäuse koloskopiert.

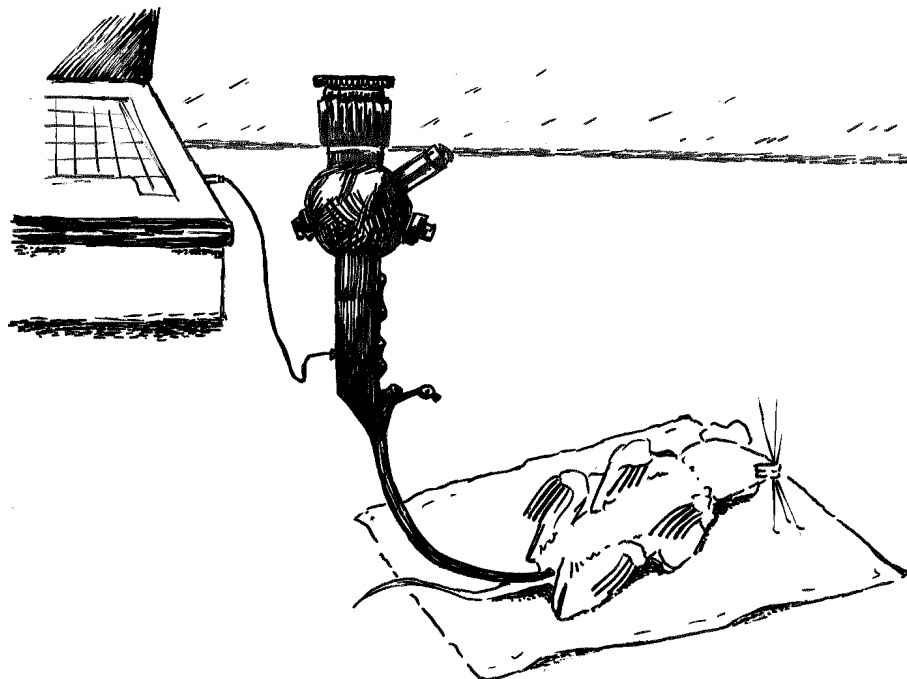


Abbildung 4: Vereinfachte Zeichnung der Durchführung der Mauskoloskopie auf der Arbeitsfläche im Labor unserer Arbeitsgruppe. Dargestellt ist das fiberoptische Koloskop der Firma Storz, welches mit einem den Koloskopievorgang aufzeichnenden Laptop verbunden war. Das manuelle Umgreifen des Koloskops und des Versuchstiers durch den Untersucher wurde aus Platzgründen nicht zur Darstellung gebracht

4.2.2 CLE

Bei der Sonde des proben-basierten konfokalen Laserendomikroskops handelte es sich um eine *Cholangioflex* der Firma Mauna Kea Technologies (siehe Tabelle 2). Diese war mit dem konfokalen Mikroskop verbunden.

Zur Darstellung der Gefäße wurde nach der Narkotisierung der Mäuse Fluoreszein in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9 % NaCl-Lösung mit Hilfe einer 0,45 µm breiten Kanüle

in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Nach erfolgreicher Applikation von 50 bis 100 µl Fluoreszeinlösung wurde umgehend mit der Durchführung der Lichtkoloskopie begonnen. Die Sonde wurde circa zwei bis fünf Minuten nach Beginn der Lichtkoskopie in den Arbeitsgang eingeführt. Die von der Lasereinheit fortlaufend produzierten Bilder (12 Bilder pro Sekunde) wurden auf dem Bildschirm des angeschlossenen PCs (*Life Vue*, *Cellvizio*®) wiedergegeben. Durch die hohe Bildfrequenz konnte die Koloskopie auf dem Bildschirm in Videoqualität verfolgt werden. Ein Lasermikroskopiedurchgang dauerte im Durchschnitt fünf bis zehn Minuten, in denen mehrere suspekten Stellen in Abwechslung mit physiologischer Mukosa aufgezeichnet wurden.

Cholangioflex	
Ref.: MP-0005-CLENGTH 4	
Äusserer Probendurchmesser	1 mm
Tiefe	55 µm
Reichweite	320 µm
Konfokale Tiefe	40 - 70 µm
Auflösung	3,5 µm
Länge	4 m

Tabelle 2: Technische Daten des in der Versuchsreihe benutzten CLE-Gallengangssonden-Typus (*Cellvizio*® Brochure 2011, Mauna Kea Technologies, http://www.lorenzatto.com/contents/images/stories/LORENZATTO/PDF/Cellvizio/cellvizio_gi_brochure_102011.pdf)

4.3 Histologie

Nach Beendigung des Koloskopievorganges wurden die Tiere im betäubten Zustand getötet. Das Abdomen wurde eröffnet und das Kolon bis auf das Caecum entfernt, mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült und längs aufgeschnitten. Das Kolon wurde auf Zellstoff ausgebreitet und die makroskopisch sichtbaren polypösen Veränderungen und bestehenden Einblutungen photodokumentiert (siehe Abb. 5 und 6).

Das Kolon wurde auf ein Holzstäbchen aufgerollt und 12 Stunden lang in 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelagert. Das in PFA fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (HM 355 S, Leica) in Schnittpräparate einer

Dicke von 3 μm geschnitten. Die Schnittpräparate wurden in einem 48 bis 50 °C heißen Wasserbad geglättet und auf einzelne Objektträger transferiert.

Insgesamt wurden HE gefärbte und VE-Cadherin gefärbte Schnittpräparate von fünf Karzinommäusen, vier Adenommäusen, drei Kolitismäusen und zwei Wildtypmäusen angefertigt.



Abbildung 5: Kolonresektat einer $\text{Tp53}^{\text{AIEC}}$ Knockout Maus aus der Karzinomgruppe



Abbildung 6: Nähere Aufnahme des Kolonresektats einer $\text{Tp53}^{\text{AIEC}}$ Knockout Maus aus der Karzinomgruppe. Die Pfeile markieren Einblutungen auf den polypös erhöhten Mukosastellen des distalen Kolonabschnitts, welche sich in der CLE und der histologischen Aufbereitung als karzinomatös veränderte Mukosaareale darstellten

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Zur Begutachtung der Histologie wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Vor der Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 %) für jeweils zwei Minuten rehydriert. Das Gewebe wurde eine Minute mit Hämatoxylin (Vector Laboratories®) gefärbt und danach mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Sekunden in einer drei prozentigen Eosinlösung inkubiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und zuletzt für weitere zehn Minuten in Xylol vollständig entparaffinisiert.

4.3.2 VE-Cadherin Färbung

Weitere Paraffinschnitte wurden mit einer immunhistochemischen Färbung für VE-Cadherin gefärbt. Dieses Molekül ist ein Adhäsionselement auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, auf welchen es homodimerische Verbindungen mit angrenzenden Zellen eingeht und zur Barrierefunktion der Blutgefäßendothelien beiträgt (Dejana E 2008, Venkiteswaran K 2002, Villasante A 2007). Die immunhistochemische Färbung dient der Identifizierung der Gefäßendothelien und somit der Darstellung der Vaskularisation in den verschiedenen Gewebesentitäten. Die Gewebsschnitte wurden für zehn Minuten in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe jeweils zwei Minuten rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gereinigt. Zur Permeabilisation der Zellmembran erfolgte für zehn Minuten ein Wasserstoffperoxidblock mit 3 % H₂O₂/PBS Lösung. Für die nukleäre Färbung wurden die Schnitte für 20 Minuten bei circa 300 Watt in einer Natriumcitratlösung (10 mM, pH 6) aufgekocht. Durch Nachschütten der Lösung wurde stets auf eine ausreichende Benetzung des Gewebes geachtet. Die Schnitte wurden danach bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgekühlt und in PBS gewaschen. Nach dem Streptavidinblock in 5 % Rabbit-Serum/PBS plus Streptavidin (vier Tropfen auf 1 ml) wurde der primäre VE-Cadherin Antikörper (in der Ziege generierter Antikörper, Santa Cruz®) in einer Verdünnung von 1:100 in 5 % Rabbit-Serum/PBS plus Biotin (vier Tropfen auf 1 ml) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei vier Grad Celcius in einem Kühlschrank unseres Labors gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach einer Reinigung in PBS mit dem Biotin markierten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 3 % BSA/PBS auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Zur gleichen Zeit wurde die ABC-Lösung (Avidin/Biotin-Peroxidase-Complex, je zwei Tropfen auf 5 ml PBS) für 30 Minuten bei vier Grad Celcius vorbereitet. Nach einer erneuten Reinigung der Schnitte in PBS wurde für weitere 30 Minuten die ABC-Lösung aufgetragen. Für die DAB (3, 3'Diaminobenzidine) Farbreaktion wurden zwei Tropfen H₂O₂, zwei Tropfen Puffer und vier Tropfen DAB-Lösung in 5 ml H₂O gegeben. Nach einer erneuten Zwischenlagerung in PBS wurde die Farbreaktion mit DAB vollzogen. DAB bindet spezifisch an die Antikörper gekennzeichneten Endothelzellen der Gefäße und färbt nur diese in einem mittel- bis dunkelbraunen Farbton. Die Lösung wurde auf einen

einzelnen Gewebsschnitt gegeben, welcher daraufhin unter einem Lichtmikroskop bis zum Eintritt der gefäßspezifischen Färbung beobachtet wurde. Dabei wurde die Zeit bis zum Wirkeintritt (vier bis sieben Minuten) gestoppt und die restlichen Schnitte anschließend ebenso lange mit DAB inkubiert. Nach der Färbung wurden die Schnitte in H₂O gewaschen, eine Minute mit Hämatoxylin gefärbt, erneut gewaschen, rehydriert und mit *Mounting Medium* (Vecamount®) eingedeckt (siehe H.E.-Färbung).

4.4 Statistische Auswertung

Die konfokal und histologisch ermittelten Mittelwert-Daten wurden in getrennten Strukturgleichungsmodellen dargestellt. Differenzen wurden mit Hilfe des T-Test-Verfahrens durch Benutzung von Prism 5 (Graph Pad Software Inc.) analysiert.

P-Werte ≤ 0.05 galten als signifikant.

4.4.1 Statistische Auswertung der CLE

Die vaskulären Daten wurden bei der CLE mit Hilfe der Vessel Viewing Software ermittelt. Diese erkennt tubuläre Strukturen und interpretiert sie als Gefäße. Dabei wurde die Gesamtfläche aller tubulären Strukturen in einer aufgenommenen konfokalen Standsequenz ermittelt und der Mittelwert gebildet. Die Einheit der mittleren Gefäßfläche wurde in μm^2 angegeben. Die durchschnittliche Gefäßlänge entsprach dem Mittelwert der Länge aller laserendoskopisch detektierten tubulären Strukturen. Die Einheit der Gefäßlänge wurde in μm angegeben. Insgesamt wurden die mittleren Gefäßflächen und Gefäßlängen von mindestens zehn Aufnahmen pro inspizierter Läsion quantifiziert.

4.4.2 Statistische Auswertung der VE-Cadherin Färbung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit dem *Axio Imager A1*-Lichtmikroskop der Firma Zeiss untersucht. Die dysplastischen, neoplastischen beziehungsweise entzündlichen Veränderungen innerhalb des Kolonepithels der Adenom-, Karzinom- und Koltismäuse wurden aufgesucht. Die Schnittpräparate der Wildtypmäuse wurden in denselben Arealen untersucht, in welchen die Mehrzahl der Läsionen in den anderen Mausgruppen gefunden wurden. Die luminale Mukosa (150 bis 200 μm) wurde in diesen Arealen in zehn facher Vergrößerung mittels einer

an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (Axiocam, Zeiss) photographisch dokumentiert. Mit Hilfe eines Bearbeitungsprogramms (AxioVision Release 4.5 SPI) wurden die Gefäßdichte pro Aufnahme (MVD) sowie das durchschnittliche Gefäßflächenverhältnis ermittelt. Die MVD entsprach dem gewebsentitätsspezifischen Mittelwert aus der Anzahl der Gefäße pro Aufnahme und besaß keine Einheit. Das Gefäßflächenverhältnis entsprach dem gewebsentitätsspezifischen Durchschnitt des Quotienten aus der tubulären Gesamtfläche einer mikroskopischen Aufnahme und der Fläche der Mikroskopaufnahme. Das mittlere Gefäßflächenverhältnis besaß ebenfalls keine Einheit. Die für jede Mausgruppe ermittelten MVD- und Gefäßflächenverhältniswerte der luminalen Mukosa wurden miteinander verglichen. Anschließend wurden die Gefäßflächenverhältnisse der luminalen Mukosa den konfokal ermittelten mittleren Gefäßflächen gegenüber gestellt.

4.5 Therapie mit Sunitinib

Sunitinib ist ein oraler multipler Inhibitor von in der Proliferation und Angiogenese beteiligten Tyrosinkinase-Rezeptoren wie VEGF-Rezeptor 1, 2 und 3, PDGF-Rezeptor a und b, Stammzellfaktor-Rezeptor c-KIT, FMS like Tyrosin Kinase 3 (FLT3), Colony stimulating Faktor 1 Rezeptor (CSF-1R) und Rezeptor der protoonkogenen Rezeptortyrosinkinase RET (Abrams TJ 2003, Kim DW 2006, Mendel DB 2003, Murray LJ 2003, O'Farrell AM 2003). Zum aktuellen Zeitpunkt ist eine Monotherapie mit Sunitinib für die Behandlung von humanen Nierenzellkarzinomen, Imatinib refraktären gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und fortgeschrittenen neuroendokrinen Pankreastumoren zugelassen (Goodman VL 2007, Adams VR 2007, Blumenthal GM 2012). Gegenwärtig wird die therapeutische Wirksamkeit von Sunitinib in vielen präklinischen und klinischen Studien für die Behandlung von Nebennierentumoren, Glioblastomen und Medulloblastomen evaluiert (Kroiss M 2012, Yang F 2010, Abouantoun TJ 2011, Chahal M 2010).

Drei Karzinommäuse wurden nicht zur histologischen Aufbereitung getötet. Ihre Narkose wurde nach erfolgter Koloskopie durch eine parenterale Injektion von 120 µl einer Kombinationslösung aus Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN) antagonisiert:

- Atipamezol (Antisedan®): α_2 -Antagonist, Antidot von Medetomidin. Konzentration 5 mg/ml
- Flumazenil (Anexate®): Benzodiazepin-Antagonist, Imidazobenzodiazepin-Derivat. Konzentration 0,1 mg/ml
- Naloxon (Narkanti Vet®): Opioid-Antagonist. Konzentration 0,4 mg/ml

Die Mäuse wurden anschließend für 14 Tage täglich oral mit Sunitinib 0,04 mg/g KG behandelt. Nach Beendigung der Behandlung wurden sie erneut koloskopiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lasermikroskopie dieselben Mukosaareale zur Darstellung brachte, welche beim ersten Koloskopiedurchgang aufgezeichnet wurden. Die mit Hilfe der Lasersonde ermittelten vaskulären Daten wurden den entsprechenden konfokalen Daten vor der Behandlung zum Vergleich gegenüber gestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Koloskopie

5.1.1 Koloskopie der Wildtypgruppe

Die Wildtypmäuse wiesen in der Lichtkoloskopie eine makroskopisch physiologische Kolonmukosa ohne polypöse Veränderungen oder verstärkte Gefäßzeichnung auf. Die mit Hilfe der Lasersonde erstellten konfokalen Aufnahmen zeigten einen regelmäßigen Kryptenaufbau mit einer auf das stromale Gewebe begrenzten Vaskularisation (siehe Abb. 7).

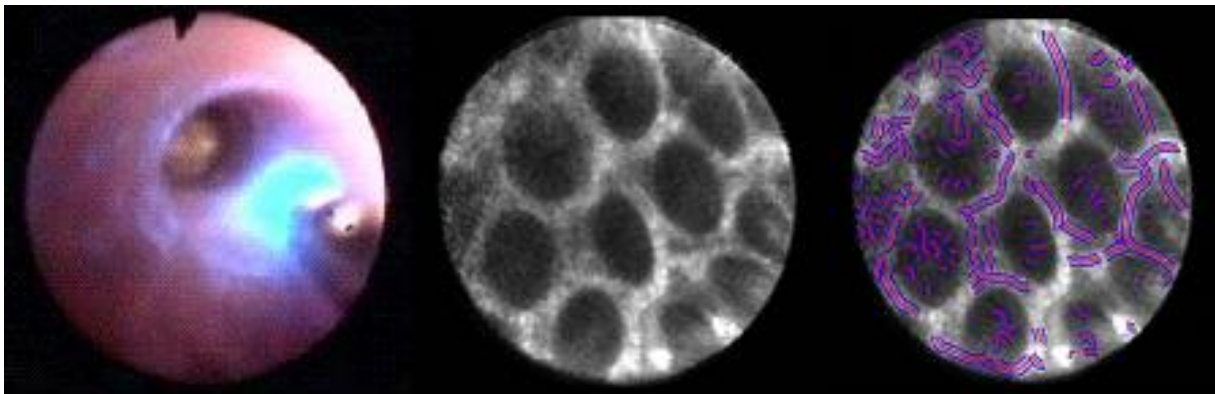


Abbildung 7:

Links: Lichtkroskopische Aufnahme des luminalen Kolonabschnitts einer Wildtypmaus mit physiologischer Kolonmukosa.

Mitte: Lasermikroskopische Aufnahme der kolorektalen Mukosa einer Wildtypmaus mit der probenbasierten CLE (*Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es zeigt sich das charakteristische Kryptenmuster der kolorektalen Mukosa.

Rechts: Bearbeitung der lasermikroskopischen Aufnahme der kolorektalen Mukosa einer Wildtypmaus mit Hilfe des Vessel Viewing Programms (*Life Vue, Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es sind Anzeichnungen tubulärer Strukturen gleichmäßigen Durchmessers innerhalb des Stromas der Mukosakrypten erkennbar, welche der Vaskularisation entsprechen.

5.1.2 Koloskopie der Adenomgruppe

Die $Tp53^{\Delta IEC}$ Mäuse, welche fünf Wochen nach der letzten AOM-Applikation koloskopiert wurden, wiesen lichtkologisch polypöse und breitbasige Mukosaprotrusionen vor allem 1 bis 1,5 cm proximal ab ano auf. Die lasermikroskopischen Aufnahmen zeigten im Bereich der größeren Polypen leichte bis mittelgradige Irregularitäten in der Kolonkryptenstruktur und der stromalen Vaskularisation. Dabei wies die Auswertung der vaskulären Verhältnisse mit Hilfe des Vessel Viewing Programms eine zunehmende Unregelmäßigkeit der Gefäßverläufe und Gefäßdurchmesser sowie eine Zunahme der Gefäßfläche und -länge auf (siehe Abb. 8).

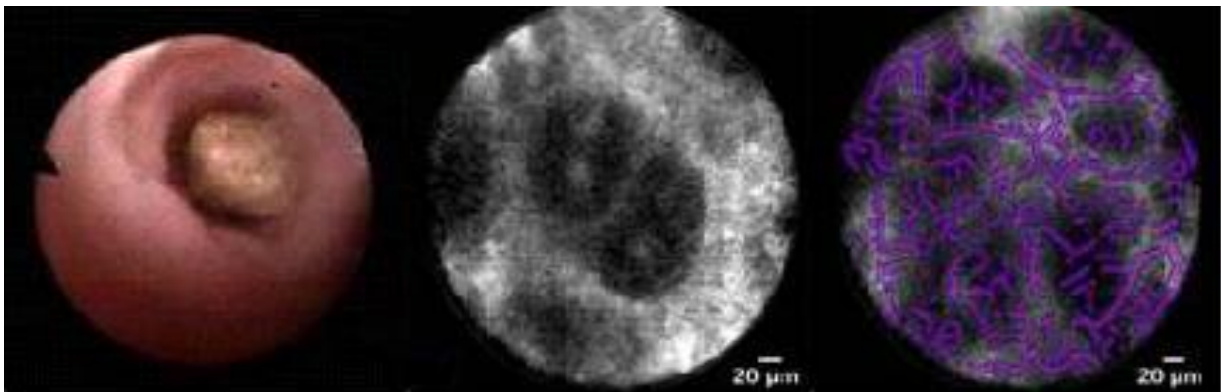


Abbildung 8:

Links: Lichtkologische Aufnahme des luminalen Kolonabschnitts einer $Tp53^{\Delta IEC}$ Knockout Maus fünf Wochen nach der letzten AOM-Applikation. Im basalen Areal der Kolonwand zeigt sich eine breitbasige Mukosaprotrusion. Mitte: Lasermikroskopische Aufnahme der kolorektalen Mukosa einer $Tp53^{\Delta IEC}$ Knockout Maus fünf Wochen nach der letzten AOM-Applikation mit der probenbasierten CLE (*Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Im Bereich des Polypen weist die Mukosa eine beginnende Aufhebung der regelmäßigen kolorektalen Kryptenstruktur auf. Rechts: Bearbeitung der lasermikroskopischen Aufnahme der kolorektalen Mukosa dieser $Tp53^{\Delta IEC}$ Knockout Maus mit Hilfe des Vessel Viewing Programms (*Life Vue, Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es zeigt sich ein zunehmend irregulärer Verlauf der Vaskularisation mit Infiltration der parenchymatösen Areale.

5.1.3 Koloskopie der Karzinomgruppe

Die Karzinome in den $Tp53^{AIEC}$ Mäusen wurden acht Wochen nach der letzten AOM-Applikation analysiert. Die Mehrzahl der karzinomatösen Läsionen befand sich 1 bis 1,5 cm proximal des Anus. Die lasermikroskopische Aufnahme in diesen Arealen zeigte eine Aufhebung des physiologischen Mukosaaufbaus mit vollständigem Verlust der charakteristischen Kryptenstruktur. Die fluoreszierenden Gefäße verliefen irregulär und durchsetzten die Enterozytenverbände. Die stellenweise zunehmende Intensität der Fluoreszenz wies auf eine lokale Gefäßdurchmesserzunahme und vaskuläre Lecks hin (siehe Abb. 9).

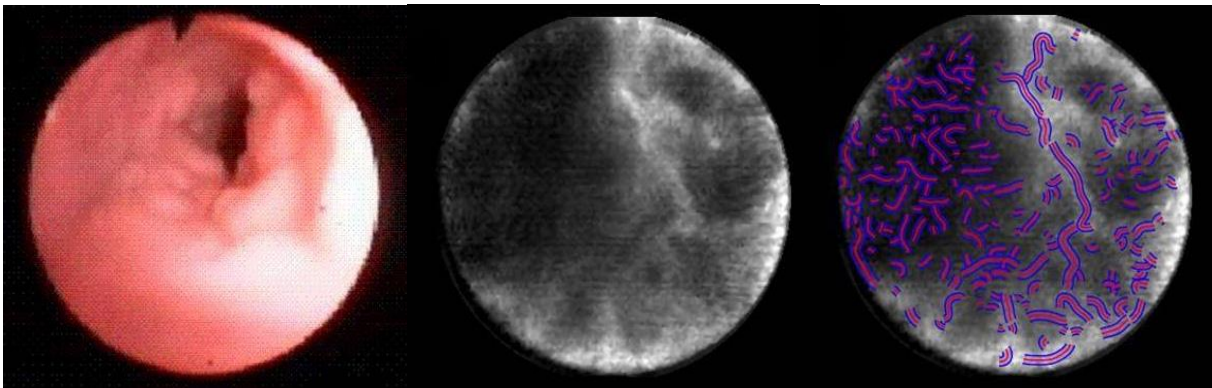


Abbildung 9:

Links: Lichtkoloskopische Aufnahme des luminalen Kolonabschnitts einer $Tp53^{AIEC}$ Knockout Maus acht Wochen nach der letzten AOM-Applikation mit multiplen polypösen, stenosierend wachsenden Tumoren der Mukosa.

Mitte: Lasermikroskopische Aufnahme der kolorektalen Mukosa einer $Tp53^{AIEC}$ Knockout Maus acht Wochen nach der letzten AOM-Applikation mit der probenbasierten CLE (*Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es zeigt sich eine vollständige Auflösung der physiologischen Kryptenstruktur.

Rechts: Bearbeitung der lasermikroskopischen Aufnahme der kolorektalen Mukosa dieser $Tp53^{AIEC}$ Knockout Maus mit Hilfe des Vessel Viewing Programms (*Life Vue*, *Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es zeigt sich ein unregelmäßiger Verlauf tubulärer Strukturen unterschiedlichen Durchmessers innerhalb der Stroma- und Parenchymzellareale.

5.1.4 Koloskopie der Kolitisgruppe

Die Lichtkoloskopie der Mäuse mit Kolitis zeigte Irritationen, Ulzerationen und verstärkte oberflächliche Vaskularisationszeichnungen in der kolorektalen Mukosa. Die lasermikroskopischen Aufnahmen der CLE wiesen einen physiologischen Kryptenaufbau mit einheitlicher stromaler Vaskularisation auf. Die Auswertung der vaskulären Gegebenheiten mit Hilfe des Vessel Viewer Programms ergab eine Zunahme der mittleren Gefäßfläche und -länge (siehe Abb. 10).

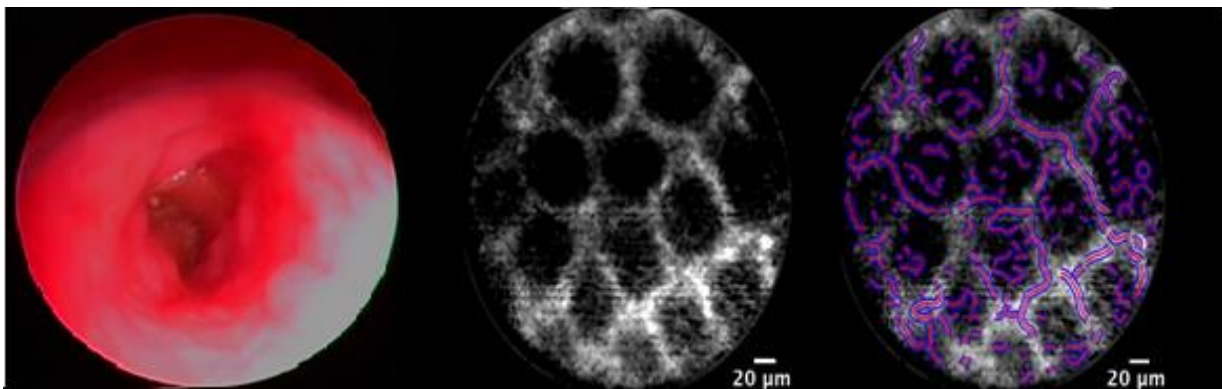


Abbildung 10:

Links: Lichtkoloskopische Aufnahme des luminalen Kolonabschnitts einer Maus mit Kolitis. Stellenweise sind die inflammatorisch bedingte erhöhte oberflächliche Gefäßzeichnung sowie die Irritationen der Kolonmukosa zu erkennen.

Mitte: Lasermikroskopische Aufnahme der kolorektalen Mukosa einer Koltismaus mit der probenbasierten CLE (*Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Der charakteristische Kryptenaufbau der kolorektalen Mukosa kommt zur Darstellung.

Rechts: Bearbeitung der lasermikroskopischen Aufnahme der kolorektalen Mukosa dieser Koltismaus mit Hilfe des Vessel Viewing Programms (*Life Vue*, *Cellvizio*®, Mauna Kea Technologies). Es zeigen sich beginnende Irregularitäten in den Verläufen der tubulären Strukturen.

5.2 Auswertung der erhobenen Daten der CLE

5.2.1 Konfokale Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinommäuse

Die Auswertung der konfokalen vaskulären Daten ergab eine signifikante Zunahme der mittleren Gefäßfläche der Adenomgruppe von 14,3 % gegenüber der Wildtypgruppe. Die mittlere Gefäßfläche der Karzinomgruppe war zusätzlich 8,2 % gegenüber der Adenomgruppe erhöht (siehe Abb. 11). Die Auswertung der mittleren Gefäßlänge zeigte einen mit 22,1 % erhöhten Wert der Adenomgruppe gegenüber der Wildtypgruppe und einen mit 6,5 % erhöhten Durchschnittswert der Karzinomgruppe gegenüber der Adenomgruppe (siehe Abb. 12).

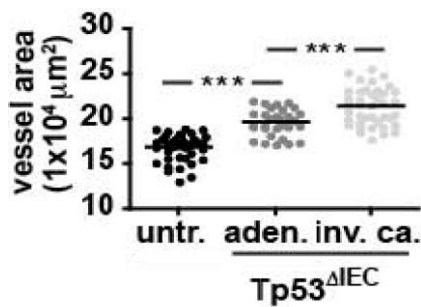


Abbildung 11: Konfokale Auswertung der Gefäßfläche

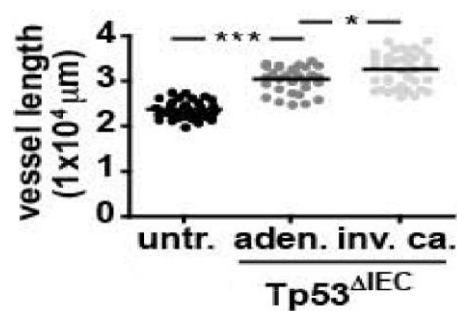


Abbildung 12: Konfokale Auswertung der Gefäßlänge

5.2.2 Konfokale Daten der Kolutismäuse

Die mittlere Gefäßfläche der Kolutismäuse war 15,7 % gegenüber den Wildtypmäusen erhöht, die mittlere Gefäßlänge zeigte einen um 22,7 % erhöhten Wert. Die konfokal erhobenen vaskulären Parameter der Kolutisgruppe waren somit vergleichbar mit den entsprechenden Werten der Adenomgruppe.

5.2.3 Vergleich der CLE der Karzinomgruppe vor und nach der Behandlung mit Sunitinib

Die Sunitinib-Therapie zeigte eine gute antiangiogene Wirkung in unserem Mausmodell. Die mittlere Gefäßfläche der Karzinomgruppe konnte durch die Sunitinib-Behandlung um 17,4 % reduziert werden. Die mittlere Gefäßlänge zeigte durch die Behandlung mit Sunitinib eine bemerkenswerte Reduktion um 23,7 % (siehe Abb. 14 und 15).

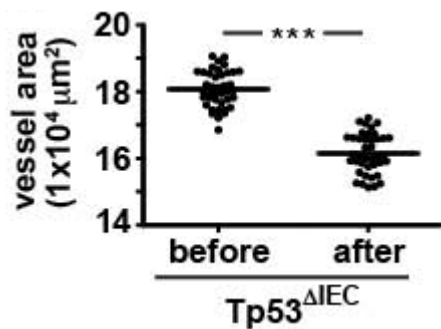


Abb. 14: Konfokale Gefäßfläche vor/nach Sunitinib

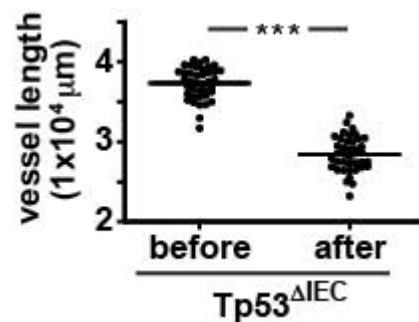


Abb. 15: Konfokale Gefäßlänge vor/nach Sunitinib

5.3 Histologische Aufbereitung

5.3.1 H.E.-Färbung

Bei der histologischen Aufbereitung wurde darauf geachtet, dass dieselben Areale des Kolorektums zur Darstellung kamen, welche bereits lichtkoloskopisch und lasermikroskopisch untersucht wurden (siehe Abb. 17, 18 und 19).

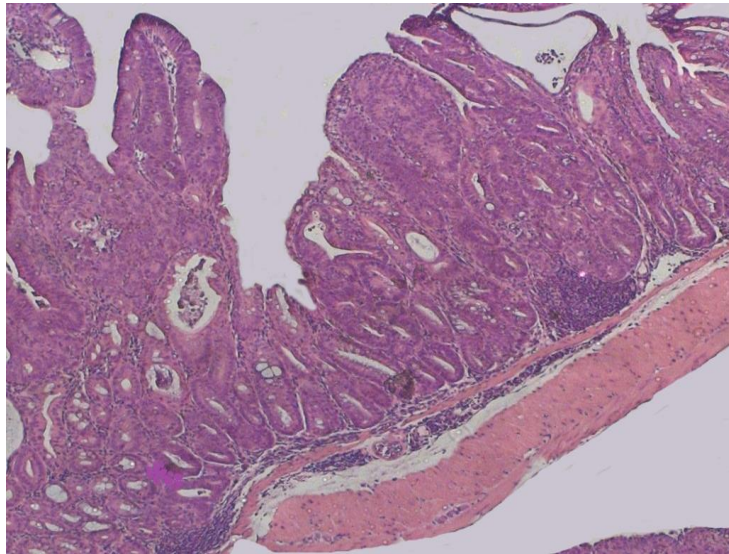


Abbildung 17: Kolorektales Adenom einer $Tp53^{\Delta IEC}$ Maus fünf Wochen nach der letzten AOM-Applikation. Weitgehende Auflösung der Kryptenarchitektur mit Zell- und Kernatypien. Keine Infiltration der Lamina propria. Lichtmikroskop von Zeiss (Axio Imager.A1), 5-fache Vergrößerung.

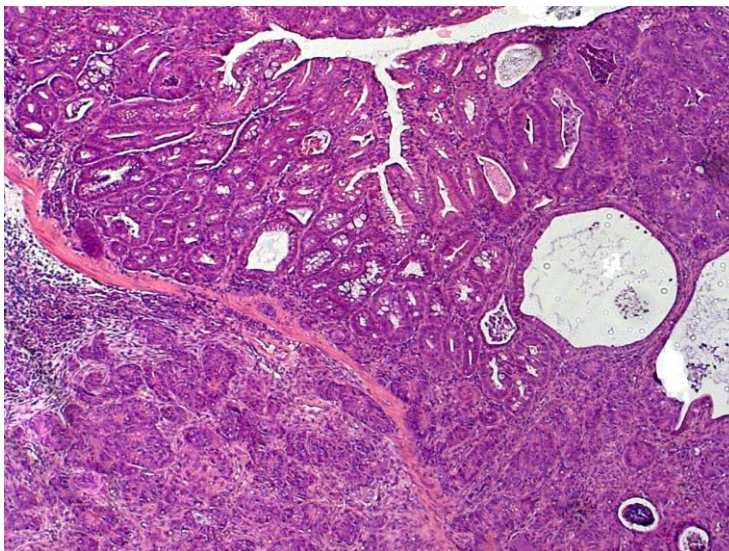


Abbildung 18: KRK einer $Tp53^{\Delta IEC}$ Maus neun Wochen nach der letzten AOM-Applikation. Invasives Tumorwachstum mit Infiltration der Lamina propria und Submukosa. Reaktive Infiltration durch Entzündungszellen und Pseudozystenbildung. Lichtmikroskop von Zeiss (Axio Imager.A1), 5-fache Vergrößerung.

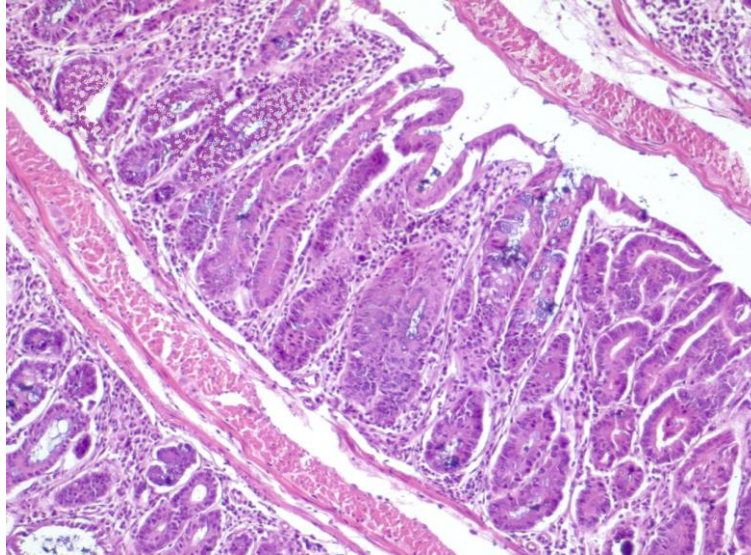


Abbildung 19: Kolitis einer mit 3,5 % Dextransulfat (DSS) behandelten Wildtypmaus. Entzündliche Reaktion in Form einer Ansammlung von Plasmazellen und Granulozyten innerhalb der Mukosa. Lichtmikroskop von Zeiss (Axio Imager.A1), 5-fache Vergrößerung.

5.3.2 VE-Cadherin Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Präparaten aus denselben Schnittreihen wie die H.E.-Färbungen angefertigt (siehe Abb. 20).

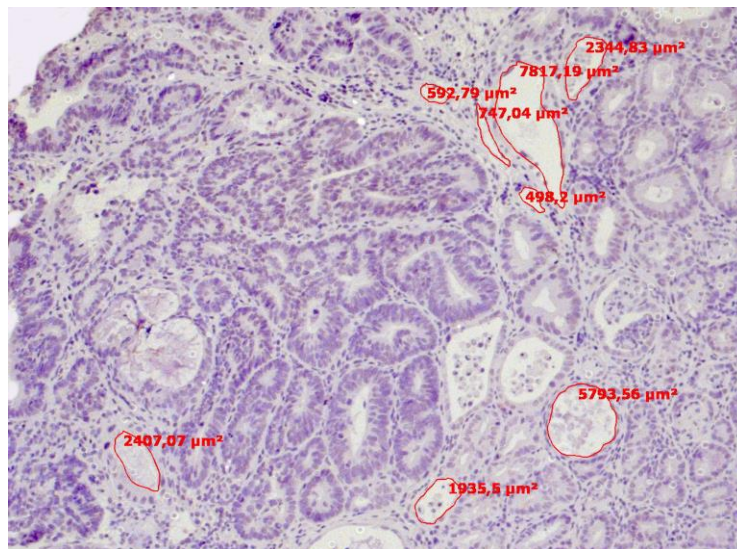


Abbildung 20: VE-Cadherin Färbung des KRC einer Tp53^{AIEC} Maus. Anzeichnung der Gefäße im Bereich des luminalen Mukosadrittels (0-150/200 μm) zur späteren Flächenberechnung. Lichtmikroskop von Zeiss (Axio Imager.A1), 10-fache Vergrößerung.

5.4 Auswertung der erhobenen Daten der VE-Cadherin Färbung

5.4.1 Immunhistochemische Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinommäuse

Im Bereich der luminalen Mukosa zeigte sich eine signifikante Erhöhung des mittleren Gefäßflächenverhältnisses der Karzinomgruppe gegenüber den restlichen Versuchsgruppen. Es handelte sich um eine 2,2-fache Erhöhung gegenüber dem mittleren Gefäßflächenverhältnis der Adenomgruppe, das wiederum 17,6-fach gegenüber dem Gefäßflächenverhältnis der Wildtypgruppe erhöht war (siehe Abb. 21).

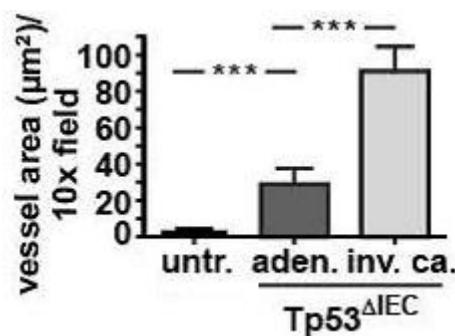


Abbildung 21: Immunhistochemische Auswertung des Gefäßflächenverhältnis

Die Auswertung der mittleren Gefäßfläche (MVD) zeigte ein inhomogenes Bild: Die MVD der Adenom- und der Karzinommäuse waren signifikant gegenüber der MVD der Wildtypmäuse erhöht. Die Adenomgruppe hatte mit 34,4 Gefäßen pro Aufnahme die höchste Gefäßdichte, gefolgt von der Karzinomgruppe mit 27,8 gezählten Gefäßen pro Aufnahme. Die Wildtypgruppe besaß eine MVD von 17 gezählten Gefäßen pro Aufnahme.

5.4.2 Immunhistochemische Daten der Koltismäuse

Das durchschnittliche Gefäßflächenverhältnis der Koltismäuse im Bereich der luminalen Mukosa war mit 84,6 % signifikant gegenüber dem Wert der Wildtypgruppe erhöht, entsprach jedoch nur 37,6 % des mittleren Gefäßflächenverhältnisses der

Adenomgruppe. Die Auswertung der MVD der Koltismäuse zeigte mit 26,9 gezählten Gefäßen pro Aufnahme eine signifikant höhere Gefäßdichte als die der Wildtypmäuse, war jedoch niedriger als der entsprechende Wert der Adenomgruppe.

6 Diskussion

6.1 Messung der kolorektalen Vaskularisierung in vivo und in vitro

Die Induktion eines angiogenen Switches, das heißt, der Hyperproliferation von Gefäßen, ist ein entscheidender Schritt in der Tumorentwicklung und in der Proliferation von Tumorzellen (Bergers G und Benjamin LE 2003). Die konfokale Laserendoskopie (CLE) macht sich dieses Malignitätsmerkmal zu Nutzen. In der vorliegenden Arbeit wurden $Tp53^{\Delta IEC}$ Mäuse lasermikroskopisch und histologisch untersucht. Das $Tp53^{\Delta IEC}$ Mausmodell enthält einen gezielten p53 Gen-Knockout innerhalb der Kolonmukosa. Laut des Multistep-Progressionsmodells der klassischen kolorektalen Karzinogenese ist der Verlust von p53 ein spätes Ereignis und assoziiert mit invasivem Wachstum (Fearon ER und Vogelstein B 1990, Levine AJ und Oren M 2009). Da der alleinige Verlust von p53 in den $Tp53^{\Delta IEC}$ Mäusen nicht zur spontanen intestinalen Tumorentstehung führt (Schwitalla S 2013), wurden die Tiere mit dem Kanzerogen AOM vorbehandelt, welches als Auslöser einer p53 abhängigen Zellapoptose innerhalb der ersten Stunden nach Applikation gilt (Toft NJ 1999). Das Mausmodell wurde in der Annahme entwickelt, dass nach Applikation von AOM die von p53 ausgelöste apoptotische Welle der Kolonepithelzellen ausbleibt und somit die AOM induzierte Zunahme der Epithelproliferation im Kolon nicht verhindert werden kann, was dann folglich zur Tumorentwicklung führt (Greten FR 2004; Qiu W 2009). Die lasermikroskopischen Ergebnisse wurden der histologischen Auswertung nach Entnahme von Gewebeproben gegenübergestellt um die Aussagekraft der Laserendomikroskopie zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden verschiedene vaskuläre Parameter sowohl elf als auch vierzehn Wochen nach der ersten AOM-Applikation erhoben, wobei die beiden Untersuchungszeitpunkte jeweils einem adenomatösen bis früh invasiven sowie einem spät invasiven, infiltrativ wachsenden Stadium der Karzinogenese entsprachen. Die histologische Auswertung der luminalen Mukosa entsprach dem durch das Weißlichtendoskop und der CLE

untersuchten Areal. Die Ergebnisse wurden mit Untersuchungen von Wildtyp- und Koltismäusen verglichen.

6.2 Vergleich der Ergebnisse

6.2.1 Auswertung der vaskulären Daten der Wildtyp-, Adenom- und Karzinomgruppe

Die mittlere Gefäßfläche ist ein vaskulärer Parameter, welcher mittels der CLE erhoben wurde und der histologischen Auswertung des Gefäßflächenverhältnisses im luminalen Mukosabereich gegenübergestellt werden kann. Die mittlere Gefäßfläche der Karzinomgruppe war signifikant gegenüber dem Durchschnittswert der Adenomgruppe erhöht, welcher wiederum signifikant gegenüber dem Durchschnittswert der Wildtypgruppe erhöht war. Das durchschnittliche Gefäßflächenverhältnis im luminalen Mukosabereich zeigte eine signifikante Erhöhung des Gefäßflächenverhältnisses der Karzinomgruppe um mehr als das Doppelte des mittleren Gefäßflächenverhältnisses der Adenomgruppe, welches bereits dem Vielfachen des durchschnittlichen Gefäßflächenverhältnisses der Wildtypgruppe entsprach. Die Ergebnisse aus der Laserendoskopischen Auswertung konnten somit durch die histologische Auswertung bestätigt werden. Bei der Auswertung der konfokal erfassten durchschnittlichen Gefäßlänge ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Auswertung der mittleren Gefäßfläche und des histologisch ermittelten Gefäßflächenverhältnisses. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der mittleren Gefäßlänge und dem gesteigerten Zellwachstum, wobei das adenomatös-hyperproliferative Wachstum eine erhöhte mittlere Gefäßlänge aufwies, jedoch erst ein malignes, infiltratives Zellwachstum eine erneute, signifikante Steigerung der durchschnittlichen Gefäßlänge zur Folge hatte. Durch diese Ergebnisse zeigt sich die gegenseitige Beeinflussung und positive Verstärkung von malignem Zellwachstum und intramukosaler Gefäßneubildung auf beeindruckende Art und es wird deutlich, dass nicht das neoplastische Wachstum an sich, sondern erst das infiltrative Tumorwachstum eine erneute Steigerung der Angiogenese zur Folge hat, welche mit Hilfe der CLE durch die Erfassung der erwähnten vaskulären Parameter festgestellt werden kann. Die histologisch ermittelte MVD stellte interessanterweise keinen

Prädiktor infiltrativen, malignen Wachstums dar, sondern wies lediglich unspezifisch auf eine erhöhte Zellproliferation innerhalb der Kolonmukosa hin.

Unsere Arbeitsgruppe führte an kolorektalen Tumoren von Tp53^{ΔIEC} Mäusen Microarray-Analysen und Genset-Anreicherungsanalysen durch und stellte eine zunehmende Expression von Ereg, Lama 4 und Angptl 2 fest (Schwitalla S 2013). Diese Gene codieren für die wichtigsten Angiogenesefaktoren, welche während der Tumorprogression einer zunehmenden Deregulation unterliegen (Nguyen DX 2009). Ferner konnte eine Hochregulierung von NFκB-abhängigen Genen festgestellt werden, die für Chemokine codieren, welche starke Lockstoffe für myeloide Zellen sind und dadurch die Tumorinvasion fördern (Murdoch C 2008). Mit diesen Ergebnissen unterstützt die vorgelegte Arbeit die Beobachtung, dass der Verlust von p53 in den Kolonozyten des Tp53^{ΔIEC} Mausmodells assoziiert ist mit der Hochregulierung von Genen der Chemotaxis, Prostaglandinsynthese und Inflammation sowie mit der verminderten Expression von Genen proapoptotischer Proteine wie Bax, Puma, Noxa, Trail und O6-Methylguanin Methyltransferase (Schwitalla S 2013). Andere hochregulierte Gene waren Gene der Zelladhäsion und -morphogenese, welche bekannte Regulatoren von Metastasierung und epithelial-mesenchymaler Transition sind, was wiederum einen der Schlüsselprozesse in der Invasion und Metastasierung solider Tumoren darstellt (Kim S 2009; Polyak K und Weinberg RA 2009; Yang J 2004). Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die von anderen Arbeitsgruppen postulierte Unterhaltung eines Leukozyten dominierten Mikroklimas durch den Kolonepithelzellen spezifischen Verlust von p53 innerhalb der Kolonmukosa im Rahmen einer AOM-induzierten Karzinogenese, welches assoziiert ist mit einem spezifischen inflammatorischen transkriptionellen Profil, das eine epithelial-mesenchymale Transition (Schwitalla S 2013, Huber MA 2004, Maier HJ 2010) sowie eine angiogenetische Hyperproliferation nach sich zieht (Karin M und Greten FR 2005; North S 2005).

6.2.2 Auswertung der vaskulären Daten der Kolitisgruppe

In der vorliegenden Arbeit diente die laserendomikroskopische Untersuchung von Mäusen mit Kolitis der Evaluation ob die mit Hilfe der CLE ermittelte erhöhte Angiogenese in der Adenom- und Karzinomgruppe spezifisch für die

Tumorentwicklung ist. Die vaskulären Daten der inflammatorisch veränderten Kolonmukosa waren in den konfokal erfassten Parametern mittlere Gefäßfläche und durchschnittliche Gefäßlänge vergleichbar mit den vaskulären Gegebenheiten der Adenomgruppe. Die Auswertung der histologisch erfassten Parameter mittleres Gefäßflächenverhältnis und MVD zeigte ebenfalls gegenüber der Wildtypgruppe erhöhte Werte in der Kolitisgruppe, diese waren jedoch nicht mit der Adenomgruppe vergleichbar. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die erhöhte Angiogenese zum einen nicht spezifisch für die Tumorentstehung ist und zum anderen die CLE als mikroskopische Bildgebungsmethodik zwar sehr sensitiv für die Detektion der Tumorentwicklung, jedoch nicht spezifisch für diese ist. Desweiteren unterschieden sich die konfokalen Aufnahmen der Kolitismukosa nicht von den konfokalen Aufnahmen der physiologischen Kolonmukosa der Wildtypiere, sodass keine Blickdiagnose gestellt werden konnte. Andere Arbeitsgruppen untersuchten entzündlich veränderte Kolonabschnitte von Patienten mit dem *Pentax*-System, welches mit 0,7 μm eine höhere maximale Auflösung als die auf Miniprobe basierende CLE besitzt (3,5 μm), und konnten anhand von Kryptenarchitektur, mikrovaskulären Alterationen und Fluoreszein-Lecks vielversprechende Marker in der Detektion inflammatorischer Aktivität etablieren (Li CQ 2010, Kiesslich R 2007). Nachteil des *Pentax*-Systems ist jedoch die Starrheit der konfokalen Lasersonde, welche am Ende des Arbeitsgangs eines konventionellen Koloskops fixiert ist. Aufgrund dieser Beschaffenheit ist es für die in vivo Endoskopie eines Mäusekolons mit einem Durchmesser von einigen Millimetern eher ungeeignet.

Durch die lasermikroskopische Untersuchung der Kolitis wird deutlich, dass das muköse Entzündungsgeschehen direkt durch angiogenesefördernde inflammatorische Mediatoren sowie indirekt durch die inflammatorisch bedingte Gewebshyperproliferation die Gefäßneubildung in der Kolonmukosa stimuliert. Es zeigt sich, dass inflammatorische Reize und neoplastisches, nicht infiltratives Wachstum zu vergleichbarer angiogener Hyperproliferation führen, welche wiederum eine wichtige Grundlage für die Tumorzellinvasion darstellt (Schwitalla S 2013). McLean et al untersuchten das stromale Microenvironment von kolorektalen Adenomen und fanden eine große Anzahl an Neutrophilen, T-Zellen und Makrophagen, von denen Letztere eine verminderte Sekretion des

antiinflammatorisch wirkenden Enzyms iNOS aufwiesen. Der Invasionsgrad dieser Entzündungszellen stieg mit der Größe des Adenoms und dem Grad der Dysplasie (McLean MH 2011). Zytokingene für CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20 und IL8 (Wang D 2006, Sabates-Bellver J 2007, Wen Y 2006) zeigten eine erhöhte, annähernd gleich starke Expression in Adenomen und Adenokarzinomen gegenüber normaler Kolonmukosa, was darauf schließen lässt, dass die Dysregulation der Zytokin- und Chemokinexpression und der daraus resultierenden Generierung eines inflammatorischen Umfelds einen frühen, prämaligen Schritt in der Tumorentstehung darstellt (McLean MH 2011). Zusätzlich fördern Zytokine wie IL-8 und CXCL1 die Angiogenese und wirken mitogen (Wang D 2006), was zum erhöhten KRK-Risiko von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beiträgt (Weedon DD 1973, Gyde SN 1980, Freeman HJ 2001, Eaden JA 2001, Maykel JA 2006, Langan RC 2007) und die gegen KRK protektive Einnahme von antiinflammatorisch wirkendem Aspirin® (Thun MJ 1991, Baron JA 2003, Sandler RS 2003, Benamouzig R 2003) molekularbiologisch untermauert.

6.2.3 Auswertung der Sunitinibtherapie

Nach der Behandlung der Karzinomgruppe mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib zeigte sich eine deutliche Reduktion der durchschnittlichen Gefäßfläche und der mittleren Gefäßlänge. Damit konnte die antiangiogene Wirkung von Sunitinib auf das KRK der Maus bewiesen und lasermikroskopisch dargestellt werden. Durch die Behandlung mit Sunitinib nähern sich die vaskulären Verhältnisse im Kolon der Tiere der Karzinomgruppe wieder den physiologischen Gegebenheiten an. Dieser Effekt der vaskulären Normalisierung durch Angiogeneseinhibitoren soll zur besseren Verteilung und Wirkungsweise von zytotoxisch wirkenden Substanzen wie Chemotherapeutika führen (Jain RK 2005). Durch eine Verringerung des Gefäßdurchmessers ergibt sich jedoch eine vaskuläre Minderversorgung der neoplastisch veränderten Gewebsabschnitte, wodurch es zu einer Hemmung und im besten Falle zu einem Rückgang des karzinomatösen Wachstums kommt (Winkler F 2004, Tong RT 2004, Izumi Y 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen, welche Sunitinib als Einzelsubstanz bei einer Vielzahl von soliden Tumorentitäten in vivo und in vitro einsetzten, beobachteten unterschiedliche Wirkungen von Sunitinib auf die

Tumorvaskularisation. Marzola et al stellten einen erhöhten vaskulären Blutfluss und eine verminderte vaskuläre Permeabilität durch die Behandlung eines Xenograft-Mausmodells für Kolonkarzinome mit Sunitinib fest, wodurch Sunitinib eine Tumorthherapie mit Chemotherapeutika optimieren könnte (Marzola P 2005). Im Gegensatz dazu beobachteten Olson et al eine Verminderung des Blutflusses in einem mit Sunitinib vorbehandelten Mausmodell für neuroendokrine Pankreastumoren (Olson P 2011). Auch in klinischen Studien wurde der therapeutische Einfluss von Sunitinib als Einzelsubstanz evaluiert. Respektive der palliativen Therapie von Nierenzellkarzinomen und gastrointestinalen Stromatumoren war der antitumoröse Effekt und die Verlängerung des Gesamtüberlebens moderat (Zhu AX 2009, Michaelson MD 2009, Novello S 2009), weswegen Sunitinib in vielen klinischen Studien in Kombination mit Chemotherapeutika wie Gemcitabine (Tran Cao HS 2010), Capecitabine (Sweeney CJ 2010), Cisplatin in einem Xenograft-Mausmodell (Castillo-Avila W 2009), Carboplatin und Paclitaxel (Heath EI 2010) sowie Docetaxel (Cumashi A 2008, Guérin O 2008) appliziert wurde. Zur Therapie des KRK wurde Sunitinib in klinischen Phase I und II Studien in Kombination mit FOLFOX (Yoshino T 2012), FOLFIRI (Starling N 2012), dem VEGF-Antikörper Bevacizumab (Rini BI 2010) sowie Irinotecan und dem EGFR-Antikörper Cetuximab (Qvortrup C 2010) gegeben. Bis auf die Kombination mit Paclitaxel und Carboplatin zeigte Sunitinib in den meisten oben aufgeführten Studien eine akzeptable Tolerabilität und trug zum progressionsfreien Überleben von mehreren Wochen bis zu einigen Monaten sowie gelegentlich zu einer partiellen Remission bei den meist multipel vorbehandelten Patienten bei. Saltz et al stellten in einer Phase II Studie keine bedeutenden antitumorösen Effekte durch eine Monotherapie mit Sunitinib in chemotherapieresistenten Kolonkarzinompatienten fest (Saltz LB 2007), so auch die Arbeitsgruppe von Tran Cao et al, welche eine Inhibierung des Tumorwachstums von Pankreaskarzinomen durch Sunitinib nur in der Kombination mit Gemcitabine beobachteten (Tran Cao HS 2010). Andere präklinische und klinische Studien kombinierten therapeutische Tumorbestrahlungen mit der Gabe von Sunitinib. Cuneo et al stellten eine Sensibilisierung von Pankreastumorzellen gegenüber anschließender Bestrahlung durch die vorige Gabe von Sunitinib fest, sodass in kombinierter Anwendung das Tumorwachstum signifikant gegenüber den jeweiligen

Monotherapien verzögert werden konnte (Cuneo KC 2008). Die Arbeitsgruppen von Schueneman und Zhang et al beschrieben eine signifikante Zunahme der Apoptoserate von humanen Endothelzellen in vitro und in vivo durch die Kombination von Sunitinib und Radiotherapie, was zu einem Rückgang der Tumorvaskularisation und darauffolgend dem Tumorwachstum führte (Schueneman AJ 2003, Zhang HP 2010). Bozec et al erzielten signifikante Ansprechraten von humanen Kopf-Halstumorzellen im Xenograftmausmodell mit der Dreifachkombination aus Sunitinib, Cetuximab und Bestrahlung (Bozec A 2009). Die in vivo präklinisch-therapeutische Wirkung von Sunitinib wurde von vielen anderen Arbeitsgruppen durch die Behandlung von Mausmodellen mit verschiedenen soliden Tumorentitäten evaluiert. In den meisten Fällen handelte es sich um Xenograft-Mausmodelle, wobei den Mäusen humane Karzinomzelllinien implantiert wurden (Marzola P 2005, Hillman GG 2009, Zhang L 2009, Bauerschlag DO 2010, Levashova Z 2010, Huynh H 2009, Tanaka Y 2011, Broutin S 2011, Bagi CM 2012). Weitaus weniger Arbeitsgruppen testeten die Wirkung von Sunitinib in genetisch veränderten Tumormausmodellen (Olson P 2011, Yoon SS 2009, Gandhi L 2009). Die meisten Arbeitsgruppen stellten eine Abnahme der Gefäßdichte (Marzola P 2005, Bauerschlag DO 2010, Huynh H 2009, Tanaka Y 2011, Olson P 2011, Yoon SS 2009) sowie eine Verminderung beziehungsweise Verzögerung des Tumorwachstums (Bauerschlag DO 2010, Tanaka Y 2011, Yoon SS 2009, Gandhi L 2009) durch eine erhöhte Apoptose von Tumor- und Endothelzellen (Yoon SS 2009) und eine verminderte Zellproliferation (Huynh H 2009) sowie eine erhöhte Zellnekrose (Tanaka Y 2011) fest. Widersprüchliche Ergebnisse wurden den Einfluss von Sunitinib auf die Metastasenbildung und -inhibierung betreffend festgestellt. Bauerschlag et al beobachteten einen Rückgang der peritonealen Metastasen von Ovarialkarzinomen (Bauerschlag DO 2010), wohingegen Bagi und Gandhi et al keinen Einfluss von Sunitinib auf die Entstehung von Mikrometastasen hepatozellulärer Karzinome beziehungsweise kleinzelliger Lungenkarzinome (Bagi CM 2012, Gandhi L 2009) sowie Tanaka et al keinen Einfluss auf Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomen im Mausmodell feststellen konnten (Tanaka Y 2011). Zusammenfassend stellt Sunitinib einen zuverlässigen Inhibitor von bestehender und neu entstehender Angiogenese in Mausmodellen und in Patienten dar, dessen Effekt

auf das Gewebe mit Hilfe der CLE detektiert werden kann. Aus den bescheidenen Ergebnissen der Monotherapieversuche mit Sunitinib geht jedoch hervor, dass ein reiner antivaskulärer Therapieansatz in der klinischen Praxis meist nicht zur signifikanten Tumorwachstumshemmung führt.

6.3 CLE

Die CLE erlaubt eine qualitativ hochwertige zelluläre, vaskuläre und stromale Bilddarstellung, die mit einem hohen Maß an Exaktheit intraepitheliale Neoplasien erfasst (Hurlstone DP 2008). Neoangiogenese ist ein zentrales Kriterium des Tumorwachstums (Folkman J 1971 und 1994, Sökmen S 2001) und deren Darstellung macht sich die CLE durch den Einsatz des intravenösen Farbstoffs Fluoreszein zu Nutze. Maligne entartete Mukosa weist eine höhere Gefäßdichte auf (Takebayashi Y 1996), der Aufbau des Gefäßbetts ist irregulär interkonnektierend und nicht den anatomischen arteriovenösen Gefäßübergang respektierend (Goel S 2011), die Morphologie ihrer Gefäße ist gewundener, dilatiert und hyperpermeabel (Jain RK 2005). Durch die Detektion dieser vaskulären Veränderungen konnte die CLE in vielen klinischen Studien bereits zur Verbesserung der in vivo Tumorsuche beitragen (Cannizzaro R 2012, Gheonea DI 2011 und 2010, De Palma GD 2010, Pohl H 2008, Becker V 2007, Kiesslich R 2006 und 2004). Es wurden zahlreiche Klassifikationssysteme der konfokal detektierbaren vaskulären und zellulären Veränderungen zur Standardisierung der CLE-Technik für den oberen (Liu H 2008) und unteren GI-Trakt erstellt (Miami Klassifikation von Wallace M 2011, Mainzer Kriterien von Kiesslich R 2004, Sanduleanu S 2010, Cannizzaro-Spessotto-Skala von Cannizzaro R 2012). Die Arbeitsgruppe von Kiesslich et al konnten mit einer Sensitivität von 97,4 % und einer Spezifität von 99,4 % neoplastische Veränderungen in der kolorektalen Mukosa von Patienten mit Hilfe der CLE darstellen (Kiesslich R 2004). Buchner et al stellten eine erhöhte Sensitivität der CLE gegenüber der Chromoendoskopie im Vergleich zur Histologie als Goldstandard (91 % versus 77 %) mit vergleichbarer Spezifität (76 % versus 71 %) in der histologischen Klassifikation endoskopisch untersuchter Kolonpolypen fest (Buchner AM 2010). Shahid et al zeigten, dass in der endomikroskopischen Untersuchung von Kolonpolypen unter 10 mm die CLE im Vergleich zum NBI eine höhere Sensitivität (86 % versus 64 %),

jedoch eine niedrigere Spezifität (78 % versus 92 %) aufwies. In der Kombination der beiden Untersuchungsmethoden ergab sich eine Sensitivitäts- und Spezifitätssteigerung auf 94 % beziehungsweise 97 %, was eine gemeinsame Anwendung der beiden Untersuchungsmethoden attraktiv erscheinen lässt (Shahid MW 2012). Sharma et al konnten in einer klinischen Multicenterstudie zur endoskopischen Untersuchung von Patienten mit bekannter Barrettmukosa des Ösophagus zeigen, dass durch die Durchführung der CLE eine höhere Sensitivität in der Detektion von hochgradigen Dysplasien und Frühkarzinomen (62,5 %) als mit der Weißlichtkoloskopie (34,2 %) und dem NBI (41,7 %) alleine erreicht werden konnte und deren kombinierter Einsatz zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität (75,8 %), jedoch nicht der Spezifität führte (92,7 % bei CLE und Weißlichtkoloskopie alleine; 90,5 % bei NBI alleine; 84,2 % in der Dreifachkombination) (Sharma P 2011). Jeon et al konnten in einer Singlecenterstudie mit einer Genauigkeit von 94,2 % Magenadenome und Magenadenokarzinome sowie die Unterscheidung Letzterer in differenzierte und undifferenzierte Adenokarzinome mit einer Genauigkeit von 95,4 % mit Hilfe der CLE diagnostizieren (Jeon SR 2011). Li et al zeigten eine konfokale Detektionsgenauigkeit von 90 % für hyperplastische Magenpolypen und Adenome mit einer Differenzierungsgenauigkeit von 97 % (Li WB 2010). Die CLE wird ebenfalls zunehmend in der Diagnostik pankreatikobiliärer Erkrankungen eingesetzt (Loeser CS 2011, Meining A 2008, Chen YK 2010, Stevens P 2009). Meining et al konnten mit einer Sensitivität von 98 % und einer Spezifität von 67 % kanzeröse Strikturen lasermikroskopisch während einer laufenden ERCP detektieren (Meining A 2011). Zur Optimierung der vaskulären Darstellung beziehungsweise der Verlaufsbeobachtung antiangiogener Therapieansätze entstehen zunehmend Studien, die sich mit der konfokalen Darstellung von Wachstumsfaktoren der Angiogenese im Sinne einer molekularen Bilddarstellung beschäftigen. Foersch et al benutzten die CLE zur Darstellung von neoplastischem Gewebe mit Hilfe der Injektion von Fluoreszenz gelabelten VEGF-Antikörpern. Ein spezifisches VEGF Signal konnte bei 87 % der konfokal untersuchten APC^{min/+} Mäuse und bei 90 % der Xenograft-Mäuse visualisiert werden (Foersch S 2010). Goetz et al konnten ein unterschiedliches Expressionsmuster von Fluoreszenz gelabelten EGFR-Antikörpern in neoplastischem und nicht neoplastischem kolorektalen Gewebe konfokal

darstellen (Goetz M 2010). Auch ein Antikörper gegen CD44v6, ein epithelialer Marker für paraneoplastische und neoplastische Läsionen des Kolons, konnte erfolgreich lasermikroskopisch im Bereich von aberranten Kryptenfoci dargestellt werden (Neurath MF 2010).

Die lasermikroskopische Untersuchung von Mäusen wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen durchgeführt (Foersch S 2010, Goetz M 2010, Waldner MJ 2011). Dabei erwies sich jedoch nur das auf Miniprobe basierende System von MaunaKea als sinnvolle Untersuchungsmethode, da aufgrund des schmalen Durchmessers der Laserproben kein operativer Eingriff zur Einführung notwendig ist (Jain RK 2002, Kim P 2010, Foersch S 2010). Aufgrund der kleinen anatomischen Verhältnisse ist die CLE im Mausmodell nur im Bereich des Kolorektums in vivo einsetzbar (Waldner MJ 2011). In diesem Bereich ist eine Darstellung des mikroskopischen Kolonkryptenaufbaus möglich und deren Bildqualität ist mit entsprechenden Aufnahmen von Patienten vergleichbar. Auch eine Kombination mit anderen bildgebenden Verfahren wie der Chromoendoskopie und dem NBI ist neben der Weisslichtkoloskopie möglich (Waldner MJ 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der zunehmende Einsatz der CLE in der Forschung und Klinik zeigen, dass diese neue Form der mikroskopischen Gewebesdarstellung großes Potential zur Präzisierung der in vivo Diagnostik hat und zur Reduktion von Biopsieentnahmen führen kann.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse mit Hilfe eines fiberoptischen Weißlichtkoloskops und der auf Miniprobe basierenden Laserendomikroskopie von *Cellvizio*® (CLE) endoskopisch untersucht. Das von unserer Arbeitsgruppe neu entwickelte Mausmodell $Tp53^{\Delta IEC}$ enthält einen Kolonepithelzellen spezifischen Knockout des Tumorsuppressorgens p53. Tiere dieses Maustyps wurden vor der Koloskopie als Adenom- und Karzinomgruppe mit dem Kanzerogen AOM sowie Wildtypmäuse mit DSS zur Entwicklung von Kolitis vorbehandelt. Die lasermikroskopisch ermittelten vaskulären Daten der kolorektalen Läsionen wurden mit entsprechenden Daten von Wildtyptieren verglichen, woraufhin eine Zunahme der Angiogenese in den pathologischen Mukosaentitäten mit einer signifikanten Zunahme der mittleren Gefäßfläche und Gefäßlänge der Karzinomgruppe festgestellt wurde. Tiere der Karzinomgruppe wurden mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Sunitinib oral behandelt und erneut koloskopierte, wodurch ein antiangiogener Effekt in Form einer Reduktion der vaskulären Messparameter durch die CLE festgestellt werden konnte. Die anschließend angefertigten und immunhistochemisch gefärbten kolorektalen Gewebepräparate wurden in ihren vaskulären Gegebenheiten miteinander und mit den entsprechenden lasermikroskopischen Daten verglichen. Die histologischen Präparate der pathologischen Mukosaentitäten zeigten ein erhöhtes Gefäßflächenverhältnis mit einem signifikant erhöhten Wert in der Karzinomgruppe. Schlussfolgernd waren die konfokal ermittelten vaskulären Daten mit der histologischen Auswertung vergleichbar, was die diagnostische Schärfe der CLE in der Mauskoloskopie bestätigte. Anhand dieser Ergebnisse zeigte die vorliegende Arbeit, dass die auf Miniprobe basierende CLE als bildgebende Methodik sehr sensitiv für die Detektion der erhöhten Angiogenese in der Tumorentstehung ist. Durch die konfokale Detektion ebenfalls erhöhter vaskulärer Parameter in der Kolitisgruppe ist sie jedoch nicht spezifisch dafür.

8 Literaturverzeichnis

1. Adler A, Roll S, Marowski B, Drossel R, Rehs HU, Willich SN, Riese J, Wiedenmann B, Rösch T; Berlin Private-Practice Gastroenterology Working Group. Appropriateness of colonoscopy in the era of colorectal cancer screening: a prospective, multicenter study in a private-practice setting (Berlin Colonoscopy Project 1, BECOP 1). *Dis Colon Rectum*. 2007 Oct;50(10):1628-38.
2. Algire GH, Legallais FY, Park HD. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants, *J. Natl Cancer Inst.* 6, 73–85 (1945).
3. American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*. 2001 Jul;121(1):195-7.
4. Attardi LD, Donehower LA. Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res*. 2005 Aug 25;576(1-2):4-21.
5. Axelrad AM, Fleischer DE, Geller AJ, Nguyen CC, Lewis JH, Al-Kawas FH, Avigan MI, Montgomery EA, Benjamin SB. High-resolution chromoendoscopy for the diagnosis of diminutive colon polyps: implications for colon cancer screening. *Gastroenterology*. 1996;110(4):1253.
6. Bagi CM, Gebhard DF, Andresen CJ. Antitumor effect of vascular endothelial growth factor inhibitor sunitinib in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012 May;24(5):563-74.
7. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):891-9.
8. Barritault D, Arruti C, Courtois Y. Is there a ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by eye-derived growth factors. *Differentiation*. 1981;18(1):29-42.

9. Bauerschlag DO, Schem C, Tiwari S, Egberts JH, Weigel MT, Kalthoff H, Jonat W, Maass N, Meinhold-Heerlein I. Sunitinib (SU11248) inhibits growth of human ovarian cancer in xenografted mice. *Anticancer Res.* 2010 Sep;30(9):3355-60
10. Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2900-4.
11. Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut.* 2005 July; 54(7): 950–954
12. Becker V, Delius S, Bajbouj M, Karagianni A, Schmid RM, Meining A. Intravenous Application of Fluorescein for Confocal Laser Scanning Microscopy: Evaluation of Contrast Dynamics and Image Quality with Increasing Injection-to-Imaging Time. *Gastrointest Endosc* 2008; 68 (2): 319-23
13. Becker V, Meining A. Confocal laser-fluorescence microscopy for detection of early neoplasia in the gastrointestinal tract. *Endo heute* 2007; 20: 1-6
14. Becker V, Meining A: High-Resolution Miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing. *Gastrointest Endosc* 2007 in press
15. Becker V, Vieth M, Bajbouj M, Meining A: Confocal laser scanning fluorescence microscopy for in vivo determination of microvessel density in Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2008; 40 (11): 888-91
16. Benamouzig R, Deyra J, Martin A, Girard B, Jullian E, Piednoir B, Couturier D, Coste T, Little J, Chaussade S. Daily soluble aspirin and prevention of colorectal adenoma recurrence: one-year results of the APACC trial. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):328-36.
17. Bergers G and Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
18. Bjerregaard NC, Tøttrup A, Sørensen HT, Laurberg S. Diagnostic value of self-reported symptoms in Danish outpatients referred with symptoms consistent with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2007 Jun;9(5):443-51.
19. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA.* 2008 Dec 17;300(23):2765-78.

20. Bollrath J, Pheesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T, Arkan MC, Ernst M, Greten FR. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009 Feb 3;15(2):91-102.
21. Bozec A, Sudaka A, Toussan N, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol*. 2009 Oct;20(10):1703-7.
22. Brooks DD, Winawer SJ, Rex DK, Zauber AG, Kahi CJ, Smith RA, Levin B, Wender R; U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer; American Cancer Society. Colonoscopy surveillance after polypectomy and colorectal cancer resection. *Am Fam Physician*. 2008 Apr 1;77(7):995-1002.
23. Broutin S, Ameur N, Lacroix L, Robert T, Petit B, Oumata N, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, Dupuy C, Bidart JM. Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 1;17(7):2044-54. Epub 2011 Feb 15.
24. Buchner AM, Shahid MW, Heckman MG, Krishna M, Ghabril M, Hasan M, Crook JE, Gomez V, Raimondo M, Woodward T, Wolfsen HC, Wallace MB. Comparison of probe-based confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps. *Gastroenterology*. 2010 Mar;138(3):834-42
25. Cannizzaro R, Mongiat M, Canzonieri V, Fornasarig M, Maiero S, De Re V, Todaro F, De Paoli P, Spessotto P. Endomicroscopy and cancer: a new approach to the visualization of neoangiogenesis. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:537170.
26. Castillo-Avila W, Piulats JM, Garcia Del Muro X, Vidal A, Condom E, Casanovas O, Mora J, Germà JR, Capellà G, Villanueva A, Viñals F. Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3384-95.

27. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456. Epub 2011 Jun 6.
28. Chapuis PH, Chan C, Dent OF. Clinicopathological staging of colorectal cancer: Evolution and consensus-an Australian perspective. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26 Suppl 1:58-64
29. Chen YK, Shah RJ, Pleskow DK et al. Miami Classification (MC) of probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) findings in the pancreaticobiliary (PB) system for evaluation of indeterminate strictures: interim results from an international multicenter registry. *Gastrointest Endosc*, 71 (2010), p. AB134
30. Chobanian SJ, Cattau EL Jr, Winters C Jr, Johnson DA, Van Ness MM, Miremadi A, Horwitz SL, Colcher H. In vivo staining with toluidine blue as an adjunct to the endoscopic detection of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*. 1987;33(2):99.
31. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003 Apr 1;138(7):560-70.
32. Conroy T, Hebbar M, Bennouna J, Ducreux M, Ychou M, Liédo G, Adenis A, Faroux R, Rebischung C, Kockler L, Douillard JY. Quality-of-life findings from a randomised phase-III study of XELOX vs FOLFOX-6 in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010 Jan 5;102(1):59-67. Epub 2009 Nov 17.
33. Cook AD, Single R, McCahill LE. Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Ann Surg Oncol*. 2005 Aug;12(8):637-45. Epub 2005 Jun 20.
34. Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic Study of Dextrane Sulfate Sodium Salt Experimental Murine Colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249
35. Cuenod CA, Fournier L, Balvay D, Guinebretière JM. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. *Abdom Imaging*. 2006 Mar-Apr; 31 (2): 188-93

36. Cumashi A, Tinari N, Rossi C, Lattanzio R, Natoli C, Piantelli M, Iacobelli S. Sunitinib malate (SU-11248) alone or in combination with low-dose docetaxel inhibits the growth of DU-145 prostate cancer xenografts. *Cancer Lett.* 2008 Nov 8;270(2):229-33. Epub 2008 Jun 30.
37. Cuneo KC, Geng L, Fu A, Orton D, Hallahan DE, Chakravarthy AB. SU11248 (sunitinib) sensitizes pancreatic cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Jul 1;71(3):873-9.
38. D'Amore PA, Glaser BM, Brunson SK, Fenselau AH. Angiogenic activity from bovine retina: partial purification and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):3068-72.
39. De Palma GD, Staibano S, Siciliano S, Persico M, Masone S, Maione F, Siano M, Mascolo M, Esposito D, Salvatori F, Persico G. In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy. *Dig Liver Dis.* 2010 Nov;42(11):791-7. Epub 2010 Apr 20.
40. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008 Jul 1;121(Pt 13):2115-22. Review
41. Delius S von, Feussner H, Wilhelm D, Karagianni A, Henke J, Schmid RM, Meining A. Transgastric in vivo histology in the peritoneal cavity using miniprobe-based confocal fluorescence microscopy in an acute porcine model. *Endoscopy* 2007;39: 407-411
42. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature.* 1985 Aug 22-28;316(6030):701-5.
43. Dos Santos CE, Lima JC, Lopes CV, Malaman D, Salomão AD, Garcia AC, Teixeira CR. Computerized virtual chromoendoscopy versus indigo carmine chromoendoscopy combined with magnification for diagnosis of small colorectal lesions: a randomized and prospective study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010;22(11):1364.

44. Dumitrescu A, Bălan G. Colorectal cancer--clinical course, epidemiologic and pathologic aspects. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2011 Jul-Sep;115(3):692-8.
45. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526–35.
46. East JE, Ignjatovic A, Suzuki N, Guenther T, Bassett P, Tekkis PP, Saunders BP. A randomized, controlled trial of narrow band imaging versus high definition white light for adenoma detection in patients at high risk of adenomas. *Colorectal Dis*. 2012 Sep 7. doi: 10.1111/codi.12014.
47. Eddy DM. Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 1990 Sep 1;113(5):373-84.
48. Ellis LM, Fidler IJ. Finding the tumor copycat. Therapy fails, patients don't. *Nat Med*. 2010 Sep;16(9):974-5.
49. Esch F et al. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 6507–6511 (1985).
50. Farraye FA, Odze RD, Eaden J *et al*. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 138 (2010), pp. 746–774
51. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
52. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237 (3), 752-757
53. Fennerty MB. Tissue staining. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1994;4(2):297.
54. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15–35; discussion, 35–16.
55. Ferrara, N. & Henzel, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161, 851–858 (1989).
56. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.

57. Fielding LP, Aresnault PA, Chapuis P *et al.* Working party report to the World Congresses of Gastroenterology, Sydney 1990. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991; 6:325–44.
58. Figueredo A, Rumble RB, Maroun J, Earle CC, Cummings B, McLeod R, Zuraw L, Zwaal C; Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline. *BMC Cancer.* 2003 Oct 6;3:26.
59. Fodde R, Smits R and Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1 2001; 55-67
60. Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Goetz M. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 2010;59:1046-1055
61. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186 (1971).
62. Freeman HJ. Colorectal cancer complicating Crohn's disease. *Can J Gastroenterol.* 2001 Apr;15(4):231-6.
63. Freeman HJ. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2008 March 28; 14(12): 1810–1811.
64. Fukuhara T, Hiyama T, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Characteristics of esophageal squamous cell carcinomas and lugol-voiding lesions in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(2):e27.
65. Funovics MA *et al.* Miniaturized multichannel near infrared endoscope for mouse imaging. *Mol. Imaging* 2, 350–357 (2003).
66. Gandhi L, McNamara KL, Li D, Borgman CL, McDermott U, Brandstetter KA, Padera RF, Chirieac LR, Settleman JE, Wong KK. Sunitinib prolongs survival in genetically engineered mouse models of multistep lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009 Apr;2(4):330-7. Epub 2009 Mar 31.
67. Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem.* 1978 May 25;253(10):3736-43.

68. Gheonea DI, Saftoiu A, Ciurea T, Popescu C, Georgescu CV, Malos A. Confocal laser endomicroscopy of the colon. *J Gastrointest Liver Dis.* 2010 Jun;19(2):207-11.
69. Giler S, Kadish U, Urca I. Use of tolonium chloride in the diagnosis of malignant gastric ulcers. *Arch Surg.* 1978;113(2):136.
70. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, Benedetti J, Francini G, Shepherd LE, Francois Seitz J, Labianca R, Chen W, Cha SS, Heldebrant MP, Goldberg RM. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22 (10): 1797–1806
71. Gimbrone MA, Leapman S, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *Journal of Experimental Medicine* 1972; 136 (2): 261-276.
72. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011 July; 91(3): 1071–1121.
73. Goetz M, Toermer T, Vieth M, Dunbar K, Hoffman A, Galle PR, Neurath MF, Delaney P, Kiesslich R. Simultaneous confocal laser endomicroscopy and chromoendoscopy with topical cresyl violet. *Gastrointest Endosc.* 2009 Nov;70(5):959-68
74. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2010 Feb;138(2):435-46. Epub 2009 Oct 21.
75. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF and Karin M (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118, 285-296.
76. Grinnell RS. Lymphatic Metastases of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Ann Surg.* 1950 Apr;131(4):494-506.
77. Grivennikov SI, Greten FR and Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.

78. Guérin O, Formento P, Lo Nigro C, Hofman P, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Merlano M, Ferrero JM, Milano G. Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Jan;134(1):51-7. Epub 2007 Jun 26.
79. Gyde SN, Prior P, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN. Malignancy in Crohn's disease. *Gut*. 1980 December; 21(12): 1024–1029.
80. Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth B. German cancer statistics 2004. *BMC Cancer*. 2010; 10: 52.
81. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009 Oct 12;4:22.
82. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
83. Hashimoto CL, Iriya K, Baba ER, Navarro-Rodriguez T, Zerbini MC, Eisig JN, Barbuti R, Chinzon D, Moraes-Filho JP. Lugol's dye spray chromoendoscopy establishes early diagnosis of esophageal cancer in patients with primary head and neck cancer. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(2):275.
84. He J, Stram DO, Kolonel LN, Henderson BE, Le Marchand L, Haiman CA. The association of diabetes with colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Br J Cancer*. 2010 Jun 29;103(1):120-6. Epub 2010 Jun 8.
85. Heinemann V, Hoff PM. Bevacizumab plus irinotecan-based regimens in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncology*. 2010;79(1-2):118-28. Epub 2010 Nov 22.
86. Hermsen M, Postma C, Baak J et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002;123:1109–19.
87. Hess KR, Varadhachary GR, Taylor SH, Wei W, Raber MN, Lenzi R, Abbruzzese JL. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*. 2006 Apr 1;106(7):1624-33.
88. Hillman GG, Singh-Gupta V, Zhang H, Al-Bashir AK, Katkuri Y, Li M, Yunker CK, Patel AD, Abrams J, Haacke EM. Dynamic contrast-enhanced magnetic

- resonance imaging of vascular changes induced by sunitinib in papillary renal cell carcinoma xenograft tumors. *Neoplasia*. 2009 Sep;11(9):910-20.
89. Hoffman A, Kagel C, Goetz M, Tresch A, Mudter J, Biesterfeld S, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Recognition and characterization of small colonic neoplasia with high-definition colonoscopy using i-Scan is as precise as chromoendoscopy. *Dig Liver Dis*. 2010 Jan;42(1):45-50. Epub 2009 May 26
 90. Hoffman A, Sar F, Goetz M, Tresch A, Mudter J, Biesterfeld S, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. High definition colonoscopy combined with i-Scan is superior in the detection of colorectal neoplasias compared with standard video colonoscopy: a prospective randomized controlled trial. *Endoscopy*. 2010 Oct;42(10):827-33
 91. Hariri LP et al. Endoscopic optical coherence tomography and laser-induced fluorescence spectroscopy in a murine colon cancer model. *Lasers Surg. Med*. 38, 305–313 (2006).
 92. Huang EH et al. Colonoscopy in mice. *Surg. Endosc*. 16, 22–24 (2002).
 93. Heath EI, Blumenschein GR Jr, Cohen RB, Lorusso PM, Loconte NK, Kim ST, Ruiz-Garcia A, Chao RC, Wilding G. Sunitinib in combination with paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced solid tumors: phase I study results. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Sep;68(3):703-12.
 94. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, and Wirth T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114, 569-581.
 95. Hurlstone DP, Baraza W, Brown S, Thomson M, Tiffin N, Cross SS. In vivo real-time confocal laser scanning endomicroscopic colonoscopy for the detection and characterization of colorectal neoplasia. *Br J Surg*. 2008 May;95(5):636-45
 96. Hurlstone DP, Kiesslich R, Thomson M, Atkinson R, Cross SS. Confocal chromoscopic endomicroscopy is superior to chromoscopy alone for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in chronic ulcerative colitis. *Gut*. 2008 Feb;57(2):196-204. Retraction in: *Gut*. 2008 Nov;57(11):1634
 97. Huynh H, Choo SP, Toh HC, Tai WM, Chung AY, Chow PK, Ong R, Soo KC. Comparing the efficacy of sunitinib with sorafenib in xenograft models of human

- hepatocellular carcinoma: mechanistic explanation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011 Oct;11(8):944-53.
98. Huynh H, Ngo VC, Choo SP, Poon D, Koong HN, Thng CH, Toh HC, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Song IC, Chang AP, Ong HS, Chung AY, Chow PK, Soo KC. Sunitinib (SUTENT, SU11248) suppresses tumor growth and induces apoptosis in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Sep;9(6):738-47.
 99. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Arch Intern Med*. 2006 Sep 25;166(17):1871-7.
 100. Iseki K, Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Ishiguro S. Helicobacter pylori infection in patients with early gastric cancer by the endoscopic phenol red test. *Gut*. 1998;42(1):20.
 101. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287 (2004), pp. G7–G17
 102. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*. 2002 Mar 21;416(6878):279-80.
 103. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):266-76. Review.
 104. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 7 January 2005. Vol. 307 no. 5706 pp. 58-62
 105. Jakobs R, Miola J, Eickhoff A, Adamek HE, Riemann JF. Endoscopic laser palliation for rectal cancer-- therapeutic outcome and complications in eighty-three consecutive patients. *Z Gastroenterol*. 2002 Aug;40(8):551-6.
 106. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
 107. Jeon SR, Cho WY, Jin SY, Cheon YK, Choi SR, Cho JY. Optical biopsies by confocal endomicroscopy prevent additive endoscopic biopsies before endoscopic submucosal dissection in gastric epithelial neoplasias: a prospective, comparative study. *Gastrointest Endosc*. 2011 Oct;74(4):772-80. Epub 2011 Jul 29.

108. Johnson PM, Gallinger S, McLeod RS. Surveillance colonoscopy in individuals at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an evidence-based review. *Dis Colon Rectum*. 2006 Jan;49(1):80-93; discussion 94-5.
109. Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat. Genet.*, 29 (2001), pp. 418–425
110. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239-52. doi: 10.1038/nrc2618. Epub 2008 Mar 12.
111. Karin M, and Greten FR (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5, 749-759.
112. Katsanos K, Sabharwal T, Adam A. Stenting of the lower gastrointestinal tract: current status. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2011;34:462–73.
113. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, Vieth M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):874-82
114. Kiesslich R, Goetz M, Schneider C et al. Confocal endomicroscopy as a novel method to diagnose colitis associated neoplasias in ulcerative colitis: a prospective randomized trial. (Presented on DDW, Chicago: 14-19 May 2005)
115. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 2004 Sep;127(3):706-13.
116. Kiesslich R, Goetz M, Burg J et al. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterol* 2005; 128: 2119-2123
117. Kiesslich R, Gossner L, Goetz M et al. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:979-987
118. Kiesslich R, Hoffmann A, Goetz M, Biesterfeld S, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. In vivo diagnosis of collagenous colitis by confocal endomicroscopy. *Gut* 2006; 55: 591-592

119. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF. Virtual histology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008;22(5):883-97
120. Kim P, Chung E, Yamashita H, Hung KE, Mizoguchi A, Kucherlapati R, Fukumura D, Jain RK, Yun SH. In vivo wide-area cellular imaging by side-view endomicroscopy. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):303-5.
121. Kim S, Takahashi H., Lin WW., Descargues P, Grivennikov S, Kim Y., Luo JL, and Karin M (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102-106.
122. Kirke R, Rajesh A, Verma R, Bankart MJ. Rectal cancer: incidence of pulmonary metastases on thoracic CT and correlation with T staging. *J Comput Assist Tomogr.* 2007 Jul-Aug;31(4):569-71.
123. Kishimoto Y, Morisawa T, Hosoda A, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J. Molecular changes in the early stage of colon carcinogenesis in rats treated with azoxymethane. *J Exp Clin Cancer Res.* 2002 Jun;21(2):203-11
124. Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R et al. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy* 2006; 38: 1110-1114
125. Klagsbrun M, Smith S. Purification of a cartilage-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1980 Nov 25;255(22):10859-66.
126. Köhne CH, Wils J, Lorenz M, Schöffski P, Voigtmann R, Bokemeyer C, Lutz M, Kleeberg C, Ridwelski K, Souchon R, El-Serafi M, Weiss U, Burkhard O, Rückle H, Lichnitser M, Langenbuch T, Scheithauer W, Baron B, Couvreur ML, Schmoll HJ; European Organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 15;21(20):3721-8. Epub 2003 Sep 8.
127. Kohli Y, Kato T, Ito S. Helicobacter pylori an chronic atrophic gastritis. *J Gastroenterol.* 1994;29 Suppl 7:105.
128. Kono S. Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:127-32.

129. Kwong LN, Dove WF. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2009;656:85-106.
130. Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skillinge DD. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2007 Nov 1;76(9):1323-30.
131. Leung EY, Roxburgh CS, Leen E, Horgan PG. Combined resection and radiofrequency ablation for bilobar colorectal cancer liver metastases. *Hepatogastroenterology.* 2010 Jan-Feb;57(97):41-6.
132. Leung WK, Ho KY, Kim WH, Lau JY, Ong E, Hilmi I, Kullavanijaya P, Wang CY, Li CJ, Fujita R, Abdullah M, Tandon R, Sung JJ; Asia Pacific Working Group on Colorectal Cancer. Colorectal neoplasia in Asia: a multicenter colonoscopy survey in symptomatic patients. *Gastrointest Endosc.* 2006 Nov;64(5):751-9.
133. Levashova Z, Backer M, Hamby CV, Pizzonia J, Backer JM, Blankenberg FG. Molecular imaging of changes in the prevalence of vascular endothelial growth factor receptor in sunitinib-treated murine mammary tumors. *J Nucl Med.* 2010 Jun;51(6):959-66. Epub 2010 May 19.
134. Levine AJ, and Oren M (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9, 749-758.
135. Li CQ, Xie XJ, Yu T, Gu XM, Zuo XL, Zhou CJ, Huang WQ, Chen H, Li YQ. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jun;105(6):1391-6
136. Lieberman DA, Weiss DG, Harford WV, Ahnen DJ, Provenzale D, Sontag SJ, Schnell TG, Chejfec G, Campbell DR, Kidao J, Bond JH, Nelson DB, Triadafilopoulos G, Ramirez FC, Collins JF, Johnston TK, McQuaid KR, Garewal H, Sampliner RE, Esquivel R, Robertson D. Five-year colon surveillance after screening colonoscopy. *Gastroenterology.* 2007 Oct;133(4):1077-85.
137. Liu H, Li YQ, Yu T, Zhao YA, Zhang JP, Zhang JN, Guo YT, Xie XJ, Zhang TG, Desmond PV. Confocal endomicroscopy for in vivo detection of microvascular architecture in normal and malignant lesions of upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Jan;23(1):56-61. Epub 2007 Nov 19.
138. Loeser CS, Robert ME, Mennone A, Nathanson MH, Jamidar P. Confocal endomicroscopic examination of malignant biliary strictures and histologic correlation with lymphatics. *J Clin Gastroenterol.* 2011 Mar;45(3):246-52

139. Loeve F, van Ballegooijen M, Snel P, Habbema JD. Colorectal cancer risk after colonoscopic polypectomy: a population-based study and literature search. *Eur J Cancer*. 2005 Feb;41(3):416-22. Review.
140. Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, Kelley PR, Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Nov;76(11):5674-8.
141. Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem*. 2002 Sep 6;277(36):33275-83. Epub 2002 Jun 13.
142. Maier HJ, Schmidt-Strassburger U, Huber MA, Wiedemann EM, Beug H, and Wirth T. (2010). NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 295, 214-228.
143. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
144. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ. Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science*. 1984 Mar 9;223(4640):1079-82.
145. Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Jul 2;89(13):948-55.
146. Marzola P, Degrassi A, Calderan L, Farace P, Nicolato E, Crescimanno C, Sandri M, Giusti A, Pesenti E, Terron A, Sbarbati A, Osculati F. Early antiangiogenic activity of SU11248 evaluated in vivo by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in an experimental model of colon carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5827-32.
147. Masaki T, Sheffield JP, Talbot IC, Williams CB. Non-polypoid adenoma of the large intestine. *Int J Colorectal Dis*. 1994;9(4):180.
148. Matsumoto T, Esaki M, Fujisawa R, Nakamura S, Yao T, Iida M
149. Maykel JA, Hagerman G, Mellgren AF, Li SY, Alavi K, Baxter NN, Madoff RD. Crohn's colitis: the incidence of dysplasia and adenocarcinoma in surgical patients. *Dis Colon Rectum*. 2006 Jul;49(7):950-7.

150. McQueen AS, Scott J. CT staging of colorectal cancer: What do you find in the chest? *Clin Radiol*. 2011 Dec 12.
151. McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat NA, Drew JE, El-Omar EM. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One*. 2011 Jan 7;6(1):e15366.
152. McMahon CJ, Rofsky NM, Pedrosa I. Lymphatic metastases from pelvic tumors: anatomic classification, characterization, and staging. *Radiology*. 2010 Jan;254(1):31-46.
153. Meining A, Bajbouj M, Schmid RM. Confocal fluorescence microscopy for detection of gastric angiodysplasia. *Endoscopy* 2007; 30: 407-411
154. Meining A, Chen YK, Pleskow D, Stevens P, Shah RJ, Chuttani R, Michalek J, Slivka A. Direct visualization of indeterminate pancreaticobiliary strictures with probe-based confocal laser endomicroscopy: a multicenter experience. *Gastrointest Endosc*. 2011 Nov;74(5):961-8. Epub 2011 Jul 29.
155. Meining A, Frimberger E, Becker V, Von Delius S, Von Weyhern CH, Schmid RM, Prinz C. Detection of cholangiocarcinoma in vivo using miniprobe-based confocal fluorescence microscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Sep;6(9):1057-60. Epub 2008 Jul 17.
156. Meining A, Rösch T, Kiesslich R, Muders M, Sax F, Heldwein W. Inter- and intra-observer variability of magnification chromoendoscopy for detecting specialized intestinal metaplasia at the gastroesophageal junction. *Endoscopy*. 2004;36(2):160.
157. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001; 24 (1): 71-80
158. Michaelson MD, Regan MM, Oh WK, Kaufman DS, Olivier K, Michaelson SZ, Spicer B, Gurski C, Kantoff PW, Smith MR. Phase II study of sunitinib in men with advanced prostate cancer. *Ann Oncol*. 2009 May; 20(5): 913–920.
159. Moore AE, Greenhough A, Roberts HR, Hicks DJ, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. HGF/Met Signalling Promotes PGE2 Biogenesis via Regulation of COX-2 and 15-PGDH Expression in Colorectal Cancer Cells. *Carcinogenesis*. 2009 Aug 3. Epub ahead of print

160. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, and Lewis CE (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 618-631.
161. Nagorni A, Bjelakovic G, Petrovic B. Narrow band imaging versus conventional white light colonoscopy for the detection of colorectal polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jan 18;1:CD008361.
162. Neurath MF, Kiesslich R. Molecular detection of CD44v6 on aberrant crypt foci by confocal laser endoscopy. *Endoscopy*. 2010;42 Suppl 2:E314-5. Epub 2010 Nov 26. No abstract available.
163. Nguyen DX, Bos PD, Massague J: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 274–284.
164. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextrane sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996; 39: 234-241.
165. Niveloni S, Fiorini A, Dezi R, Pedreira S, Smecuol E, Vazquez H, Cabanne A, Boerr LA, Valero J, Kogan Z, Mauriño E, Bai JC. Usefulness of videoduodenoscopy and vital dye staining as indicators of mucosal atrophy of celiac disease: assessment of interobserver agreement. *Gastrointest Endosc*. 1998;47(3):223.
166. Novello S, Scagliotti GV, Rosell R, Socinski ;MA, Brahmer J, Atkins J, Pallares C, Burgess R, Tye L, Selaru P, Wang E, Chao R, Govindan R. Phase II study of continuous daily sunitinib dosing in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2009 November 3; 101(9): 1543–1548.
167. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 2009 Jun 12;324(5933):1457-61.
168. Olson P, Chu GC, Perry SR, Nolan-Stevaux O, Hanahan D. Imaging guided trials of the angiogenesis inhibitor sunitinib in mouse models predict efficacy in

- pancreatic neuroendocrine but not ductal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 6;108(49):E1275-84. Epub 2011 Nov 14.
169. Orth K, Schölzel E, Beger HG. Cryotherapy in rectal cancer. A palliative local tumor treatment. *Chirurg*. 1992 May;63(5):421-5.
170. Qvortrup C, Jensen BV, Jorgensen TL, Nielsen D, Bjerregaard JK, Pfeiffer P. Addition of sunitinib to cetuximab and irinotecan in patients with heavily pre-treated advanced colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2010 Aug;49(6):833-6.
171. Park SY, Lee SK, Kim BC, Han J, Kim JH, Cheon JH, Kim TI, Kim WH. Efficacy of chromoendoscopy with indigocarmine for the detection of ascending colon and cecum lesions. *Scand J Gastroenterol*. 2008; 43 (7): 878-85
172. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
173. Pita Fernández S, Pértega Díaz S, López Calviño B, González Santamaría P, Seoane Pillado T, Arnal Monreal F, Maciá F, Sánchez Calavera MA, Espí Macías A, Valladares Ayerbes M, Pazos A, Reboredo López M, González Saez L, Montserrat MR, Segura Noguera JM, Monreal Aliaga I, González Luján L, Martín Rabadán M, Murta Nascimento C, Pueyo O, Boscá Watts MM, Cabeza Irigoyen E, Casmitjana Abella M, Pinilla M, Costa Alcaraz A, Ruiz Torrejón A, Burón Pust A, García Aranda C, de Lluc Bennasar M, Lafita Mainz S, Novella M, Manzano H, Vadell C, Falcó E, Esteva M. Diagnosis delay and follow-up strategies in colorectal cancer. Prognosis implications: a study protocol. *BMC Cancer*. 2010 Oct 5;10:528.
174. Pohl H, Roesch T, Vieth M, Koch M, Becker V, Anders M, Khalifa A, Meining A. Miniprobe confocal laser microscopy for the detection of invisible neoplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gut* 2008, 6-8
175. Polglase AL, McLaren WJ, Skinner SA, Kiesslich R, Neurath MF, Delaney PM. A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and lower-GI tract. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 686-695
176. Polyak K, and Weinberg RA (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.

177. Qiu W, Carson-Walter EB, Kuan SF, Zhang L, Yu J. (2009). PUMA suppresses intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 69, 4999-5006.
178. Ratiu N, Gelbmann C, Rath HR, Herfarth H, Kullmann F, Schölmerich J, Messmann H. Chromoendoscopy with indigo carmine in flexible sigmoidoscopy screening: does it improve the detection of adenomas in the distal colon and rectum? *J Gastrointest Liver Dis.* 2007; 16 (2): 153-6
179. Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Chemotherapy of colorectal cancer. *Internist (Berl).* 2009 Nov;50(11):1239-52. doi: 10.1007/s00108-009-2508-6.
180. Rex DK, Johnson DA, Lieberman DA *et al.* Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 2000;95:868–877.
181. Rini BI, Garcia JA, Cooney MM, Elson P, Tyler A, Beatty K, Bokar J, Mekhail T, Bukowski RM, Budd GT, Triozzi P, Borden E, Ivy P, Chen HX, Dolwati A, Dreicer R. A Phase I Study of Sunitinib plus Bevacizumab in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2009 October 1; 15(19): 6277–6283.
182. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. GEKID 2008; 36-38
183. Robertson R, Campbell C, Weller DP, Elton R, Mant D, Primrose J, Nugent K, Macleod U, Sharma R. Predicting colorectal cancer risk in patients with rectal bleeding. *Br J Gen Pract.* 2006 Oct;56(531):763-7.
184. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet.* 2010 Nov 20;376(9754):1741-50. Epub 2010 Oct 21.
185. Sabbagh LC, Reveiz L, Aponte D, de Aguiar S. Narrow-band imaging does not improve detection of colorectal polyps when compared to conventional colonoscopy: a randomized controlled trial and meta-analysis of published studies. *BMC Gastroenterol.* 2011 Sep 23;11:100.
186. Sabates-Bellver J, Van der Flier LG, de Palo M, Cattaneo E, Maake C, Rehrauer H, Laczko E, Kurowski MA, Bujnicki JM, Menigatti M, Luz J, Ranalli TV, Gomes V, Pastorelli A, Faggiani R, Anti M, Jiricny J, Clevers H, Marra G. Transcriptome

- profile of human colorectal adenomas. *Mol Cancer Res.* 2007 Dec;5(12):1263-75.
187. Saltz LB, Rosen LS, Marshall JL, Belt RJ, Hurwitz HI, Eckhardt SG, Bergsland EK, Haller DG, Lockhart AC, Rocha Lima CM, Huang X, DePrimo SE, Chow-Maneval E, Chao RC, Lenz HJ. Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 20;25(30):4793-9. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2008 Jan 20;26(3):514.
 188. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):883-90. Erratum in: *N Engl J Med.* 2003 May 8;348(19):1939.
 189. Sanduleanu S, Driessen A, Gomez-Garcia E, Hameeteman W, de Bruijne A, Masclee A. In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 Apr;8(4):371-8
 190. Sauer R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351 (17): 1731–1740
 191. Schoepfer A, Marbet UA. Colonoscopic findings of symptomatic patients aged 50 to 80 years suggest that work-up of tumour suspicious symptoms hardly reduces cancer-induced mortality. *Swiss Med Wkly.* 2005 Nov 19;135(45-46):679-83.
 192. Schueneman AJ, Himmelfarb E, Geng L, Tan J, Donnelly E, Mendel D, McMahon G, Hallahan DE. SU11248 maintenance therapy prevents tumor regrowth after fractionated irradiation of murine tumor models. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4009-16.
 193. Secco GB, Fardelli R, Gianquinto D, Bonfante P, Baldi E, Ravera G, Derchi L, Ferraris R. Efficacy and cost of risk-adapted follow-up in patients after colorectal cancer surgery: a prospective, randomized and controlled trial. *Eur J Surg Oncol.* 2002 Jun;28(4):418-23.
 194. Seitz JF, Monges G, Navarro P, Giovannini M, Gauthier A. Endoscopic detection of dysplasia and subclinical cancer of the esophagus. Results of a prospective

- study using toluidine blue vital staining in 100 patients with alcoholism and smoking. *Gastroenterol Clin Biol.* 1990;14(1):15.
195. Sharma P, Meining AR, Coron E, Lightdale CJ, Wolfsen HC, Bansal A, Bajbouj M, Galmiche JP, Abrams JA, Rastogi A, Gupta N, Michalek JE, Lauwers GY, Wallace MB. Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: final results of an international multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 2011 Sep;74(3):465-72. Epub 2011 Jul 13.
 196. Schmiegel W et al. S3-Guideline "Colorectal Cancer" 2004/2008
 197. Schwitalla S, Ziegler PK, Horst D, Becker V, Kerle I, Begus-Nahrman Y, Lechel A, Rudolph KL, Langer R, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Prazeres da Costa O, Neurath MF, Meining A, Kirchner T and Greten FR. Loss of p53 in enterocytes facilitates an inflammatory microenvironment enabling invasion and metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. Am 8.11.2012 bei *Cancer Cell* zur Veröffentlichung angenommen.
 198. Shahid MW, Buchner AM, Heckman MG, Krishna M, Raimondo M, Woodward T, Wallace MB. Diagnostic accuracy of probe-based confocal laser endomicroscopy and narrow band imaging for small colorectal polyps: a feasibility study. *Am J Gastroenterol.* 2012 Feb;107(2):231-9. doi: 10.1038/ajg.2011.376. Epub 2011 Nov 8.
 199. Sharma P, Weston AP, Topalovski M, Cherian R, Bhattacharyya A, Sampliner RE. Magnification chromoendoscopy for the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's oesophagus. *Gut.* 2003;52(1):24.
 200. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, Tijssen M, Beliën JA, de Wit M, Delis-van Diemen PM, Pontén F, van de Wiel MA, Fijneman RJ, Meijer GA. TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut.* 2011 Dec 29
 201. Smith G, Carey FA, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:9433-9438.

202. Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. *South Med J*. 1991 May;84(5):575-8.
203. Starling N, Vázquez-Mazón F, Cunningham D, Chau I, Tabernero J, Ramos FJ, Iveson TJ, Saunders MP, Aranda E, Countouriotis AM, Ruiz-Garcia A, Wei G, Tursi JM, Guillen-Ponce C, Carrato A. A phase I study of sunitinib in combination with FOLFIRI in patients with untreated metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2012 Jan;23(1):119-27. Epub 2011 Mar 29.
204. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer*. 1986 May 1;57(9):1866-70.
205. Stevens P. Real-time intraductal confocal microscopy during ERCP: Feasibility and technical considerations. *Gastrointest Endosc*, 69 (2009), p. AB267
206. Stevens PD, Lightdale CJ, Green PH, Siegel LM, Garcia-Carrasquillo RJ, Rotterdam H. Combined magnification endoscopy with chromoendoscopy for the evaluation of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*. 1994;40(6):747.
207. Sung MK, Yeon JY, Park SY, Park JH, Choi MS. Obesity-induced metabolic stresses in breast and colon cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jul;1229:61-8.
208. Sweeney CJ, Chiorean EG, Verschraegen CF, Lee FC, Jones S, Royce M, Tye L, Liau KF, Bello A, Chao R, Burris HA. A phase I study of sunitinib plus capecitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4513-20.
209. Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K. Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000 Jul;21(7):1319-27
210. Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*. 2004 Jun; 95(6):475-80. Review
211. Takenaka R, Kawahara Y, Okada H, Hori K, Inoue M, Kawano S, Tanioka D, Tsuzuki T, Uemura M, Ohara N, Tominaga S, Onoda T, Yamamoto K. Narrow-

- band imaging provides reliable screening for esophageal malignancy in patients with head and neck cancers. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(12):2942.
212. Taketo MM. Mouse models of gastrointestinal tumors. *Cancer Sci.* 97, 355–361 (2006).
213. Taketo MM & Edelman, W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* 136, 780–798 (2009).
214. Tanaka Y, Shibata MA, Morimoto J, Otsuki Y. Sunitinib suppresses tumor growth and metastases in a highly metastatic mouse mammary cancer model. *Anticancer Res.* 2011 Apr;31(4):1225-34.
215. Tannock, I. F. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br. J. Cancer* 22, 258–273 (1968).
216. Tatsuta M, Iishi H, Okuda S, Taniguchi H. Diagnosis of early gastric cancers in the upper part of the stomach by the endoscopic Congo red-methylene blue test. *Endoscopy.* 1984;16(4):131.
217. Thomas KA et al. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 6409–6413 (1985).
218. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991 Dec 5;325(23):1593-6.
219. Toft NJ, Winton DJ, Kelly J, Howard LA, Dekker M, te Riele H, Arends MJ, Wyllie AH, Margison GP and Clarke AR (1999). Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3911-3915.
220. Toth E, Sjolund K, Fork FT, Lindstrom C. Chronic atrophic fundic gastritis diagnosed by a modified Congo red test. *Endoscopy.* 1995;27(9):654.
221. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3731-6.
222. Tran Cao HS, Bouvet M, Kaushal S, Keleman A, Romney E, Kim G, Fruehauf J, Imagawa DK, Hoffman RM, Katz MH. Metronomic gemcitabine in combination

- with sunitinib inhibits multisite metastasis and increases survival in an orthotopic model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010 Jul;9(7):2068-78.
223. Tumlinson AR et al. Endoscope-tip interferometer for ultrahigh resolution frequency domain optical coherence tomography in mouse colon. *Opt. Express* 14, 1878–1887 (2006).
224. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S, Schlichting M, Zubel A, Celik I, Rougier P, Ciardiello F. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):2011-9. Epub 2011 Apr 18.
225. Venkiteswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins CC, Vincent PA, Pumiglia K, Kowalczyk AP. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;283(3):C811-21
226. Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):314-21.
227. Vogl T, Mack M, Straub R, Zangos S, Woitaschek D, Eichler K, Engelmann K (2001). Thermic Ablation of liver metastases. Current status and perspectives. *Radiologe* 41:49–55
228. Vogl TJ, Straub R, Eichler K, Söllner O, Mack MG. Colorectal carcinoma metastases in liver: laser-induced interstitial thermotherapy--local tumor control rate and survival data. *Radiology.* 2004 Feb;230(2):450-8. Epub 2003 Dec 19.
229. Waldner MJ, Wirtz S, Neufert C, Becker C, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy and narrow-band imaging-aided endoscopy for in vivo imaging of colitis and colon cancer in mice. *Nat Protoc.* 2011 Sep 1;6(9):1471-81.
230. Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, Richmond A, Strieter R, Dey SK, DuBois RN. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):941-51.

231. Webster AC, Craig JC, Simpson JM, Jones MP, Chapman JR. Identifying high risk groups and quantifying absolute risk of cancer after kidney transplantation: a cohort study of 15,183 recipients. *Am J Transplant*. 2007 Sep;7(9):2140-51.
232. Weedon DD, Shorter RG, Ilstrup DM, Huizenga KA, Taylor WF. Crohn's disease and cancer. *N Engl J Med*. 1973 Nov 22;289(21):1099-103.
233. Weitz J, Koch M, Kienle P, Schrödel A, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. Detection of hematogenic tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg*. 2000 Jul;232(1):66-72.
234. Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, Liu H, Shia J, Amenta PS, Barany F, Paty P, Gerald W, Notterman D. GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):5951-9.
235. Wilkinson N, Scott-Conner CE. Surgical therapy for colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):253-67.
236. Williams AC, Browne SJ, Manning AM, Hague A, van der Stappen JW, Paraskeva C. Biological consequences of the genetic changes which occur during human colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 1993 Jun;4(3):153-9.
237. Wilschut JA, Steyerberg EW, van Leerdam ME, Lansdorp-Vogelaar I, Habbema JD, van Ballegooijen M. How much colonoscopy screening should be recommended to individuals with various degrees of family history of colorectal cancer? *Cancer*. 2011 Sep 15;117(18):4166-74. doi: 10.1002/cncr.26009. Epub 2011 Mar 8.
238. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, Smith RA, Lieberman DA, Burt RW, Levin TR, Bond JH, Brooks D, Byers T, Hyman N, Kirk L, Thorson A, Simmang C, Johnson D, Rex DK. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2006 May-Jun;56(3):143-59; quiz 184-5.
239. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Wayne JD, Schapiro M, Panish JF, et al. Risk of colorectal cancer in

- the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med.* 1996 Jan 11;334(2):82-7.
240. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 2004 Dec;6(6):553-63.
241. Wirtz S, Becker C, Blumberg R, Galle PR, Neurath MF. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J. Immunol.* 168, 411–420 (2002).
242. Wirtz S & Neurath M.F. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1073–1083 (2007).
243. World Cancer Research Fund /American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, 2007.
244. Wright FC, Law CH, Berry S, Smith AJ. Clinically important aspects of lymph node assessment in colon cancer. *J Surg Oncol.* 2009 Mar 15;99(4):248-55.
245. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, and Weinberg RA (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
246. Yang J, Peng JY, Chen W. Synchronous Colorectal Cancers: A Review of Clinical Features, Diagnosis, Treatment, and Prognosis. *Dig Surg.* 2011 Dec 8;28(5-6):379-385.
247. Yeoh KG, Salto-Tellez M, Khor Cjl et al. Confocal laser endoscopy is useful for in vivo rapid diagnosis of gastric neoplasia and pre-neoplasia. (Presented on DDW, Chicago: 14-19 May 2005)
248. Yoon SS, Stangenberg L, Lee YJ, Rothrock C, Dreyfuss JM, Baek KH, Waterman PR, Nielsen GP, Weissleder R, Mahmood U, Park PJ, Jacks T, Dodd RD, Fisher CJ, Ryeom S, Kirsch DG. Efficacy of sunitinib and radiotherapy in

- genetically engineered mouse model of soft-tissue sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Jul 15;74(4):1207-16.
249. Yoshino T, Yamazaki K, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Yasui H, Boku N, Lechuga MJ, Hirohashi T, Shibata A, Hashigaki S, Yinhua L, Ohtsu A. Phase I Study of Sunitinib plus Modified FOLFOX6 in Japanese Patients with Treatment-naïve Colorectal Cancer *Anticancer Res* March 2012 32 (3) 973-979
250. Zhang HP, Takayama K, Su B, Jiao XD, Li R, Wang JJ. Effect of sunitinib combined with ionizing radiation on endothelial cells. *J Radiat Res.* 2011;52(1):1-8.
251. Zhang L, Smith KM, Chong AL, Stempak D, Yeger H, Marrano P, Thorner PS, Irwin MS, Kaplan DR, Baruchel S. In vivo antitumor and antimetastatic activity of sunitinib in preclinical neuroblastoma mouse model. *Neoplasia.* 2009 May;11(5):426-35.
252. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, Sindhvani V, Blaszkowsky LS, Yoon SS, Lahdenranta J, Bhargava P, Meyerhardt J, Clark JW, Kwak EL, Hezel EF, Miksad R, Abrams TA, Enzinger PC, Fuchs CS, Ryan DP, Jain RK. Efficacy, Safety, and Potential Biomarkers of Sunitinib Monotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase II Study. *J Clin Oncol.* 2009 June 20; 27(18): 3027–3035.

9 Dankvermerk

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Professor Dr. F. Greten für die Überlassung des Themas, die Unterstützung beim Erlernen der experimentellen Methoden und die immer sehr hilfreiche, konstruktive Kritik in der Durchführung und Abfassung dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. V. Becker danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Koloskopiereihen und für die wertvollen Anregungen bei der Abfassung meiner Dissertation.

Herrn Moritz Bennecke bin ich für die Einführung in die *in vivo* AOM-Applikation zu Dank verpflichtet.

Mein sehr herzlicher Dank gilt Frau Sarah Schwitalla für die Unterstützung bei der Etablierung der immunhistochemischen VE-Cadherin-Färbung und für ihr stets offenes Ohr für all meine Fragen.

Der Firma Mauna Kea Technologies danke ich für die Bereitstellung des probenbasierten konfokalen Laserendomikroskops und des zugehörigen Auswertungsprogramms (*Life Vue, Cellvizio*®).

Herrn Johannes Zeller danke ich für die Hilfe bei der Formatierung.

Meinen Eltern Norbert und Monika Kerle, meiner Schwester Lena und meinen Großeltern danke ich für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung meines Studiums, ohne welche ich nie diese Dissertation hätte schreiben können.

10 Publierte Ergebnisse

Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors

Sarah Schwitalla, Paul K. Ziegler, David Horst, Valentin Becker, Irina Kerle, Yvonne Begus-Nahrmann, André Lechel, K. Lenhard Rudolph, Rupert Langer, Julia Slotta-Huspenina, Franz G. Bader, Olivia Prazeres da Costa, Markus F. Neurath, Alexander Meining, Thomas Kirchner and Florian R. Greten.

Cancer Cell. 2013 Jan 14;23(1):93-106.

Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST) harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA

Jacqueline Maier, Thoralf Lange, Irina Kerle, Katja Specht, Melanie Brügel, Claudia Wickenhauser, Philipp Jost, Dietger Niederwieser, Christian Peschel, Justus Duyster, Nikolas von Bubnoff.

Clin Cancer Res. 2013 Sep 1;19(17):4854-67.

Symptom exacerbation in tourette syndrome due to bacterial reinfection

Dehning S, Matz J, Riedel M, Kerle IA, Müller N.

J Clin Psychiatry. 2009 Nov;70(11):1606)

A genetic variant of HTR2C may play a role in the manifestation of Tourette syndrome

Dehning S, Müller N, Matz J, Bender A, Kerle IA, Benninghoff J, Musil R, Spellmann I, Bondy B, Möller HJ, Riedel M, Zill P.

Psychiatr Genet. 2010 Feb;20(1):35-8)

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.