

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. Thomas Kirchner

**Untersuchung der Rolle von Krebsstammzellen und
Stromakomponenten durch Expression der Marker CD44
und CD166 für die Progression humaner kolorektaler
Karzinome**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johanna Wäschle

aus
(Geburtsort)
Filderstadt

Jahr
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Jung

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Herbst
Priv. Doz. Sebastian Stintzing

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
1.1	Das kolorektale Karzinom	3
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Der Lymphknotenstatus (N) ist ein Prognoseparameter	4
1.1.3	Pathologie des KRK	5
1.1.3.1	Das Tumorprogressions-Model	5
1.1.3.2	Verlust der funktionellen Regulation: The Hallmarks of Cancer	7
1.2	Das Krebsstammzell-Konzept	10
1.3	Identifikation von KSZ und Stromazellen durch die Oberflächenmarker CD44 und CD166	13
1.3.1	CD44	13
1.3.2	CD166	15
1.4	Hypothese	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Das Kollektiv	17
2.2	Sichten und Schneiden der Gewebeblöcke	17
2.3	Western Blot	17
2.3.1	Reagenzien	19
2.4	Immunhistochemie	20
2.4.1	Abfolge der Färbung	21
2.5	Mikroskopische Auswertung	21
2.6	Datenerfassung	21
2.7	Statistische Auswertungen	21
2.7.1	Powerberechnung des Kollektivs	21
2.7.2	Interrater-Reliabilitäts Berechnung anhand der Cohens Kappa Gleichung	21
2.7.3	Korrelation der Ergebnisse anhand von Kreuztabellen und 2-Analyse	22
3.	Ergebnisse	23
3.1	Eingesetzte CD44- und CD166-Antikörper binden Antigene spezifisch	23
3.2	Charakterisierung des eingesetzten Untersuchungskollektivs	24
3.3	Erstellung eines geeigneten Färbeindex zur Auswertung der Expression der KSSK- Marker CD44 und CD166 im KRK	25
3.4	KSSK- Marker CD44 und CD166 werden im KRK mit pushing border-Invasionsfront im Vergleich zum normalem Gewebe überexprimiert	28
3.5	Patientenalter und Expressionsstärke von CD44 bzw. CD166 korrelieren nicht miteinander	30
3.6	Bei KRK besteht keine Korrelation zwischen dem Auftreten von LK-Metastasen und einer erhöhten Expression der KSSK- Marker CD44 und CD166 an der PB-Invasionsfront	31
3.7	Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Unabhängigkeit der Auswertung	34
3.8	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	35
4.	Diskussion	36
5.	Zusammenfassung	42
6.	Literaturverzeichnis	44
7.	Abkürzungsverzeichnis	51
8.	Abbildungsverzeichnis	52
9.	Tabellenverzeichnis	52
10.	Danksagung	53
11.	Lebenslauf	54

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

In den westlichen Ländern stirbt jeder vierte Mensch infolge von Krebserkrankungen (Statistisches Bundesamt, 2007). Krebs wird in diesem Zusammenhang als: „alle bösartigen Neubildungen einschließlich primär systemische Lymphome und Leukämien“ definiert (Robert-Koch Institut, 2008). In Deutschland treten jährlich insgesamt 236.500 Neuerkrankungen auf (Robert-Koch Institut, 2008), wobei allein 57.000 Fälle auf das kolorektale Karzinom entfallen (24,2%). Bei Männern und Frauen, ist das kolorektale Karzinom (KRK) jeweils die zweithäufigste Krebserkrankung - nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen (Herold, 2007; Abb. 1). Das Lebenszeitrisiko der Bevölkerung für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms liegt bei 6% (Schalhorn, 2006). Etwa 45% der Erkrankten sterben innerhalb von 10 Jahren. Im Jahr 2004 verstarben über 25.000 Patienten in Deutschland an einem kolorektalen Karzinom (Robert Koch Institut, 2008) und zwar meist an den Folgen von Fernmetastasierung (O’Connell et al, 2004).

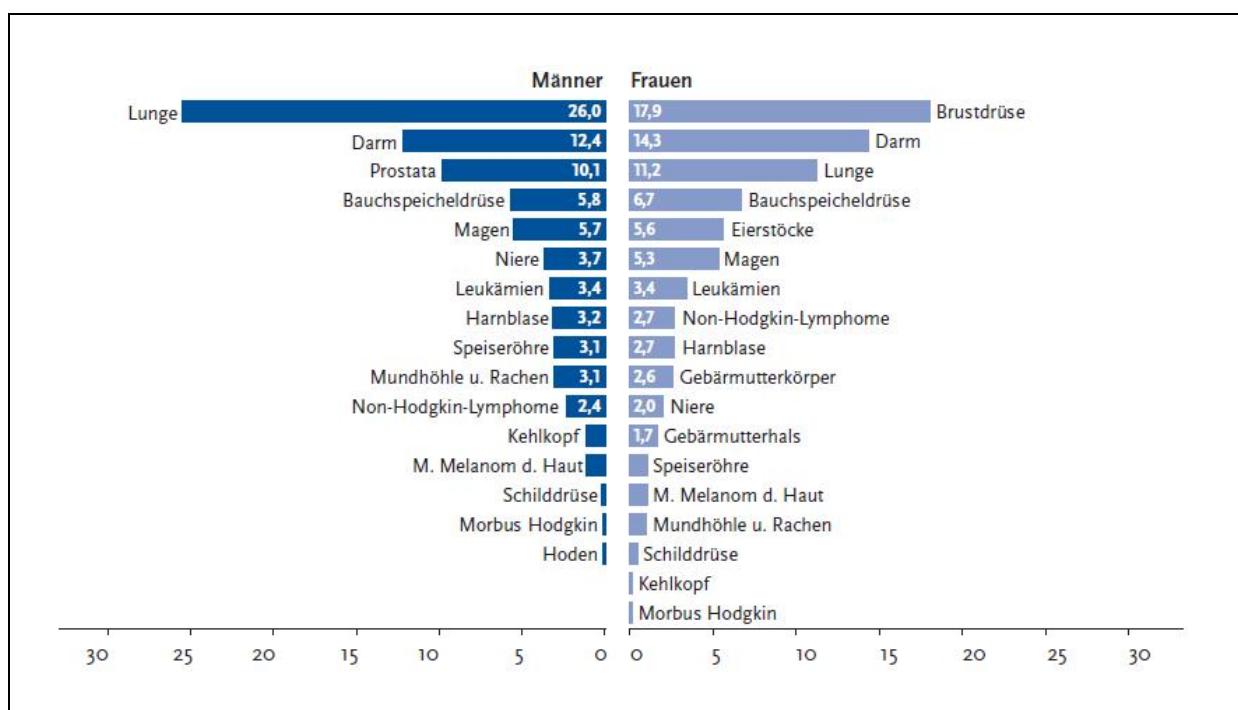


Abbildung 1: Verteilung der Krebssterbefälle nach Organen

Die Werte sind in Prozent angegeben, bezogen auf alle durch Krebs verursachten Sterbefälle in Deutschland 2004 (Robert-Koch-Institut, 2008)

1.1.2 Der Lymphknotenstatus (N) ist ein Prognoseparameter

Aussagen hinsichtlich der Prognose sowie Therapieentscheidungen orientieren sich beim KRK an der Stadieneinteilung der UICC (Union Internationale contre le Cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs). Diese basiert auf der sogenannten TNM-Klassifikation für solide Tumoren, wobei T für die Infiltrationstiefe des Tumors, N für die Ausprägung der Metastasierung in die regionären Lymphknoten (Nodus) und M für Fernmetastase steht (Tab. 1). Die UICC Stadieneinteilung und die TNM-Klassifikation werden fortwährend aktualisiert. Sie sind international gültig und ermöglichen somit die Vergleichbarkeit von Untersuchungs- und Forschungsergebnissen (Wittekind, 2002).

T Primärtumor	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
	Tis	Carcinoma in situ
	T1	Tumor infiltriert Submukosa
	T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
	T3	Tumor infiltriert die Muscularis propria hindurch in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes, perikolisches oder perirektales Gewebe
	T4	Tumor infiltriert direkt in anderer Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
N Regionäre Lymphknoten	NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastasen in ein bis drei regionären Lymphknoten
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M Fernmetastasen	MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastase

Tabelle 1: TNM-Klassifikation

Für die Bestimmung des nodalen Werts (N) werden üblicherweise 12 oder mehr Lymphknoten untersucht. Die Klassifikatoren T, N, M erhalten das Präfix p, wenn der Wert durch eine pathologische Untersuchung bestimmt wurde, z.B. bedeutet pN2, dass histomorphologisch in vier oder mehr Lymphknoten Metastasen gefunden wurden (Bruns et al, 2010).

Die Prognose eines KRK hängt von seinem jeweiligen UICC-Stadium ab (Tab. 2). Dabei gilt die lymphogene Metastasierung als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für die Fernmetastasierung und damit dem Versterben. So verschlechtert sich die Prognose bei Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($N>0$) erheblich (Tab. 2).

Auf der UICC-Stadieneinteilung basieren ebenfalls Therapieoptionen. Diese Zusammenhänge sind für Deutschland in den Leitlinien der AGO (Arbeitsgemeinschaft gastrointestinaler Onkologie) festgehalten. Bei den S3-Leitlinien handelt es sich um rechtlich nicht bindende Therapievorschläge, die systematisch von der AGO <als Hilfestellung zur Entscheidungsfindung entwickelt werden, und die sich auf aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse stützen (*evidence based medicine*). Analog zu den Änderungen in den UICC-Richtlinien werden die S3-Leitlinien ebenfalls permanent an den jeweilig modernsten Kenntnisstand angepasst. Analog zur Rolle der Lymphknotenmetastasen als prognostischer

Biomarker wird auch die Entscheidung und Schärfe für eine Therapie am Lymphknotenbefall festgemacht. Somit ist der Grad des Lymphknotenbefalls ein Indikator für das weitere klinische Vorgehen (Schmiegel, 2008).

UICC Stadium	Primärtumor	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastase	5-Jahresüberlebensrate Kolon	5-Jahresüberlebensrate Rektum
0	Tis	N0	M0		
I	T1, T2	N0	M0	90-95%	85-95%
II	A	T3	N0	M0	70-85%
	B	T4	N0		
III	A	T1, T2	N1	M0	
	B	T3, T4	N1	M0	65%
	C	Jedes T	N2	M0	55%
IV	Jedes T	Jedes N	M1	<5%	<5%

Tabelle 2: UICC Stadieneinteilung für KRK und assoziierte Sterberate (Bruns et al, 2010)

1.1.3 Pathologie des KRK

1.1.3.1 Das Tumorprogressions-Model

Nach dem Tumorprogressions-Model (*multistep carcinogenesis model*) (Fearon and Vogelstein, 1990), kommt es durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen zur Aktivierung von Onkogenen (*gain of function*) und Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen (*loss of function*) in normalen Zellen des Darms. Schrittweise entstehen somit aus gesunden Zellen des Darmepithels durch Akkumulation von Mutationen maligne transformierte Tumorzellen. Im KRK sind durch diese Mutationen vier zentrale Signalwege betroffen. Dabei ist die Reihenfolge dieser Mutationen und damit der Ausfall der Signalwege nicht determiniert. Häufig tritt sie jedoch in der Abfolge APC, KRAS, TGF- β , p53 (Abbildung 2) auf. Im Folgenden werden daher die Mutationen aus Gründen der Anschaulichkeit in dieser Reihenfolge erläutert.

a) APC - Wnt-Signalweg

Ein frühes Mutationereignis, das bereits häufig in Adenomen gefunden wird und daher als „gatekeeper“ der Karzinogenese bezeichnet wird, sind Mutationen im Tumorsuppressorprotein APC (*adenomatous polyposis coli*). APC Mutationen werden in etwa 60-80% aller KRK gefunden (Bienz and Clevers, 2000). Durch Mutationen im APC-Gen kommt es im Regelfall zum Verlust der Regulierbarkeit des kanonischen Wnt-Signalwegs, der auch als Wnt/ β -Catenin Signalweg bezeichnet wird. Er spielt in der Generierung und Aufrechterhaltung von adulten Stammzellen (SZ) (Barker, 2012), der EMT (epithelial-mesenchymale Transition) (Birchmeier et al, 2003; Brembeck, 2004) sowie für die Zellproliferation eine zentrale Rolle (Fodde, 2007). In kolorektalen Tumorzellen ist der

kanonische Wnt-Signalweg von essentieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung von *cancer stemness*. Durch aktiviertes β -Catenin können Eigenschaften der Tumorstammzellen induziert werden, so dass kolorektale Tumorzellen eine sehr hohe Plastizität aufweisen (Vermeulen, 2010). Nach Mutation des APC-Tumorsuppressorgens wird der kanonische Wnt-Signalwegs unabhängig von Wachstumssignalen (Wnt-Signal), so dass die Tumorstammzellen in der Folge ihre Stammzellnische an der Basis der Krypten verlassen (Pardal, 2003; Brabletz, 2005) und ungehemmt proliferieren können (Greogrieff, 2005).

b) KRAS - RAS/ RAF/ MAPK-Signalweg

Mutationen im Onkogen KRAS (*Kirstin rat sarcoma*) werden in bis zu 47% der kolorektalen Karzinome gefunden (Fearon and Vogelstein, 1990). KRAS ist Teil des RAS/RAF/MAPK-Signalweges, welcher das Bindeglied zwischen extrazellulären Rezeptoren der Tyrosinkinasefamilie, wie EGFR (*epidermal growth factor receptor*), HGFR (*hepatocyte growth factor receptor*) und vielen anderen mehr sowie einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (*activation protein 1*) darstellt. Folglich werden durch Aktivierung des RAS/RAF/MAPK Signalwegs Gene transkriptionell aktiviert, die Zellwachstum, Zellteilung, Apoptose, Angiogenese, Zelldifferenzierung und Metastasierung regulieren. Mutationen im KRAS-Onkogen führen somit zu ungehemmter Zellproliferation, -transformation und -differenzierung (Valencia, 1991).

c) TGF- β -Signalweg

In kolorektalen Karzinomen finden sich gehäuft Mutationen auf Chromosom 18. Die Mutationen befinden sich dabei in einer Region des Chromosoms, die Komponenten des TGF- β Signalwegs enthält, z.B. SMAD4/DPC4 (*small body size-protein, mother against decapentaplegic/deleted in pancreatic carcinoma*). Alternativ finden sich sehr häufig Mutationen im TGF- β RII Gen, das eine Komponente des TGF- β Rezeptors kodiert. Der TGF- β Signalweg übernimmt in unterschiedlichen Zellen aus verschiedenen Organsystemen eine pleiotrope Wirkung (Ikushima, 2010). In kolorektalen Zellen wirkt der TGF- β Signalweg vor allem inhibitorisch, indem vor allem Supressoren des Zellzyklus, wie p21^{CIP-1/ WAF-1} reguliert werden. Im Laufe des *multistep carcinogenesis* Prozesses kolorektaler Karzinome kommt es somit zu einem Ausfall des TGF- β Signalwegs (Fearon and Vogelstein, 1990).

d) TP53 - p53-Signalweg:

Das Tumorsuppressorprotein TP53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch defekte DNA aktiviert wird. Nach seiner Aktivierung kommt es zur Blockade des Zellzyklus durch Regulation des Zellzyklus-Inhibitors p21^{CIP-1/ WAF-1}, durch DNA-Reparaturproteine wie GADD45 (*gene associated with DNA damage*) und durch Regulatoren der Apoptose wie

PUMA (*p53 upregulated mediator of apoptosis*). TP53 reguliert, ob Zellen mit einem DNA-Schaden repariert oder der Apoptose (Zelltod) zugeführt werden. Daher wird p53 als *guardian of the genome* bezeichnet. Durch Mutationen des p53 Gens geht somit die Kontrolle über die Integration des Zellzyklusses, sowie über die Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung verloren. Da Tumorzellen im Laufe ihres Lebenszyklus eine Instabilität der DNA erwerben, ist TP53 in vielen Tumoren mutiert oder dereguliert. Der Grund dafür ist, dass TP53 einen zentralen und massiven Schutz gegen neoplastische Transformation darstellt. Ebenfalls führt ein Verlust der p53 Funktion zu einer gesteigerten Chemoresistenz der Tumorzellen. Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen werden in bis zu 50% aller kolorektalen Karzinome gefunden (Grady, 2002).

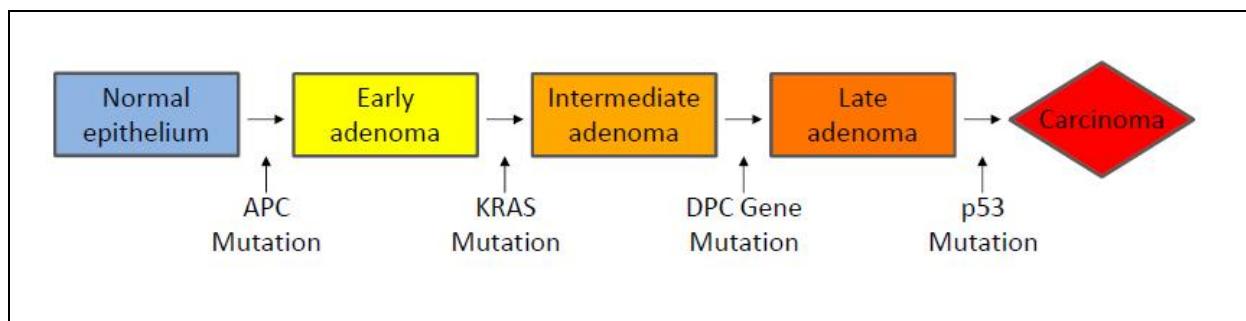


Abbildung 2: Das Adenom-Karzinom Modell zur Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms, vereinfachte Version nach Fearon und Vogelstein
Durch eine Abfolge verschiedener Mutationen in normalem intestinalen Epithel entwickeln sich aus Adenomen schließlich Karzinome (Moran, 2010)

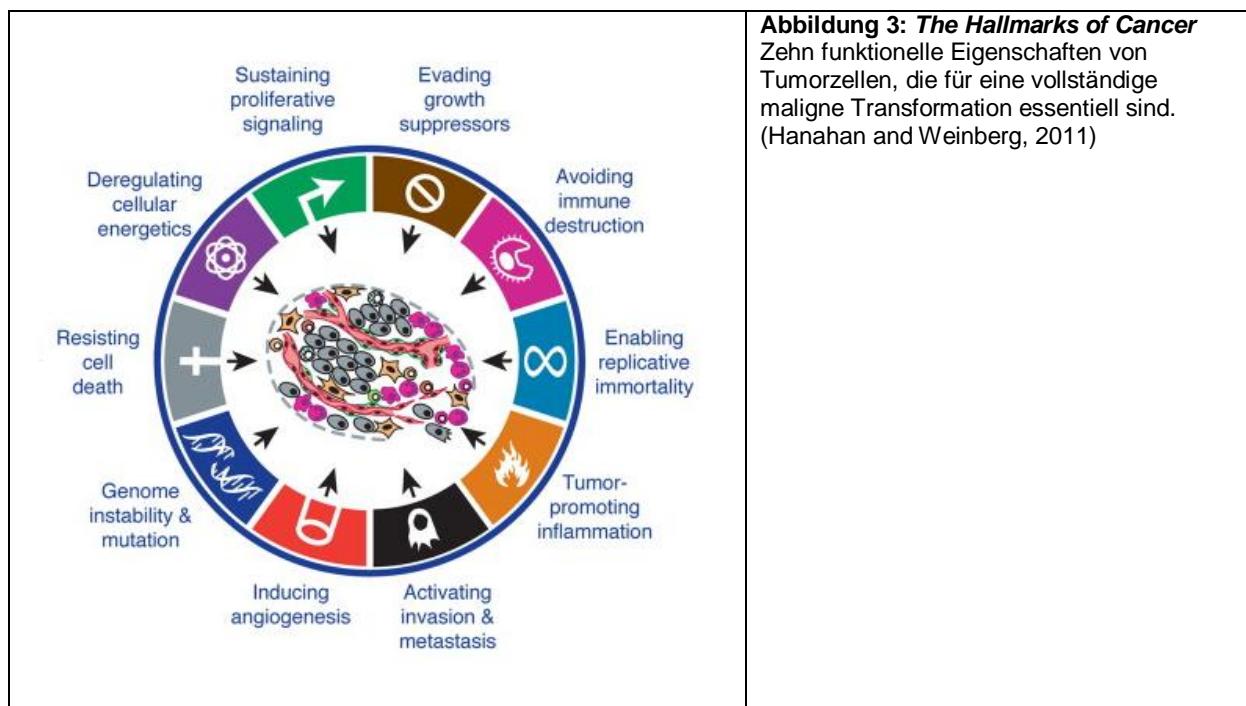
1.1.3.2 Verlust der funktionellen Regulation: *The Hallmarks of Cancer*

Neben der Beschreibung der organspezifischen Mutationen, wie es im *multistep carcinogenesis Modell* erfolgte, können genetischen Alterationen auch funktionelle Aspekte zugeordnet werden, die essentiell für eine neoplastische Transformation sind. Sie werden als *Hallmarks of Cancer* bezeichnet (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Dabei umfassen die *hallmarks* zehn zentrale Signalwege der Zellbiologie. Die Aktivierung der Signalwege erfolgt über Mutationen der Onko- und Tumorsuppressorgene sowie epigenetische Alterationen des Genoms, wie sie bereits im *multistep carcinogenesis Modell* beschrieben wurden (siehe 1.1.3.1).

Um eine maligne Transformation hervorzurufen, müssen Tumorzellen die Eigenschaften der zehn *hallmarks of cancer* erwerben (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die zehn *Hallmarks of Cancer* sind (Abb. 3):

- Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-Inhibitoren *evading growth suppressors*
- Vermeidung von Immunreaktionen *avoiding immune destruction*
- Unlimitiertes Replikationspotential *enabling replicative immortality*
- Stimulierende Entzündung *Tumor promoting inflammation*
- Gewebeinvasion und Metastasierung *activating invasion and metastasis*
- Fortwährende Angiogenese *inducing angiogenesis*
- Genomische Instabilität und Mutation *genome instability and mutation*
- Apoptose *resisting cell death*
- Deregulation der zellulären Energiekontrolle *deregulation cellular energetics*
- Proliferation *sustaining proliferative signaling*



Auffällig ist, dass die *hallmarks of cancer* Eigenschaften enthalten, die sich nicht nur aus den Tumorzellen ergeben, sondern die durch eine Tumorzellen-Stroma(zellen) oder Tumor/Microenvironment-Wechselwirkung gekennzeichnet sind. Zu diesen Eigenschaften gehört z. B. Entzündung (*inflammation*). Denn Tumorwachstum und Metastasierung sind keine endogenen Eigenschaften von Tumorzellen. Tumoren sind komplexe Systeme, die aus Tumorzellen, normalen Zellen (wie beispielsweise Fibroblasten, Makrophagen, Lymphzellen und Endothelzellen) und extrazellulärer Matrix (ECM) bestehen (Hanahan and Weinberg, 2000). Die beiden letzten Komponenten werden als Stroma zusammengefasst.

Die ECM besteht aus festen Komponenten, wie unter anderem Collagen, Fibronektin, Vimentin, sowie aus Wachstumssignalen, die von der zellulären Komponente produziert werden. Die Tumorzellen und das Stroma bilden eine komplexe Interaktionseinheit, die sich zudem nicht ohne weiteres *in vitro* simulieren lässt (Liotta and Kohn, 2001; de Visser, 2006; Joyce and Pollard, 2009; Smith and Kang, 2013). Nur Tumorzellen, welche die Fähigkeit besitzen mit den Stromazellen zu interagieren und diese zur Produktion von Wachstumsfaktoren anzuregen, sind zur Tumorproliferation fähig (Skobe and Fusenig, 1998). Isoliert man beispielsweise primäre maligne Tumorzellen aus dem *Microenvironment*, so sind diese oft nicht mehr zur Tumorprogression fähig (Schwitala, 2013). Dadurch ergibt sich auch, dass Tumorzellen, die *in vitro* ohne Stroma wachsen können, eine besondere Subselektion an Tumorzellen darstellen, die unter Umständen nicht mehr alle Eigenschaften insbesondere der Regulierbarkeit besitzen.

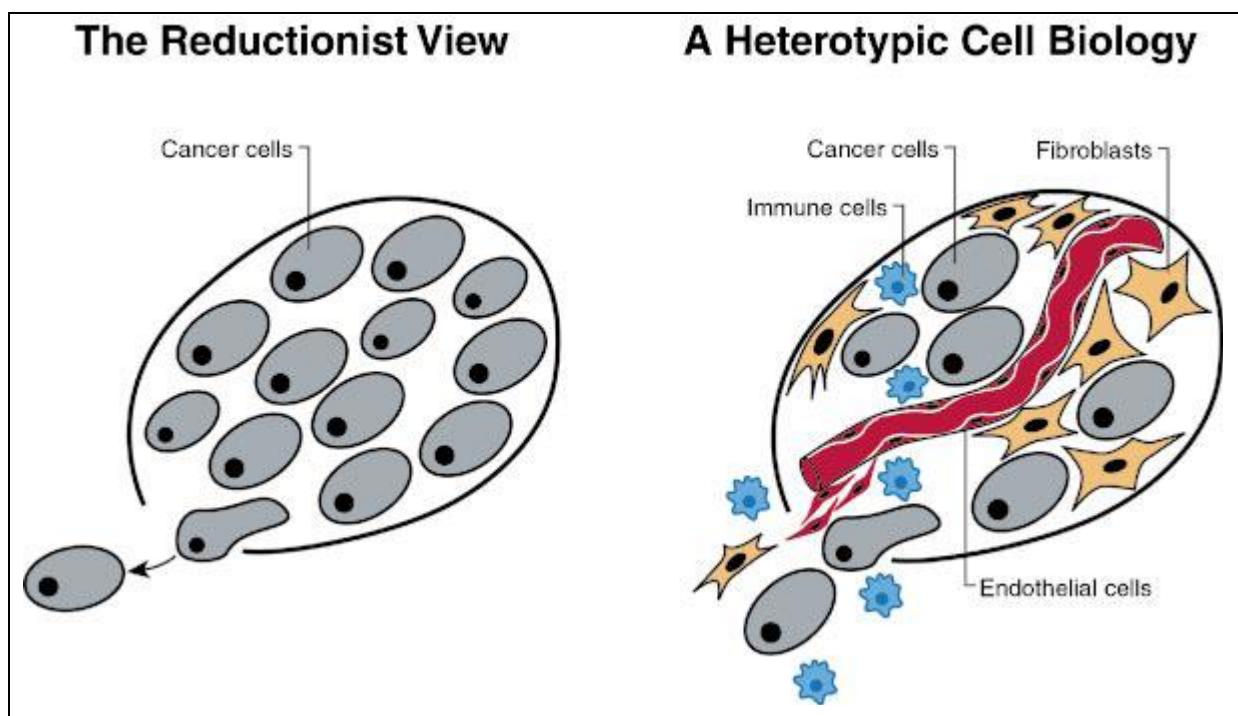


Abbildung 4: Tumoren sind komplexe Agglomerate aus Tumorzellen und Tumorstroma

Ein Tumor kann als vereinfachte Darstellung als eine Masse von Tumorzellen betrachtet werden, eine Situation, die in Zellkulturen vorliegt (linkes Bild). Jedoch zeigen sich Tumoren bereits histomorphologisch als eine heterogene Struktur aus den unterschiedlichsten Zellen. Diese Kombination und Interaktion zwischen den malignen Zellen und den gesunden aber zum Teil alterierten Stromazellen (Fibroblasten, Lymphozyten, Endothelzellen und andere mehr) beeinflusst das Verhalten von Tumorzellen und damit Tumoren erheblich (rechtes Bild) (Hanahan and Weinberg, 2000)

1.2 Das Krebsstammzell-Konzept

Aufgrund der Heterogenität lassen sich die Tumorzellen in unterschiedliche Populationen einordnen. Interessanterweise sind nicht alle Tumorzellen in der Lage Tumorwachstum zu initiieren, sondern nur eine kleine Population an Zellen. Da diese Eigenschaften an die Eigenschaft adulter Stammzellen erinnert, die gesamte Krypte auszubilden, werden Zellen dieser kleinen Subgruppe als Krebsstammzellen (KSZ, *cancer stem cells*) bezeichnet (O'Brien, 2007; Ricci-Vitiani, 2007). Tumorstammzellen entstehen im Regelfall aus adulten Stammzellen durch Mutationen, z. B. im Tumorsuppressoren APC (Barker, 2009). Da sich die Tumorstammzellen aus adulten Stammzellen entwickeln, haben sie einige Eigenschaften dieser Zellpopulation erhalten. Dazu gehören die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (*self renewal*) sowie die Fähigkeit der Tochterzellen in verschiedene Zellarten differenzieren zu können (Zech, 2004; Dalerba, 2007). Zusätzliche besitzen KSZ jedoch auch tumorspezifische Eigenschaften, wie unkontrolliertes Wachstum, fehlende Apoptose und die Fähigkeit zur Metastasenbildung (Ricci-Vitiani and Pagliuca, 2008).

Das KSZ-Modell besagt, dass ein Tumor nicht nur eine einfache monoklonale Ausbreitung von transformierten Zellen ist, sondern ein komplexes Gewebe, in welchem abnormes Wachstum durch wenigen Zellen, den KSZ, reguliert wird (Dalerba, 2007; Abb. 5). Adulte Stammzellen liegen in physiologischen (Stammzell-)Nischen, die im Darm an der Kryptenbasis zu finden sind. Die adulten Stammzellen sind durch ihre Abhängigkeit vom Wnt-Signal an diese Nischen gebunden. Erst nach Transformation, z.B. durch Mutation des APC-Tumorsuppressorgens sind die Tumorzellen in der Lage, die Nische zu verlassen. Diese Fähigkeit wird als eine der Schlüsselrollen angesehen um malignes Wachstum zu ermöglichen (Brabietz, 2005). *In vivo* können KZS im Gewebe durch den immunhistochemischen Nachweis von nukleärem β -Catenin nachgewiesen werden. In einer Vielzahl von KRK finden sich die Krebsstammzellen an der Tumorinvasionsfront (*Pushing Border-Invasionsfront; PB-Invasionsfront*). Je höher der Nachweis von nukleärem β -Catenin an der PB-Invasionsfront von Tumoren ist, desto kürzer ist die 5-Jahresüberlebensrate und desto schlechter ist somit die Prognose des Patienten (Brabietz, 2005). Dieser Zusammenhang wird dadurch komplizierter, dass *cancer stemness* vor allem durch exogene Faktoren des Stromas, wie etwa HGF (*hepatocyte growth factor*), induziert werden kann (Vermeulen, 2010), und dass differenzierte Zellen unter bestimmten Bedingungen zu adulten Stammzellen konvertiert werden können. In diesem Status induzieren die ehemals adulten differenzierten Zellen ebenfalls Tumoren (Schwitalla, 2013). Auf diese Weise entsteht ein schwer zu kontrollierendes System an Interaktionen. Vor allem bedeutet dies, dass für eine zielgerichtete Therapie die Zerstörung eines Tumorzellkompartiment nicht ausreichend wäre, weil aus den verbleibenden differenzierten Tumorzellen wieder Zellen mit Eigenschaften von Tumorstammzellen entstehen können. Da diese Zellen unter Bedingungen von

Chemotherapie verstkt selektiert werden (Todaro, 2007), gestalten sich Maßnahmen, die Tumorzellen ten, als besonders schwierig. Das liegt daran, dass vermehrt Tumorstammzellen entstehen, die verstkt zu Metastasierung fren. KSZ scheinen ebenfalls fr die hohen Rezidivraten von bis zu 40% (Mller, 2008) in kolorektalen Karzinomen verantwortlich zu sein, da sie neben der Resistenz gegen Chemotherapeutika auch Tumorwachstum initiieren. Weiterhin finden sich KSZ meist im Ruhezustand der G0-Phase des Zellzyklus und sind somit toxischen Effekten von chemotherapeutischen Medikamenten kaum ausgesetzt (Braig, 2009; Esser, 2009). Zustlich sind die DNA-Reparationssysteme sowie Mechanismen, welche zu Resistzenzen gegen Apoptose fren, z.B. durch Hochregulation von anti-apoptotischen Genen wie cFLIP, PED und Bcl-X_L und Multidrug-Resistance-Transporter besonders aktiv. Diese Transporter schleusen aktiv Giftstoffe, wie z.B. das Chemotherapeutikum Mitoxanthrone oder 5-Fluoruracil, aus den Zellen hinaus und verhindern somit den Zelltod (Lou and Dean, 2007; Todaro, 2007; Klonisch, 2008). So geht bei einer Therapie zwar ein Großteil der Tumormasse zugrunde, nicht aber die KSZ (Huff, 2006).

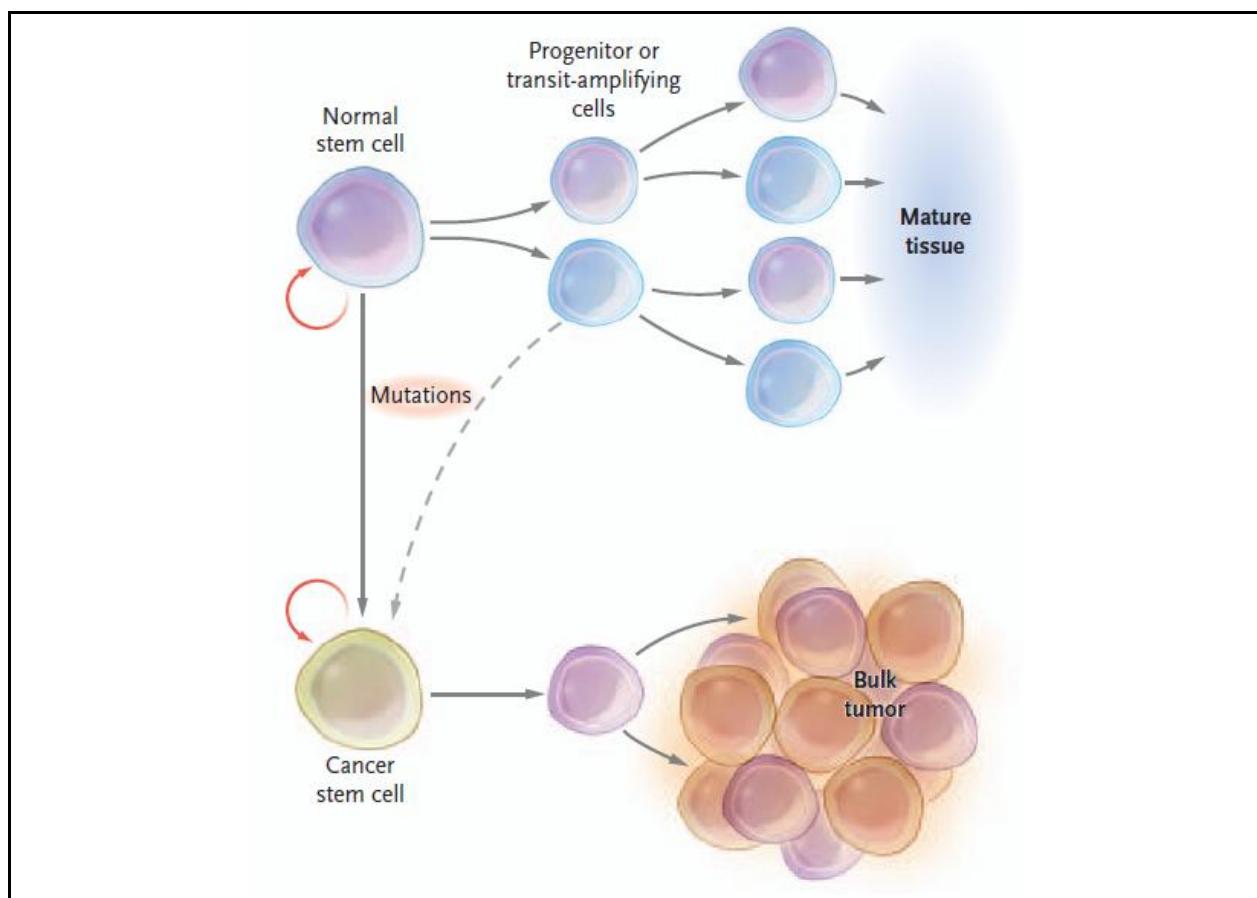


Abbildung 5: KSZ gehen aus SZ hervor

Das normale Gewebe geht aus zentralen Stammzellen (SZ) hervor. Sie wachsen und differenzieren, um Progenitorzellen sowie ausgewachsene Zellpopulationen zu erzeugen. Schlselfunktionen einer normalen SZ sind: ausgeprgte Figkeit zur Proliferation sowie die Figkeit, verschiedenartige Zellen zu erzeugen (dargestellt durch verschiedenfarbige Zellen). KSZ entstehen durch Mutationen in normalen SZ oder in einer Progenitorzelle. KSZ knnen wie normale SZ die Entstehung von heterogenen Tochterzellpopulationen ermglichen und ebenso exzessiv proliferieren (Jordan, 2006)

Zusammengefasst finden sich KSZ analog zu den adulten Stammzellen in einem *Microenvironment*, das als Nische für die KSZ angesehen werden kann, von der Signale für Wachstum, Differenzierung und Dedifferenzierung ausgehen (Medema and Vermeulen, 2011, Smith and Kang, 2013). Das würde im Umkehrschluss bedeuten, dass Aussagen über die Malignität eines kolorektalen Karzinoms durch diese komplexe Interaktion bestimmt werden. Somit genügt es nicht, KSZ oder deren Stroma isoliert zu untersuchen. Da beide Einheiten untrennbar miteinander verbunden sind, muss der gesamte Krebs-(Stamm-)Zell-Stroma-Komplex untersucht werden. Dieses komplexe Gebilde aus KSZ und Stroma wird in der vorliegenden Arbeit als Krebsstammzell- Stroma- Komplex (KSSK) bezeichnet.

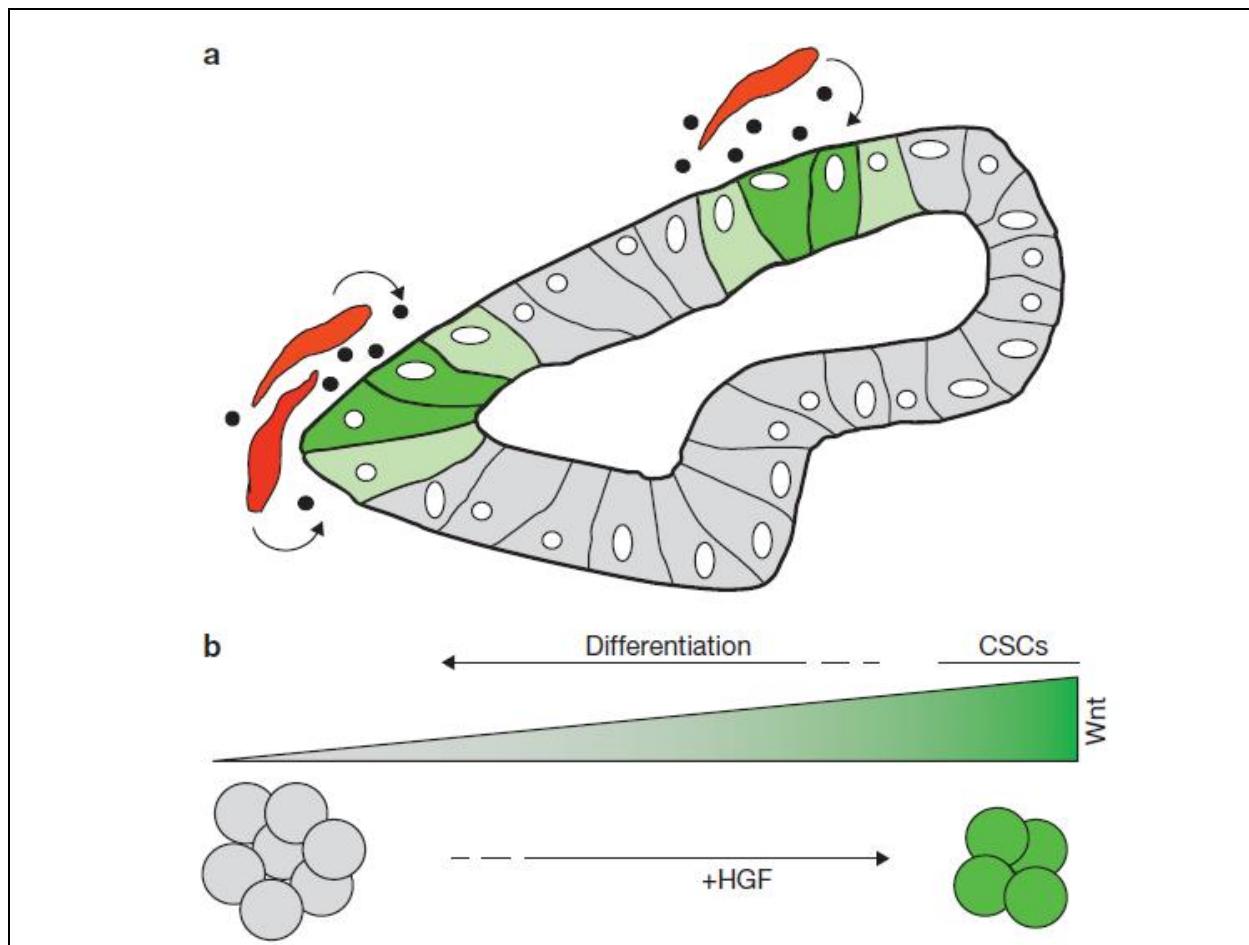


Abbildung 6: Darstellung der Dynamik des KSSK im KRK

a) Zellen mit einem hohen Nachweis von Wnt-Signalaktivität (hier grün dargestellt) halten sich in der Nähe von Stromazellen (rot) auf, welche durch spezielle Faktoren wie beispielsweise HGF (hepatocyte growth factor, durch schwarze Punkte dargestellt) den Wnt-Signalweg aktivieren können. Zellen mit niedriger Wnt-Signalaktivität sind grau dargestellt.

b) Die Aktivierung des Wnt-Signals führt in differenzierten Tumorzellen (hier durch niedrige Wnt-Aktivität charakterisiert) zur Wiederherstellung von Eigenschaften von Tumorstammzellen. (vereinfachte Darstellung, Vermeulen, 2010)

1.3 Identifikation von KSZ und Stromazellen durch die Oberflächenmarker CD44 und CD166

Um das komplexe KSSK-Gebilde untersuchen zu können, müssen geeignete Oberflächenmarker eingesetzt werden, die im Idealfall KSZ sowie Stromazellen identifizieren. Hier scheinen sich insbesondere die Oberflächenmarker CD44 (Tereda, 2002; Martin-Rendon, 2003), CD133 (Wang, 2002; Ricci-Vitiani, 2007), EpCAM (Dalerba, 2007), CD166 (Bruder, 1995; Weichert, 2004), CD29 (Shakleton, 2006), CD34 (Miraglia, 1997), CD24 (Vermeulen, 2008), Lgr5 (Vermeulen, 2008) aber auch nukleäres β -Catenin (Vermeulen, 2008) zu eignen. Bei Untersuchungen des KRK und deren KSZ zeigt sich, dass nur wenige Zellen die Fähigkeit zur Tumorgenese besitzen. Zellen mit einer solchen Fähigkeit sind jeweils Subpopulationen mit den Oberflächenmarkern CD44+ bzw. CD166+ zuzuordnen (Weichert, 2004; Dalerba, 2007). Beide Marker identifizieren auf der anderen Seite aber auch eine Vielzahl von Zellen des Stomas, wie Fibroblasten, Endothelzellen und B- sowie T-Lymphozyten und andere mehr. Die Expression beider Marker wurde bereits mit Malignität und einer schlechten Prognose korreliert (Weichert, 2002; Dalerba, 2007).

Auf beide Marker soll im Folgenden genauer eingegangen werden:

1.3.1 CD44

CD44 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und zeichnet sich durch eine große Funktionsvielfalt aus: Es kommt als Antigen in der Lymphogenese, als Adhäisionsmolekül zwischen Lymphozyten-Endothelzell-Interaktionen (Weber, 1996; Borland, 1998) sowie als Glykoprotein mit der Fähigkeit zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix während der Embryonalentwicklung vor und dient als aussagekräftiger Marker für Malignität und Metastasierung (Ponta, 2003). Außerdem gehört CD44 zum phänotypischen Profil von mesenchymalen SZ (Kögler, 2004). Im Tumorstroma wurde es auf Lymphozyten, Makrophagen, mesenchymalen SZ und Schwannschen Zellen nachgewiesen (Borland, 1998).

Die Funktionsvielfalt von CD44 lässt sich dadurch erklären, dass der Marker eine Gruppe verschiedener Isoformen umfasst – sowohl in der Aminosäure-Sequenz (AS-Sequenz) als auch in der Kohlenhydratanordnung. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen (*Splicing*) einerseits und differentielle Glycosylierung andererseits, wodurch eine Vielfalt an Polypeptid-Isoformen entsteht (Wielenga, 1993; Borland, 1998).

In gesundem Gewebe kommt hauptsächlich die Standard-Isoform CD44s vor. Sie stellt die kleinste bekannte Isoform dar. CD44s ist ein Typ 1-transmembran-Glycoprotein aus 341 AS, mit 248 AS extrazellulärer Domäne, einer 21 AS transmembran Domäne und 72 AS Zytoplasmashwanz. Die AS-Sequenz lässt auf ein Polypeptid von weniger als

40.000 MW (Molekulargewicht) schließen, was jedoch in starkem Kontrast zur Größe von 80.000-95.000 MW in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE Gel) steht (Borland, 1998). Dieser Unterschied im Molekulargewicht wird durch extensive Glycolysierung der extrazellulären Domäne erzeugt, die viele Bindungsstellen für N- und O-glycosidisch verknüpfte Kohlenhydrate besitzt (Borland, 1998; Ponta, 2003).

Die Polypeptid-Isoformen unterscheiden sich hauptsächlich durch 10 Exons, die durch differentielles Spleißen neu kombiniert werden. Das geschieht während der Reifung der mRNA meist im Bereich der Codone 202 und 203, was dem Übergang zwischen Exon 5 und 6 entspricht und an der proximalen Membran den Bereich von CD44 integriert. Diese Exonvarianten werden als v1-v10 bezeichnet (Abb. 7), wovon sich die Namen der entstehenden CD44 Isoform ableiten lässt, z.B. CD44v6, oder CD44v8 (Borland, 1998; Biddle, 2003).

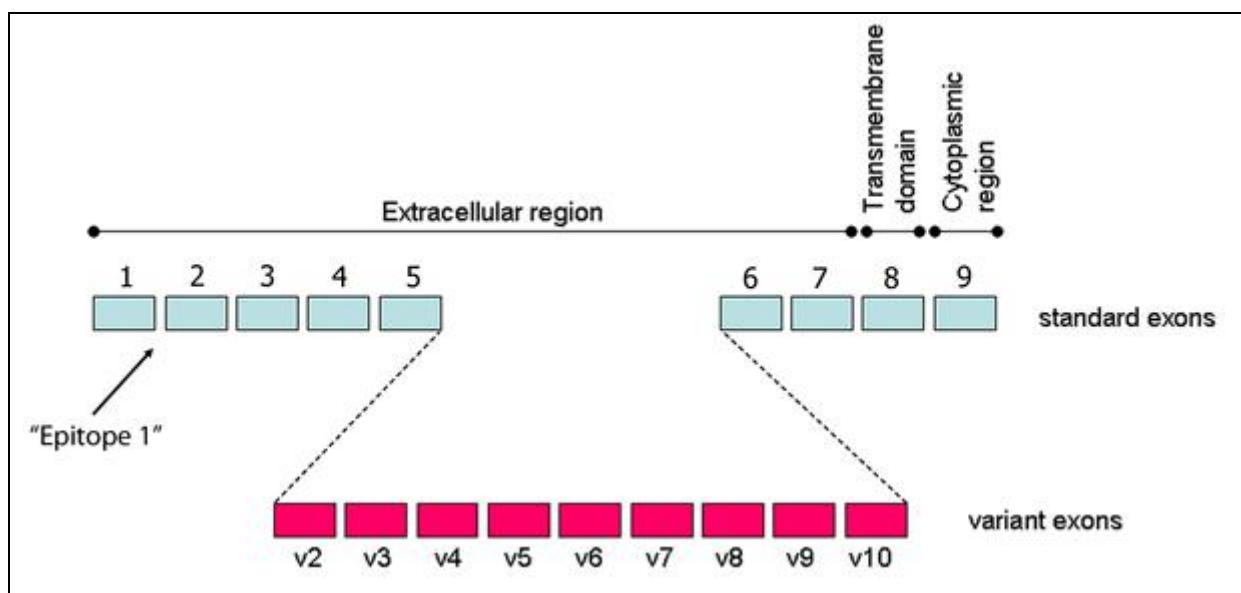


Abbildung 7: Darstellung der CD44-Standard-Exons und deren Varianten

Darstellung der CD44 Standard Exons, sowie der 9 Exon Varianten. Es wird der Name einer jeden Exon Variante, sowie deren extrazelluläre Region im entstehenden Protein Produkt angezeigt. Die Position des Epitops 1 bleibt bestehen (Biddle, 2013)

Die essentielle Rolle von CD44 für die Biologie von KSZ wurde dadurch nachgewiesen, dass eine einzelne CD44 positive Tumorzelle heterogene kolorektale Karzinome induzieren kann, die histopathologisch dem humanen Primärtumor entsprechen. Insbesondere führt der Verlust von CD44 (RNA-Interferenz) zum Verlust der KSZ-Eigenschaften (Du, 2008). Schließlich ist CD44 ein Oberflächenmarker, der mit Metastasierung korreliert und zudem zuverlässige KSZ induziert (Dalerba, 2007).

1.3.2 CD166

CD166 oder ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und vermittelt bei Leukozyten die Zelladhäsion (Swart, 2002). CD166-Expression findet sich bei Wachstumsprozessen oder Migration. Dies beinhaltet Prozesse während der neuronalen Entwicklung, Organogenese, Hämatopoiese, Immunantwort und Tumorwachstum und umfasst Zellen mit leukozytärem, neuronalem, epithelialem sowie hämatologischem Ursprung. Adhäsionsmoleküle und damit auch CD166 haben eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren. Sie regulieren zum einen die homologe Adhäsion von Tumorzellen untereinander, zum anderen die heterologe Adhäsion von Tumorzellen mit Endothelzellen oder der ECM (Pollard and Earnshaw, 2002). Speziell für CD166 wird die Situation dadurch komplexer, dass Tumorzellen in Melanomen eine Variante des CD166 überexprimieren, die die Ligandenbindungsdomänen D1-2 fehlen ($\Delta N\text{-ALCAM/D3-5}$) (Abb. 8). Durch die Interaktion von $\Delta N\text{-ALCAM/D3-5}$ mit intakten ALCAM Molekülen entstehen Dimere, welche das Adhäsionssystem in ein Ungleichgewicht bringen kann.

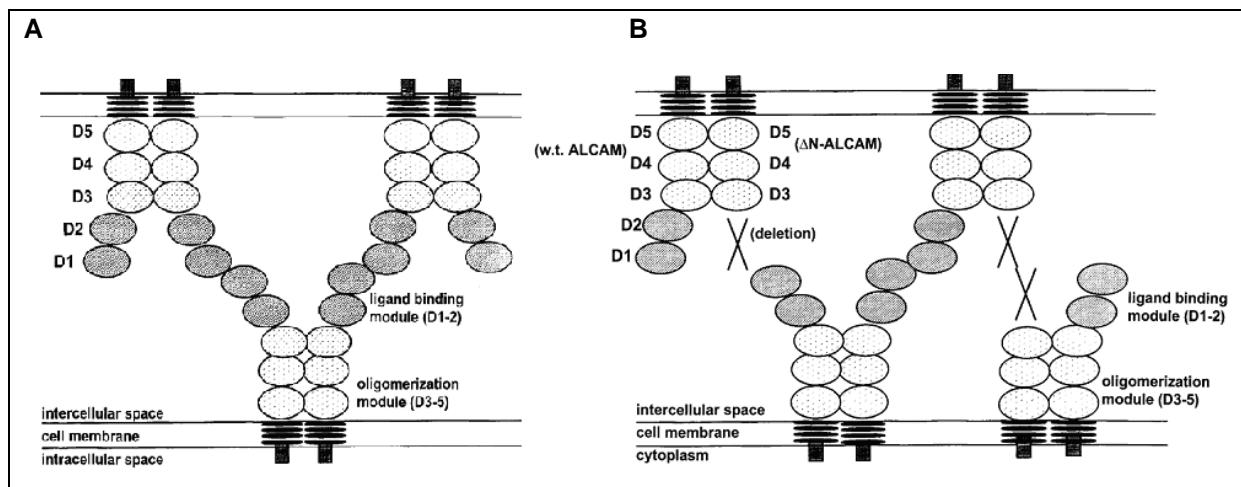


Abbildung 8: Der Verlust der Domäne 1-2 ($\Delta N\text{-ALCAM}$) verhindert eine ALCAM-ALCAM Interaktion

a) Homophile ALCAM-ALCAM Interaktionen: Die extrazellulären ALCAM Strukturen bestehen aus zwei funktionellen Modulen. Die Immunglobulin Domäne D1 ist essentiell für die Bindung des Liganden und übermittelt die Interaktionen zwischen ALCAM exprimierenden Nachbarzellen. Die Immunglobulin- Domänen D4 und D5 sind in die cis- Oligomerisation an der Zelloberfläche involviert. Die Stöchiometrie der Oligomerisation ist unbekannt und zur Vereinfachung sind hier nur Dimere dargestellt. Die simultane Anwesenheit von Liganden-bindenden und oligomerisierenden Molekülen ist für die Knüpfung von stabilen homophilen ALCAM- Vernetzungen an den Zell-Zell-Kontakt Regionen von großer Bedeutung.

b) Überexpression von ALCAM-Molekülen ohne Domänen 1-2 inhibiert eine stabile ALCAM- Vernetzung an den Zell-Zell Kontakt Regionen, denn $\Delta N\text{-ALCAM}$ fehlen die beiden Liganden-bindende Domänen D1 und D2. Dadurch können Interaktionen mit Nachbarzellen nicht mehr aufrecht erhalten werden. Gleichzeitig kann $\Delta N\text{-ALCAM}$ mit einem Wildtyp ALCAM vom Typ D1- D5 an der Zelloberfläche eine Verbindung eingehen und damit die stabile Vernetzung von homophilen ALCAM Verbindungen schwächen bzw. verhindern (Swart, 2002)

Insbesondere wird durch die fehlende Domäne der homophile Zellzusammenhalt unterdrückt und somit die Tumorzellmigration unterstützt (Swart, 2002). Man geht davon aus, dass proteolytische Kaskaden, welche in malignen Tumoren häufig aktiviert sind, für diese Abspaltung der Domänen 1-2 verantwortlich sind, und diese Alteration ein Schritt in der

Metastasierung eines Primärtumors darstellt (McCawley, 2001). Dazu passend findet sich ALCAM in KRK überexprimiert (Swart, 2002; Mimeault, 2006). Seine Expression korreliert mit kürzerem Überleben (Weichert, 2002).

Zusammengefasst sollten sich die beiden Marker CD44 und CD166 daher hervorragend eignen, das komplexe Wechselspiel zwischen Tumorzellen und Stroma abzubilden und damit ein Möglichkeit liefern, die KSSK mit anderen klinischen Parametern korrelieren zu können.

1.4 Hypothese

Aufgrund der Bedeutung der Funktion des Krebsstammzell-Stroma-Komplexes (KSSK) für die Prognose von Tumoren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die klinische Rolle der Lymphknotenmetastasierung als negativer prognostischer Marker mit einer erhöhten Expression von CD44 und CD166 als Indikator für einen aktiven KSSK an der *pushing border* kolorektaler Karzinome korreliert. Nach Verifikation der Hypothese könnten CD44 und CD166 als prognostische Marker im klinischen Alltag in eine diagnostische Anwendung überführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Das Kollektiv

Das Patientenkollektiv wurde auf der Basis von klinisch-pathologischen Daten wie Geburtsdatum, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Histopathologie, Therapie und Nachsorge-Ergebnisse des Tumorzentrums München (TZM) erstellt. Die zugehörigen Gewebeblöcke, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE), wurden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts rekrutiert. Die Patienten unterzogen sich in den Jahren 1994 bis 2004 einer kurativen Tumorresektion an der Ludwig-Maximilians-Universität München. In das Kollektiv wurden wenig differenzierte (G2 nach WHO), infiltrierende kolorektale Adenokarzinome der Kategorie T3N0M0 oder T3N1/2M0 eingeschlossen. Da eine Korrelation zwischen der Expression der KSSK-Marker CD44 und CD 166 und dem Lymphknotenstatus (N0 vs. N1/2) untersucht werden sollte, unterschieden sich die Fälle nur im Lymphknotenstatus voneinander. Von den insgesamt 81 Fällen konnte in 44 Fällen kein Lymphknotenbefall (N0) nachgewiesen werden. In 37 Fällen fanden sich Metastasen in einem der resezierten Lymphknoten (N1/2) (Tab.10, Ergebnisse).

2.2 Sichten und Schneiden der Gewebeblöcke

Von den FFPE-Gewebeblöcken standen die aus der Routinediagnostik stammenden HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbten Schnitte zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Schnitte wurde untersucht, in welchen Fällen die Tumoren eine *pushing border*-Invasionsfront aufweisen. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Gewebeblöcke auch Normalgewebe enthielten, um dieses als interne Färbekontrolle einzusetzen zu können. Nach der Identifikation geeigneter FFPE-Blöcke wurden diese aus dem Archiv rekrutiert und von jedem 5 konsekutive, 2µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Dabei diente einer der Schnitte zur HE Färbung, ein anderer für den immunhistochemischen Nachweis von CD44 und ein dritter für den Nachweis von CD166.

2.3 Western Blot

Mithilfe von Western Blot Analysen wurde die Spezifität der eingesetzten Antikörper überprüft. Da es sich bei CD44 um eine Gruppe von Isoformen handelt, welche im Molekulargewicht stark voneinander variieren, wurde diesem Sachverhalt in der Auswertung Rechnung getragen. Laut Hersteller (BD Pharmingen™) bindet der Antikörper an das Epitop 1 des CD44-Antigens, das von den Exons 1-5 kodiert wird (Abb.7, Einleitung). Da diese Exons von allen Spleißvarianten kodiert werden, war der Antikörper in der Lage, alle CD44-Isoformen nachweisen zu können. Für die Validierung wurden Proteinlysate der

kultivierten humanen kolorektalen Zelllinien SW480, LS174T und LoVo eingesetzt. Diese Zelllinien wurden eingesetzt, weil bekannt war, dass sie das Epitop 1 des CD44-Moleküls exprimieren und somit durch den eingesetzten Antikörper nachgewiesen werden können (Biddle, 2013).

Die Validierung von CD166 wurde als Western Blot-Antikörperoptimierung aufgebaut, da dieser Antikörper im Jung-Labor noch nicht eingesetzt worden war. Es wurde daher parallel mit mehreren Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper gearbeitet (Tab. 3 und 4), um auf diese Weise eine Optimumsbedingung zu finden, unter der der Antikörper optimale Resultate liefern würde. Unter diesen Bedingungen sollte die Laufhöhe der Bande bestimmt werden, um so das Molekulargewicht und damit die Spezifität des eingesetzten Antikörpers bestimmen zu können.

Die Western Blot-Analysen wurden auf der Basis von standardisierten Protokollen aus den Current Protocols in Molecular Biology durchgeführt (Ausubel, 1989). Die Vorgehensweise ist im Folgenden kurz als Übersicht wiedergegeben. Für die Details wird auf das Protokoll in der Originalversion verwiesen:

- 1. Herstellung des SDS-PAA-Gels (MiniproteanII, Biorad)
(engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidge)
- 2. Herstellung der Zelllysate

CD166	
Lysat	SK-N-SH Zell-Lysat SC-2410 (Santa Cruz 2,5µg/ µl)
Verdünnung 1	10µg zu 4µl
Verdünnung 2	20µg zu 8µl
Verdünnung 3	30µg zu 12µl

Tabelle 3: Verdünnung des Zelllysats CD166

CD44		
Lysat	Lysatmenge	Retiloadmenge
1- SW 480	6,52µl	2,17µl
2- LS174T	6,76µl	2,25µl
3- LoVo	6,31µl	2,10µl

Tabelle 4: Verdünnung der Zelllysate aus verschiedenen kolorektalen Zelllinien für CD44

- 3. Transfer der Proteine auf eine Membran (Miniprotean II, Biorad)
- 4. Inkubation der Membran mit Antikörpern
 - i) Inkubation mit Primärantikörper
Primärantikörper (CD166: CD166 NCL-CD166 von Menari (100kD), CD44: CD44 (Cat.No: 555476) von BD Pharmingen™ (80-95kD) nach Tabelle 5 verdünnen.

Verdünnung	Konzentration	Menge an 5% Blotto	Menge an AK
CD166			
A	1:100	3ml	30µl
B	1:200	3ml	15µl
C	1:500	3ml	6µl
CD44			
A	1:5000	3ml	0,6µl

Tabelle 5: Primärantikörper- Verdünnung von CD166 und CD44

ii) Inkubation mit Sekundärantikörper

Sekundärantikörper (CD166: Rabbit-anti-mouse HRP- labeled (Pierce), CD44: Rabbit-anti-mouse HRP- labeled (Pierce)), Verdünnung 1:10.000

- 5. Belichtung und Entwicklung des Films

2.3.1 Reagenzien

In der Tabelle 6 ist die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien aufgelistet. Hier wurde ebenfalls auf der Basis von standardisierten Protokollen aus Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1989) gearbeitet.

Reagenz	Zusammensetzung
4x Tris-HCL, pH 6,8	6,05g Tris base in 40ml H ₂ O (pH 6,8 durch 1N HCl) 100ml H ₂ O 0,4g SDS
4x Tris-HCl, pH 8,8	91g Tris base in 300ml H ₂ O (pH 8,8 durch 1N HCl) 500ml H ₂ O 2g SDS
10x Transferpuffer	30,2g Tris Base 144,2g Glycin 900ml H ₂ O
10x TBS/T 0,1% (2L, pH 7,2-7,4)	242,28g Tris Base 175,32g NaCl 2L H ₂ O
Laufpuffer	15,1g Tris Base 72g Glycin 5g SDS 1000ml H ₂ O
Primärantikörper	CD166: CD166 NCL-CD166 von Menari (100kD) CD44: CD44 (Cat.No.:555476) von BD Pharmingen TM (80-95kD)
Blotto 5%	5% Milchpulver TBS/T (0,1%)

Tabelle 6: Reagenzien

2.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen erfolgten mithilfe eines standardisierten Ventana-Protokolls auf einem Benchmark® XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tuxcon, Arizona, U.S.A.), unter Einsatz von CD44- oder CD166-spezifischen Primärantikörpern (Tab. 7, Tab. 8) und bei anschließender Entwicklung unter Einsatz der *ultraView DAB* Prozedur mit *ultraViewDAB* Kit.

Name	Klon	Bezugsquelle	Isotyp	Verdünnung
CD166 mouse monoclonal antibody	MG/07	Visionbiosystems Novocastra, UK	Mouse myeloma P3-NS1-Ag4-1	1:75
CD44 purified mouse anti-human monoclonal antibody	G44-26	BD Biosciences Europe	Mouse IgG _{2b}	1:500

Tabelle 7: Produktinformationen der verwendeten Antikörper

UltraView™ Universal DAB Detection Kit:	<u>Inhibitor:</u> 3% Wasserstoffperoxid <u>Universal HRP Multimer:</u> Antikörpermischung aus Ziege anti-Maus IgG-HRP, Ziege anti-Maus IgM-HRP, Ziege anti-Kaninchen-HRP (<50µg/mL) in Protein Puffer mit ProClin® 300 Konservierungsmittel <u>DAB Chromogen:</u> 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in einer Stabilisierungslösung mit Konservierungsmittel <u>DAB H₂O₂:</u> 0,04% Wasserstoffperoxid in Phosphatpuffer <u>Copper:</u> 5g/l Kupfersulfat in Acetat-Puffer mit Konservierungsmittel
10X SSC	Natriumchlorid, 10-fach konzentriert, Natriumcitrat-Lösung in Konservierungsmittel
Ventana Liquid Coverslip™	n-paraffinisches Hydrokarbon, gefärbt mit Oil Red O
Ventana EZ Prep™ (10X)	EZ Vorbereitungslösung in ProClin® Konservierungsmittel, 10-fach konzentriert
Ventana Reaction Buffer (10X)	Tris-Puffer (pH 7,6 +/- 0,2) in Konservierungsmittel, 10-fach konzentriert
Ventana Cell Conditioning 1	Tris-Puffer in Konservierungsmittel
Hematoxylin	Hämatoxylin, Glycol, Essigsäure
Blueing Reagent	0,1 M Lithiumcarbonat, 0,5 M Natriumcarbonat

Tabelle 8: In der Arbeit verwendete Lösungen zur immunhistochemischen Färbung mittels Benchmark XT
Die Lösungen stammen von Ventana Medical System, Inc., Tuscon, AZ, U.S.A.

2.4.1 Abfolge der Färbung

Die Abfolge der Färbung erfolgte mithilfe eines standardisierten Ventana-Protokolls und wird hier nur als Übersicht wiedergegeben.

- Entparaffinisierung
- Antigendemaskierung
- Blockade der endogenen Peroxidase
- Auftragung des Antikörpers
- Auftragen von UV HRP UNIV MULT (Sekundärantikörper)
- UV DAB und UV DAB H₂O₂ (Färbung)
- Gegenfärbung

2.5 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels Lichtmikroskopie (Mikroskop Orthoplan von Leitz, Wetzlar (Gerätetyp Orthoplan, Nr. 110408)). Sie wurde zur Reliabilitätsüberprüfung zweimal, jeweils im Abstand von mehreren Tagen verblindet durchgeführt. Während der Durchführung waren die zugehörigen klinischen und pathologischen Befunde unbekannt, um ein unabhängiges Ergebnis zu erhalten. Zur weiteren Überprüfung der Reliabilität wurden am Ende der Auswertung stichprobenartig eine Wiederholung der Auswertung durchgeführt.

2.6 Datenerfassung

Nach der verblindeten Auswertung der Färbungen wurden die immunhistochemischen Daten mit den klinisch-pathologischen Daten in Excel-Listen zusammengeführt. Damit das fehlerlos erfolgen konnte, wurde jeder Patient/Fall mit einer laufenden Nummer versehen. Auf diese Weise konnten die Patientendaten pseudoanonymisiert werden und den Vorgaben des Datenschutzes Rechnung getragen werden.

2.7 Statistische Auswertungen

2.7.1 Powerberechnung des Kollektivs

Die statistische Power (Teststärke) bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der ein tatsächlich existierender Effekt in einer Studie gefunden wird (Cohen, 1969). Die Power wurde mit der öffentlich zugänglichen Software GPower 3.0 (Franz Faul, Universität Kiel, <http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>) berechnet.

2.7.2 Interrater-Reliabilitäts Berechnung anhand der Cohens Kappa Gleichung

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Schnitte zweimal mit einem Abstand von mindestens 5 Tagen sowie von einer weiteren Person anhand der

angegebenen Kriterien beurteilt. Auf diese Weise gelang es, die Begutachtung der Schnitte zu objektivieren und neutral zu halten. Für die Übereinstimmung der beiden Bewertungen wurde der Cohen's Kappa Koeffizient bestimmt. Dieser ist ein statistisches Maß für die Interrater-Reliabilität von subjektiv bestimmten Ergebnissen, z.B. Schätzungen. Sie misst die Übereinstimmung der Ergebnisse zweier Ergebnislieferanten und wurde mithilfe von SPSS (*social sciences computer software v. 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.*) berechnet.

$$\text{Die Gleichung zur Bestimmung des Cohenschen Koeffizienten lautet: } \kappa = \frac{po - pc}{1 - pc}$$

- po = gemessener Übereinstimmungswert
- pc = zufällig erwartete Übereinstimmung

Eine totale Übereinstimmung liegt bei einem Wert von $\kappa = 1$ vor. Werte bis $\kappa \geq 0.75$ werden als akzeptable Übereinstimmungsraten angenommen. Insbesondere erfolgte die Bewertung des κ -Koeffizienten anhand von Richtwerten in der Literatur (Tab. 9, Altman, 1991).

κ-Wert	Stärke der Übereinstimmung
0-0,2	Schwach
0,21-0,4	Leicht
0,41-0,6	Mittel
0,61-0,8	Gut
0,81-1	Sehr gut

Tabelle 9: Bewertung des κ -Koeffizienten

Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand des Cohen Kappa Wertes (Altman, 1991).

2.7.3 Korrelation der Ergebnisse anhand von Kreuztabellen und χ^2 -Analyse

Um die Expression der KSZ Marker CD44 sowie CD166 im gesamten Tumor bzw. der *pushing border* Invasionsfront mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen zu korrelieren, erfolgte eine statistische Korrelation auf der Basis von Kreuztabellen, deren Korrelation mithilfe des χ^2 -Test berechnet wurde. Auch dieser statistische Wert wurde mithilfe von SPSS Windows® (*social sciences computer software v. 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL*) berechnet. Als signifikant wurde ein zweiseitiger Unterschied ab $p < 0.05$ ($\alpha < 5\%$) bewertet. In den Kreuztabellen wurde der Lymphknotenstatus (N0 bzw. N1/2) in den Spalten, die gewonnenen Ergebnisse aus den mikroskopischen Untersuchungen in den Zeilen angeordnet. Bei der Korrelation von Patientenalter und Expression der KSZ-Marker CD44 und CD166 wurden die Altersgruppen in Spalten, die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen in Zeilen angeordnet.

3. Ergebnisse

3.1 Eingesetzte CD44- und CD166-Antikörper binden Antigene spezifisch

Zunächst wurde untersucht, ob die eingesetzten Antikörper spezifisch ihr jeweiliges Antigen erkennen, um für die späteren immunhistochemischen Untersuchungen die Sicherheit eines spezifischen Nachweises zu schaffen. Dazu wurde die Spezifität der Antikörper mithilfe von Western Blot-Analysen untersucht. Dazu wurden Lysate von Zelllinien eingesetzt, die die Antigene CD44 (Abb. 9 A) bzw. CD166 (Abb. 9 B) exprimieren.

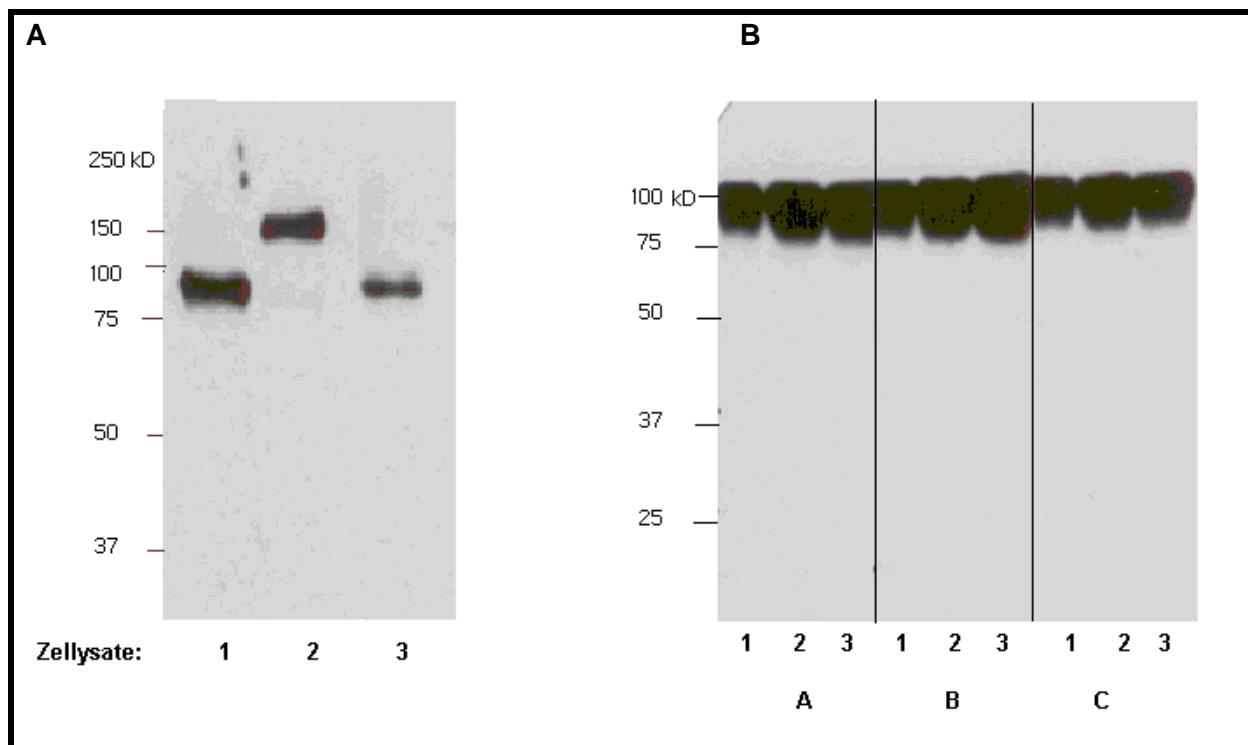


Abbildung 9: Anti-CD44 und Anti-CD166 Antikörper binden spezifisch ihr jeweiliges Antigen

Western Blot Analyse der Spezifität für A) anti-CD44 und B) anti-CD166. Der CD44 spezifische Primärantikörper (BD-Pharmingen™, Cat.No.:555476) erkannte in den Zelllinien SW 480 (1), LS174T (2) und LoVo (3) verschiedene Isoformen CD44. Für den Nachweis der Spezifität von CD166 (Menari, Cat.No: NCL-CD166) wurde ein Lysat der Zelllinie (Santa Cruz Biotechnology, Cat.No: SC-2410) in unterschiedlichen Mengen eingesetzt: 1) 10µg, 2) 20µg, 3) 30µg. Für das Auffinden der optimalen Konzentrationen wurden unterschiedliche Verdünnungen des Primärantikörpers eingesetzt. A: 1:100, B: 1:200, C: 1:500.

In der Western Blot-Analyse des für CD44 spezifischen Antikörpers (Abb. 9 A) wurden für die Zelllinien SW480 (Spur 1), LS174T (Spur 2) und LoVo (Spur 3) Bänder zwischen 80 und 150 kD detektiert. Dieses Ergebnis fällt in den Erwartungsbereich, weil CD44 eine Gruppe von Isoformen umfasst, die durch alternatives Spleißen entstehen. Zusätzlich werden diese posttranslational durch massive Glykosilierung modifiziert, was zu einem breiten Spektrum an Molekulargewichten führt (Borland, 1998; Ponta, 2003). Das Molekulargewicht der Standardisoform CD44s wird mit 80-95kD (Borland, 1998) angegeben, wobei es sich um die kleinste Isoform handelt. Im hier durchgeführten Western Blot wurde in den Zelllinien 1 und 3 die Isoform CD44s, in der Zelllinie 2 eine CD44v-Isoform (Wong, 2004; Biddle, 2013) detektiert. Im Western Blot des für CD166 spezifischen Antikörpers wurde eine einzelne

Banden nachgewiesen, die erwartungsgemäß ein Molekulargewicht von 100 kD aufwies (Abb. 9 B) (Swart, 2002). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten Antikörper spezifisch CD44 bzw. CD166 erkannten, sodass diese nun bedenkenlos in die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzte werden konnten.

3.2 Charakterisierung des eingesetzten Untersuchungskollektivs

Für die Beantwortung der Hypothese wurde ein Kollektiv von Patienten im UICC Stadium II/III gewählt, die sich hinsichtlich der Metastasierung der Lymphknoten voneinander unterschieden (N0 vs. N1/N2). Da der Status des Lymphknotenbefalls bei kolorektalen Karzinomen eine entscheidende Größe bei der Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie ist (Schmiegel, 2008), wurden Tumoren der Gruppe T3N0-2M0 mit mäßiger Differenzierung (G2 nach WHO) gewählt. Somit war der Komparator in diesem Kollektiv der Befall des Lymphknotens (N0 gegen N1/2). Aus einem mithilfe des Tumorzentrums München erstellten Kollektiv wurden auf der Basis der histomorphologischen Erscheinung geeignete Fälle aus dem Archiv des Pathologischen Instituts herausgesucht. Dadurch entstand ein Kollektiv von insgesamt 81 Fällen. In 44 Fällen waren keine Lymphknoten befallen (N0), in den weiteren 37 Fällen lag ein Lymphknotenbefall (N1/2) vor (Tab. 10).

	Gesamtkollektiv	N0	N1/2
Fälle	81	44	37
Männer	42	24	18
Frauen	39	20	19
Alter	73	71	75
T3	81	44	37
N1/2	37	0	37
M0	81	44	37

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Charakterisierung des Kollektivs

Sollte es einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen und der Expression von CD44 bzw. CD166 geben, dann wäre es von besonderem Interesse dieser Ergebnisse in eine diagnostische Anwendung zu überführen. Daher stellt sich die Frage, ob das Kollektiv eine ausreichende Größe hat. Nimmt man für die 81 Patienten eine Normalverteilung nach t-Verteilung an und legt einen zweiseitigen α -Fehler von 5% (0,05) bzw. β -Fehler von 10% (power= 0.9) zugrunde, so erhält man eine Effektgröße von 0,73. Das heißt, dass sich die Werte für μ_0 und μ_1 um das knapp Vierfache (3,7) voneinander unterscheiden (Abb. 10). Das Kollektiv ist also geeignet, den mindestens 3,7-fachen Unterschied zwischen den beiden Kollektiven mit statistischer Signifikanz zu erkennen. Für kleinere Unterschiede müsste das Kollektiv vergrößert werden. Somit eignete sich das

Kollektiv aus statistischer Sicht hervorragend, um klare Zusammenhänge zwischen Expression von CD44 bzw. CD166 und der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen zu bestimmen.

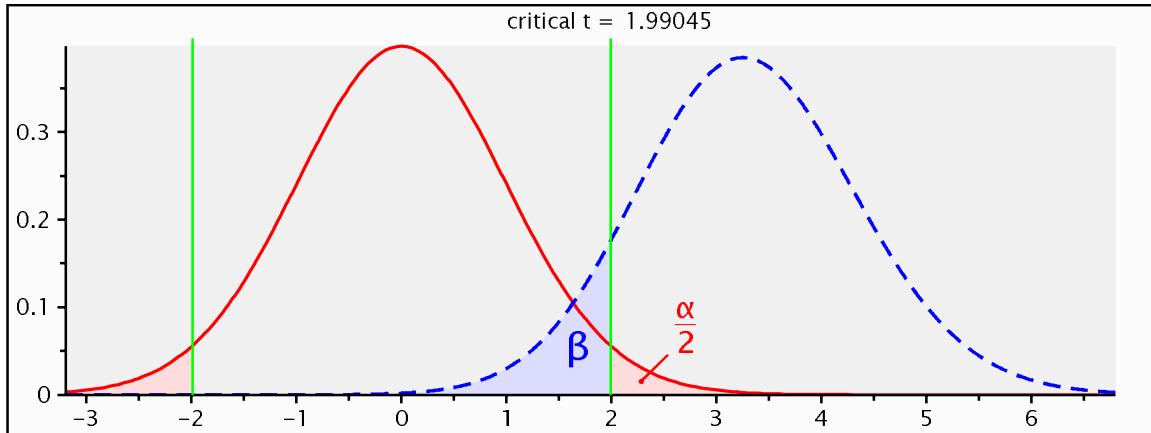


Abbildung 10: Die Kollektivgröße lieferte bei einem zweiseitigen Test und angenommenen Fehlern von $\alpha=5\%$ und $\beta=10\%$ (Power=1- $\beta=90\%$) eine Effektgröße von 0,73

Die Effektgröße ist ein Maß für die Bedeutsamkeit des Effekts und stellt die Differenz der Mittelwerte der beiden Verteilungskurven dar. Das bedeutet, dass bei $\mu_0=1$, μ_1 einen Wert von 0,27 hat. Somit ergibt sich ein Unterschied von $\mu_0/\mu_1=3,7$. Das heißt durch diese Modellierung lässt sich ein mindestens 3,7-facher Unterschied der Mittelwerte der Ergebnisse fassen. Kleinere Unterschiede werden nicht erkannt.

T-Test Korrelation: Zweiseitiges Test Model		
	Seitigkeit	Zwei
Angegebene Daten	α -Fehler	0,05
	β -Fehler	0,08
	Kollektivgröße	44/ 37 ~ N=81
	Effektgröße r	0,731997

Tabelle 11: Bestimmung der Effektgröße mit Hilfe des Programms GPower 3.0. Einstellungen: t-Test, Differenz zwischen zwei unabhängigen Mittelwerten μ_0 , μ_1 . Sensitivitätsberechnung.

3.3 Erstellung eines geeigneten Färbeindex zur Auswertung der Expression der KSSK- Marker CD44 und CD166 im KRK

Nachdem die Spezifität der Antikörper erfolgreich überprüft und ein geeignetes Kollektiv zur Überprüfung der Hypothese erstellt worden war, wurden die ausgewählten histologischen Serienschnitte mit CD44- und CD166-spezifischen Antikörpern immunhistologisch gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mikroskopiert und ausgewertet. Dazu wurden die Schnitte auf Färbeintensität, Unterschied in der Färbung von gesundem Gewebe vs. Tumor und Unterschied in der Färbung der beiden Marker untersucht, um einen Färbeindex zu erstellen, der eine möglichst spezifische Auswertung der Schnitte ermöglichte. Um festzustellen, ob ein Unterschied in der Färbung von gesundem Gewebe und Tumor bestand, wurde zunächst die Expression der Marker im gesamten histologischen Schnitt bei niedrigster Vergrößerung (2.5 x Objektiv) untersucht. Da es in dieser Auswertung weniger um die Intensität einzelner Zellen, sondern mehr um die Reaktivität des KSSK geht, wurden die meisten der Färbungen in der mikroskopischen Übersicht ausgewertet. Zunächst zeigte

sich, dass sich Tumoren stärker angefärbt präsentieren als vergleichbare gesunde Gewebe. Manche Schnitte waren insgesamt sehr stark gefärbt, manche dagegen nur sehr schwach (Abb. 11).

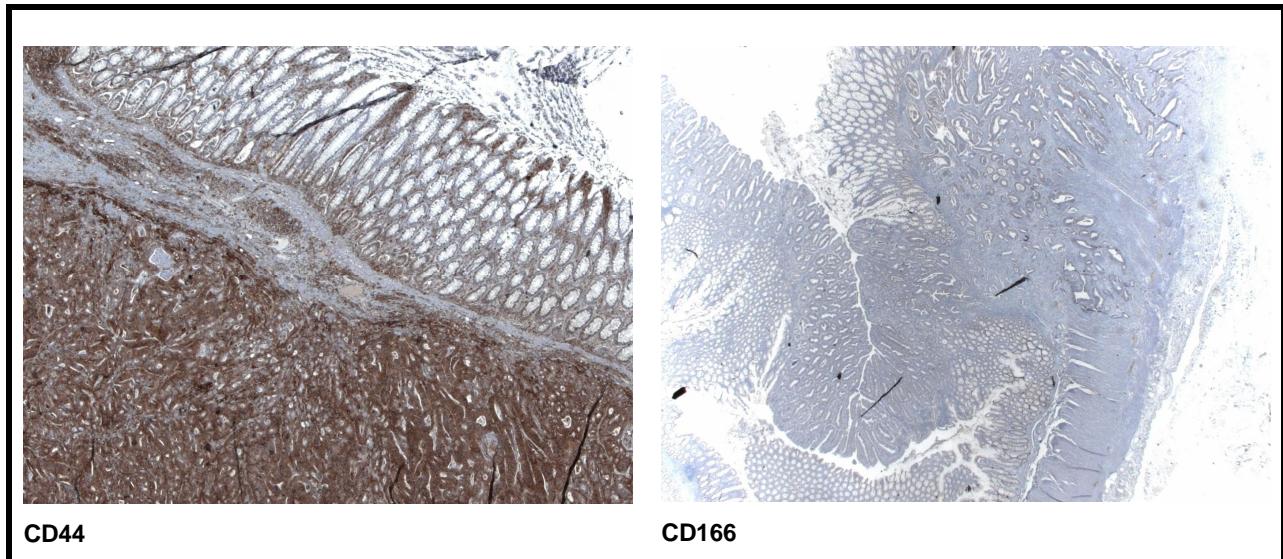


Abbildung 11: Unterschied in der Färbeintensität der histologischen Schnitte

Zur Erklärung der Auswertung der Expression der KSZ-Marker wird links ein histologischer Schnitt mit einer CD44 Überexpression dargestellt. Dem gegenüber steht rechts ein histologischer Schnitt, welcher mit dem KSZ-Marker CD166 gefärbt wurde. In diesem Beispiel liegt keine Überexpression vor.

Ein Unterschied konnte zwischen den Färbungen CD44 und CD166 festgestellt werden. Da von jedem ausgewählten Tumorareal Serienschnitte angefertigt wurden, wovon je einer mit CD44 bzw. CD166 gefärbt wurde, konnten diese miteinander verglichen werden (Abb. 12). Wie man klar erkennen kann, wurden nicht einzelne Zellen interpretiert, sondern das Erscheinungsbild ganzer Areale (KSSK). Somit wurden große Zellpopulationen ausgewertet. Insgesamt wurden in der CD44-Färbung mehr Zellen gefärbt (Abb. 12a) als in der CD166 Färbung (Abb. 12b). Die von CD166 gefärbten Zellen waren meist auch in der CD44-Färbung positiv. Somit exprimieren im KRK mehr Zellen den Marker CD44 als CD166.

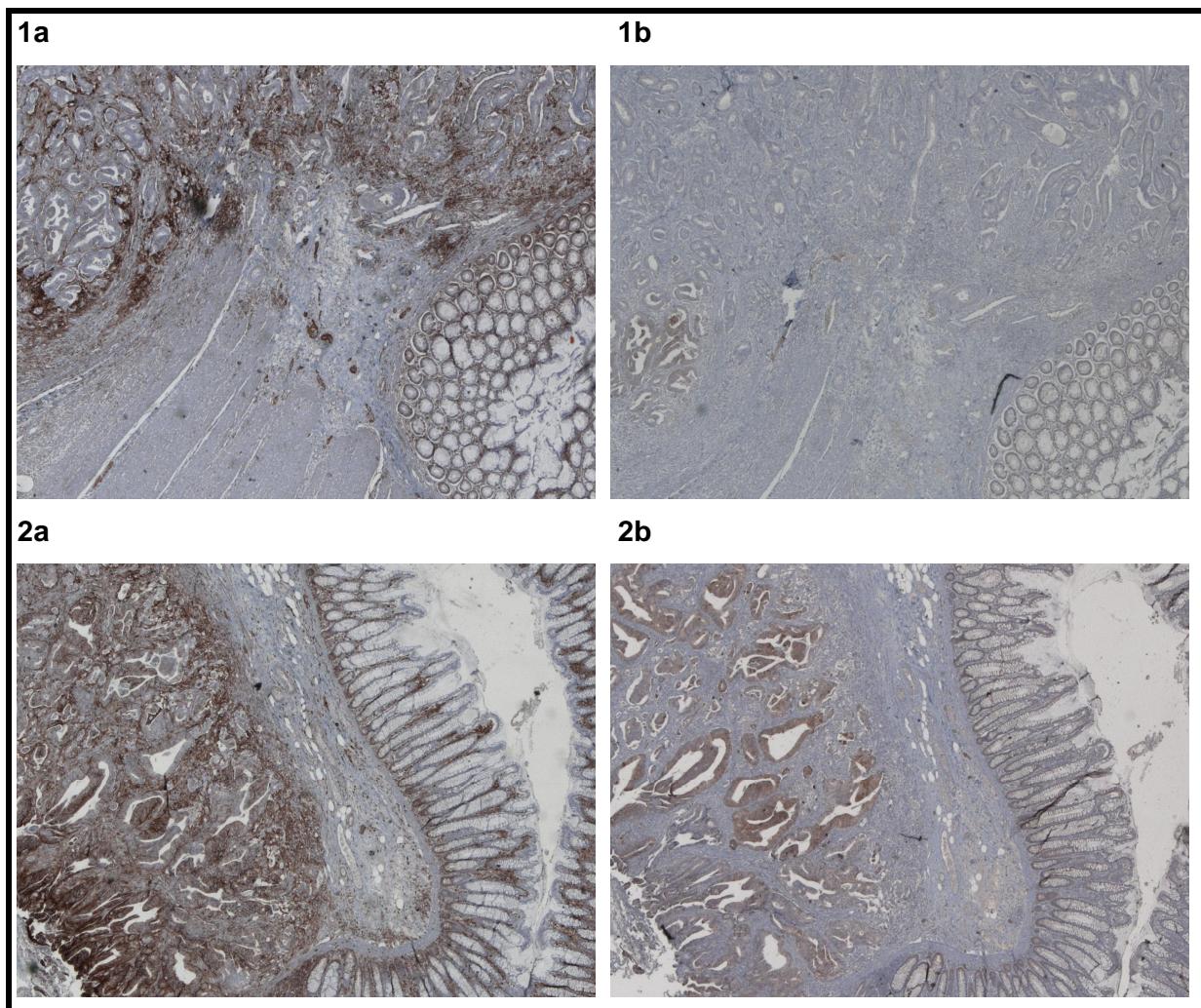


Abbildung 12: Darstellung eines vergleichbaren Tumoreals mit IHC-Färbung von CD44 bzw. CD166 zum Vergleich der Färbungsmuster und Intensität

1a)CD44; 1b)CD166

2a)CD44; 2b)CD166

Um die Bildergebnisse auswerten zu können, musste zunächst ein geeigneter Färbeindex entwickelt werden. Dieser musste trotz unterschiedlicher Färbung der beiden Marker auf beide Färbungen anwendbar sein und die variierende Färbeintensität der einzelnen Schnitte berücksichtigen. Da in manchen Schnitten gesundes Gewebe sowie Tumor stark gefärbt waren, musste die Färbung des gesunden Gewebes mit in die Auswertung einbezogen werden. Somit wurde eine Überinterpretation von stark gefärbtem Tumor verhindert und in Relation mit dem gesamten Schnitt gesetzt.

Eine Bewertung erfolgte somit durch den direkten Vergleich zwischen gefärbtem Tumorgewebe und gesundem Gewebe in Prozent. Hierfür gab es drei Möglichkeiten:

1. Das Tumorgewebe war $\geq 10\%$ stärker gefärbt als gesundes Gewebe
2. Das Tumorgewebe war $< 10\%$ stärker gefärbt als gesundes Gewebe
3. Es fand sich kein Unterschied in der Färbung zwischen tumorösem und gesundem Gewebe.

Hiermit wurde ein Färbeindex geschaffen (Tab. 12). Unterschied sich die Färbung nicht, oder

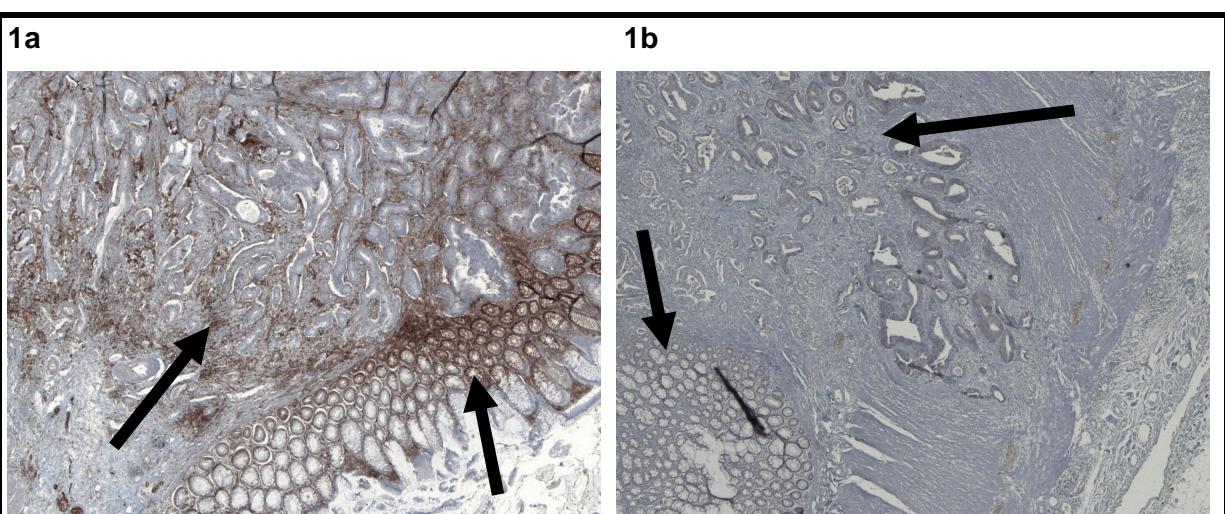
war sogar mehr gesundes Gewebe als Tumor gefärbt, galt der Tumor als nicht gefärbt und wurde mit 0 bewertet. War gering mehr Tumor als gesundes Gewebe gefärbt (bis zu 10% Unterschied), wurde der Schnitt mit 1 bewertet. Im Fall, dass das gefärbte Gewebe hauptsächlich tumorösen Charakters war (mehr als 10%), wurde der Schnitt mit 2 bewertet. Mit dieser Bewertung wurde das Augenmerk auf den Prozentsatz des gefärbten Gewebes im Vergleich tumoröses versus gesundes Gewebe gelegt und nicht auf die Färbungsintensität. Dadurch konnte eine Überinterpretation von insgesamt stark gefärbtem Gewebe verhindert werden. Anhand des erarbeiteten Färbeindexes wurden nun die Schnitte ausgewertet.

Färbeindex	Prozentsatz der Färbung im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe
0	Prozentsatz der Färbung im Tumorgewebe gleich dem gesunden Gewebe
1	< 10% des Tumorgewebes sind stärker gefärbt als das gesunde Gewebe
2	≥ 10% des Tumorgewebes sind stärker gefärbt als das gesunde Gewebe

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Färbeindex und dem Prozentsatz der Färbung von Tumorgewebe und gesundem Gewebe nach immunhistochemischer Färbung

3.4 KSSK- Marker CD44 und CD166 werden im KRK mit *pushing border*-Invasionsfront im Vergleich zum normalem Gewebe überexprimiert

Vor der Prüfung der eigentlichen Hypothese wurde zunächst untersucht, ob der gewählte Färbeansatz wirklich funktionierte. In diesem Fall würde man in den Tumorbereichen eine verstärkte Expression der beiden Marker CD44 und CD166 erwarten. Erst mit dieser Plausibilität konnte man davon ausgehen, dass die Antikörper in der Lage sind, malignes transformiertes Tumorgewebe überhaupt spezifisch erkennen zu können. Dazu wurden die histologischen Schnitte anhand des erarbeiteten Färbeindex ausgewertet (Abb.13).



Fortsetzung siehe nächste Seite

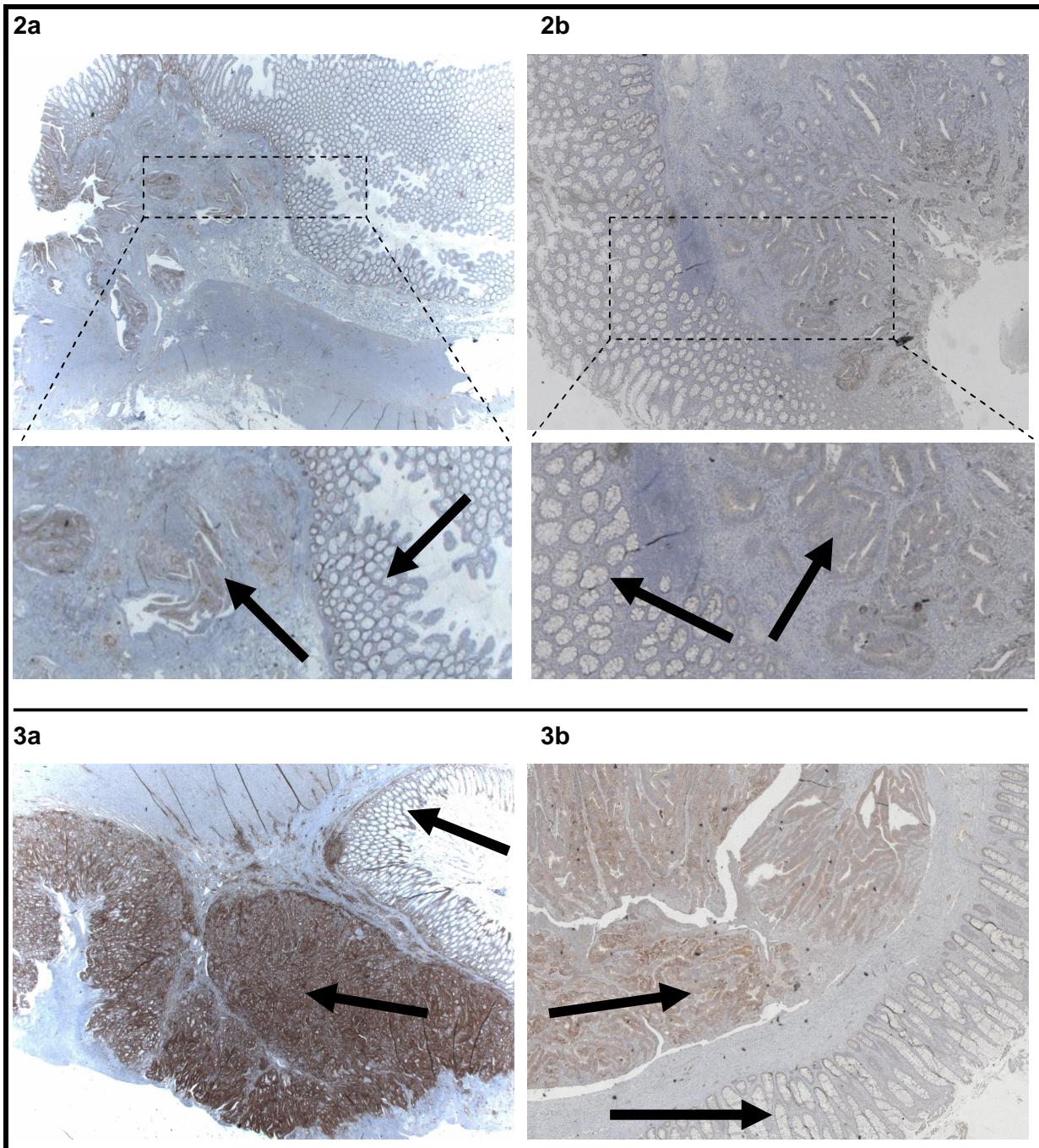


Abbildung 13: Darstellung zur Auswertung der histologischen Schnitte nach erfolgter immunhistologischer Färbung der KSSK-Marker CD44 und CD166

- 1) Tumorges Gewebe gleich/schwach gefärbt wie gesundes Gewebe: a)CD44; b)CD166
- 2) Tumorges Gewebe <10% stärker gefärbt als gesundes Gewebe: a)CD44; b)CD166
Zum Verständnis wurden die markierten Bereiche vergrößert.
- 3) Tumorges Gewebe >10% stärker gefärbt als gesundes Gewebe: a)CD44; b)CD166

In der CD44-spezifischen Färbung wurden 41 Schnitte dem Färbeindex 2 ($\geq 10\%$ des Tumorgewebes stärker gefärbt als das gesunde Gewebe), 26 Schnitte dem Färbeindex 1 ($< 10\%$ des Tumorgewebes stärker gefärbt als das gesunde Gewebe) und 12 Schnitte dem Index 0 (Prozentsatz der Färbung im Tumorgewebe gleich dem gesunden Gewebe) zugeordnet. Insgesamt ergab sich dadurch bei der Färbung von CD44 eine Überexpression in 84.8%, bei CD166 in 76.8% der Fälle (Abb. 13, siehe dazu auch

Ergebniszusammenfassung in Tab. 16). Somit finden sich in kolorektalen Karzinomen mehr KSSK als in gesundem Gewebe. Dies entspricht der Erwartung und validiert, dass der gewählte Ansatz für die geplante Untersuchung geeignet ist.

3.5 Patientenalter und Expressionsstärke von CD44 bzw. CD166 korrelieren nicht miteinander

In der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen Patientenalter und erhöhtem Nachweis von CD44 und CD166 beschrieben (Patel, 2009). Deshalb wurde dieser Sachverhalt vor der weiteren Korrelation der gewonnenen Ergebnisse mit dem Lymphknotenstatus untersucht. Es bestünde nämlich die Gefahr, dass die Auswertung der immunhistochemischen Färbung durch den Faktor Alter verfälscht würde. Die Untersuchung dieses Zusammenhangs ist von besonderer Bedeutung, weil es einen klaren Zusammenhang zwischen der Tumorgenese und dem Alter von Patienten gibt. Daher wären die Ergebnisse nicht unabhängig, was eine mögliche Fehlerquelle bei der Datenauswertung darstellen könnte. Die Patienten wurden daher in die drei Altersgruppen (1) 1-50 Lebensjahre (LJ), (2) 51-75LJ und (3) 76-99LJ unterteilt (Tab. 13). Anschließend erfolgte eine Korrelation der Expression von CD44 und CD166 mit den drei Altersgruppen. Hierbei ließ sich kein Zusammenhang zwischen Alter und Expression der untersuchten Marker herstellen (CD44: $p= 0.097$, CD166: $p= 0.059$). Somit war es valide, die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen unabhängig vom Patientenalter aus zu werten.

		Gesamt	1-50LJ	51-75LJ	76-99LJ	p-Wert
CD44	>10%	39	5	19	15	0.097
	1-10%	26	0	18	8	
	0%	10	0	4	6	
CD166	>10%	25	2	12	11	0.059
	1-10%	36	0	22	14	
	0%	18	4	9	5	

Tabelle 13: Expression der Marker CD44 (CD44 purified mouse anti-human monoclonal antibody, G44-26, BD Biosciences Europe) und CD166 (CD166 mouse monoclonal antibody, MG/07, Visionbiosystems Novocastra, UK) korreliert nicht mit Alter der Patienten

3.6 Bei KRK besteht keine Korrelation zwischen dem Auftreten von LK-Metastasen und einer erhöhten Expression der KSSK- Marker CD44 und CD166 an der PB-Invasionsfront

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die KSSK- Marker CD44 und CD166 unabhängig vom Patientenalter ausgewertet werden konnten, wurde untersucht, ob diese, wie in der Hypothese behauptet, ein prognostischer Marker für Lymphknotenmetastasierung sein könnten. Dafür wurden die immunhistochemischen Ergebnisse mit dem Lymphknotenstatus der Tumoren korreliert. Dazu wurde als statistisches Werkzeug die χ^2 -Analyse eingesetzt. Hierbei ergab sich weder für CD44 ($p=0.163$) noch für CD166 ($p=0.437$) eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter Expression und Lymphknotenmetastasen (siehe dazu auch Ergebniszusammenfassung in Tab. 16). Somit korrelierte weder die Expression von CD44 noch CD166 mit der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen in kolorektalen Karzinomen, sodass beiden Marker keinen prognostischen Wert in einer klinisch-pathologischen Diagnostik besitzen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich im KRK mehr KSSK nachweisen lassen, als in gesundem Gewebe wurde nun der Hypothese nachgegangen, ob sich diese Komplexe verstärkt an der PB Invasionsfront- also die Invasionsfront des Tumors in gesundes Gewebe von KRK befinden und ob sich daraus Rückschlüsse auf den Lymphknotenstatus ziehen lassen. Denn wie in der Einleitung erläutert, werden an der PB-Invasionsfront migrierende KSZ vermutet, welche für die Ausbildung von Metastasen verantwortlich gemacht werden (Brabertz, 2005). Somit müssten sich an dieser Stelle auch vermehrt KSSK befinden.

Um die Färbung der einzelnen Schnitte und Marker auswerten und vergleichen zu können, musste auch für die PB Invasionsfront ein spezielles Auswertungsschema erarbeitet werden. Bei Sichten der Schnitte viel wie erhofft auf, dass sich die PB als einziges Tumorareal in vielen Fällen durch die Färbung sehr stark vom sonstigen Tumor abhob, wohingegen in manchen Schnitten kein Unterschied in der Färbeintensität bestand. Bei der Beurteilung der PB- Invasionsfront wurde daher zwischen einer positiven und einer negativen Färbung unterschieden. Ein Schnitt wurde als positiv gewertet, wenn die PB stärker gefärbt war als das restliche Tumorgewebe. Eine Negativ-Bewertung bedeutete, dass sich die PB nicht vom umgebenden Tumorgewebe abhob (Tabelle 14, Abb. 10).

Färbeindex	Färbung der PB-Invasionsfront im Vergleich zum restlichen Tumorgewebe
Positiv (+)	Stärkere Färbung der PB
Negativ (-)	Weniger starke oder gleich starke Färbung

Tabelle 14: Erstellter Färbeindex zur mikroskopischen Auswertung der PB-Invasionsfront

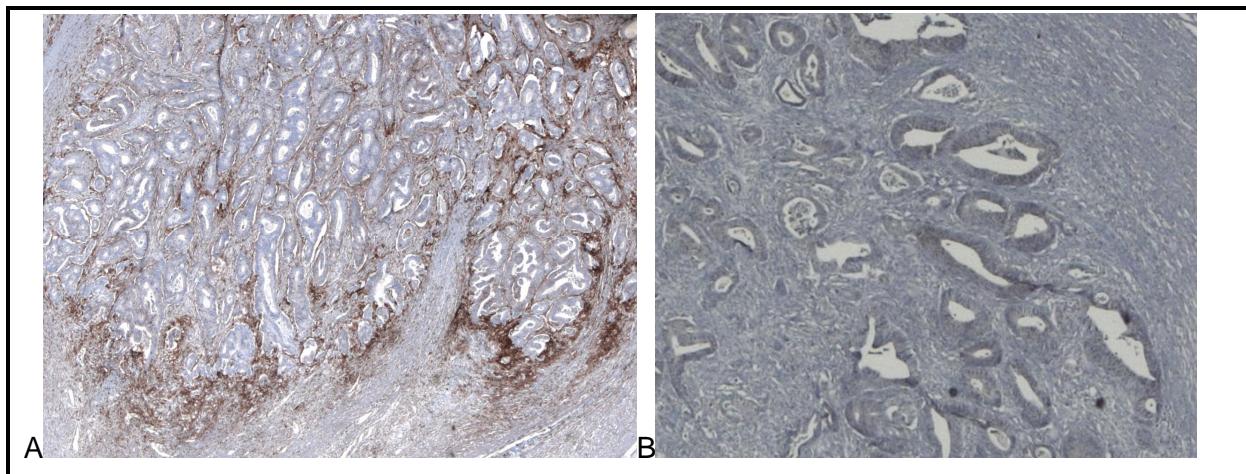


Abbildung 14: Positive und negative Färbung der PB Invasionsfront im KRK anhand von immunhistologischer Färbung des KSSK (hier mit CD166-Färbung)

A) Die PB hebt sich durch die intensive Färbung stark vom Umgebenden Gewebe ab und wurde somit als positiv gewertet

B) Bei diesem Bild ist an der PB kaum eine Färbung erkenntlich. Die Pushing Border wurde hier als negativ bewertet.

Nach erarbeiten der Färbeindexes konnten nun die Schnitte anhand dieses ausgewertet werden. Dabei wurde in der Färbung mit CD44 in 55 Fällen (74.3%) die PB als positiv bewertet, in 19 Fällen als negativ. In der Färbung mit CD166 wurden hingegen in 22 Fällen (27,3%) die PB als positiv, in 57 Fällen als negativ bewertet (Tabelle 16).

Somit befanden sich die CD44 positiven KSSK hauptsächlich an der PB, wohingegen nur ein Drittel der CD166 positiven KSSK an der PB zu detektieren waren (Abb.15). Daraus kann gefolgert werden, dass CD44-positive im Gegensatz zu CD166-positive Zellen eine Hauptfunktion an der PB zukommt und dass diese somit eine Rolle in Prozess der Metastasierung spielen.

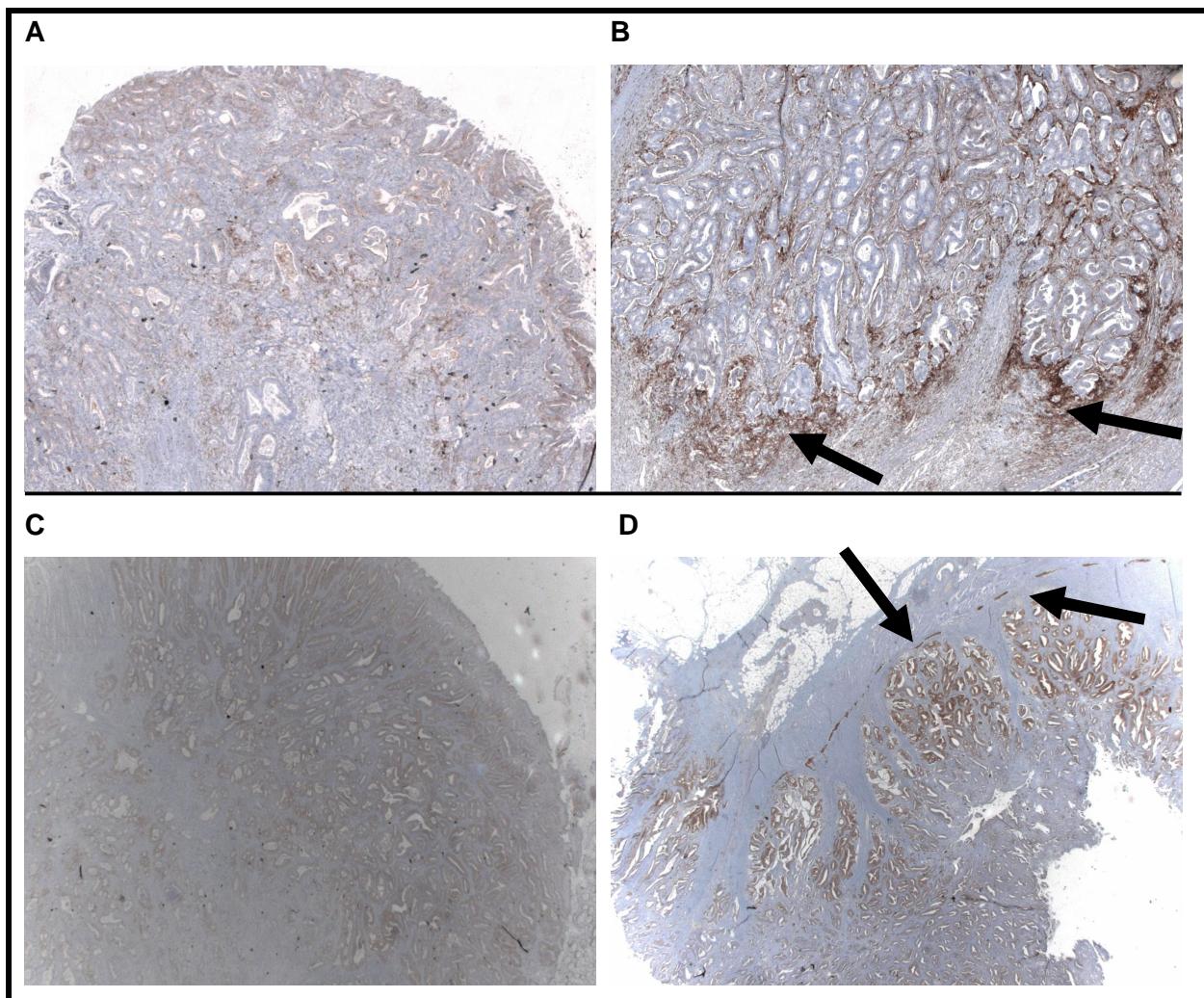


Abbildung 15: Darstellung der Expression der KSSK- Marker CD44 und 166 in der PB-Invasionsfront nach immunhistologischer Färbung

A)CD44 PB negativ B)CD44 PB positiv C)CD166 PB negativ D)CD166 PB positiv

Um mit den erhobenen Ergebnissen der aufgestellten Hypothese nachzugehen, ob sich durch den Nachweis von KSSK an der PB Rückschlüsse auf den Lymphknotenstatus ziehen lassen, erfolge eine statistische Korrelation der gewonnenen Daten mit dem LK-Status. Dies geschah statistisch durch die χ^2 -Analyse. Es ließen sich in beiden Fällen keine signifikanten Korrelationen (CD44: $p=0.145$, CD166: $p=0.99$) zwischen der Expression der einzelnen Krebsstammzellmarker und einem positiven LK-Status herstellen (Tab. 16).

Somit besteht keine Korrelation zwischen der Expression der KSSK- Marker CD44 und CD166 in der PB-Invasionsfront und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen in kolorektalen Karzinomen. Der Prozess der Lymphknotenmetastasierung scheint von anderen Faktoren abzuhängen und ist somit noch komplexer als angenommen. Damit dienen diese beiden Marker nicht als prognostischer Marker für Lymphknotenmetastasen.

3.7 Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Unabhängigkeit der Auswertung

Da jede Auswertung von immunhistologisch gefärbter Schnitte auf einer subjektiven Bewertung basiert, wurde ein gewisses Mindestmaß der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicher gestellt, indem die Bewertung zweimal erfolgte. Dabei wurde bewusst ein bestimmter Zeitraum zwischen die beiden Auswertungen gelegt, um eine Erinnerung so weit wie möglich auszuschalten. Anschließend wurden die beiden Auswertungen miteinander verglichen. Es wurde angenommen, dass bei einer hohen Reproduzierbarkeit die Ergebnisse zwischen den beiden Auswertungen identisch oder zumindest sehr stark übereinstimmend sein sollten. Der Grad der Übereinstimmungen wurde mithilfe des Cohen's κ -Koeffizient geprüft (Tab. 9, siehe Material und Methoden 2.7.2). Hierbei ergab sich bis auf die Färbung von CD166 im N1 Kollektiv, welche eine gute Übereinstimmung ergab, eine sehr gute Übereinstimmung (Tab. 15).

Wegen der hohen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der folglich guten bis sehr guten κ -Werte kann davon ausgegangen werden, dass die Auswertung nur zu einem geringen Anteil einem subjektiven Einfluss unterlag und die Werte als valide angesehen werden können.

Variable	Kollektiv	Kappa Berechnung	Signifikanz
Färbedichte in Prozent (%)	CD166 N1	0,791	< 0.001
	CD166 N0	0,876	< 0.001
	CD 44 N1	0,91	< 0.001
	CD 44 N0	0,872	< 0.001
Pushing Border (PB)	CD166 N1	1,000	< 0.001
	CD166 N0	1,000	< 0.001
	CD44 N1	1,000	< 0.001
	CD44 N0	1,000	< 0.001

Tabelle 15: Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit, die sich in hohen (Färbedichte) bis perfekten (pushing border) κ -Werten zeigt. Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe des Cohen's Korrelationskoeffizienten κ überprüft.

3.8 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

		Gesamtes Kollektiv	N0	N1/2	p-Wert
Klinisch-pathologische Charakterisierung des Kollektives	Fälle	81	44	37	
	Männer	42	24	18	
	Frauen	39	20	19	
	Alter	73	71	75	
	T3	81	44	37	
	N1/2	37	0	37	
	M	0	0	0	
CD44: Färbung des tumorösen Gewebes im Vergleich zu Gesundem	2	41	27	14	0,163
	1	26	12	14	
	0	12	5	7	
CD44: Färbung der Pushing Border	Positiv	55	27	28	0,145
	Negativ	19	13	6	
CD166: Färbung des tumorösen Gewebes im Vergleich zu Gesundem	2	25	15	10	0,437
	1	38	22	16	
	0	18	8	10	
CD166: Färbung der Pushing Border	Positiv	22	10	12	0,99
	Negativ	57	26	31	

Tabelle 16: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Expression der KSSK- Marker CD44 und 166 und Lymphknotenmetastasen

4. Diskussion

In Deutschland ist das KRK geschlechterunabhängig die zweithäufigste Tumorerkrankung. Die 10-Jahres- Überlebensrate liegt bei 45%, die Rezidivrate nach erfolgter Therapie bei 40%. Die Haupttodesursache beim KRK ist Fernmetastasierung (O'Connell et al, 2004). Nur in 15-20% der Fälle liegt bereits bei Diagnosestellung eine nachweisbare Metastase vor, sodass für die restliche Gruppe andere Indikatoren oder Biomarker gefunden werden müssen, die eine Fernmetastasierung verlässlich vorherzusagen helfen. Nach der weltweit gültigen UICC-Stadieneinteilung des KRK, wird auf Basis des TNM-Systems, also der Infiltrationstiefe des Tumors (T), dem Vorhandensein von Lymphknoten (N) oder Fernmetastasen (M) über das therapeutische Vorgehen entschieden. In diesem Klassifikationssystem stellt die lymphogene Metastasierung (N+) einer der wichtigsten prognostischen Faktoren dar. Sind bereits Lymphknotenmetastasen nachweisbar (N1, N2), wird ein deutlich rigideres Therapieregime verfolgt, da die Prognose drastisch sinkt. Um einen Zusatznutzen für das therapeutische Vorgehen beim KRK zu erhalten, wäre es daher von großem Interesse, Patienten mit Risiko für Fernmetastasierung bereits vor der eigentlichen Fernmetastasierung identifizieren zu können. Auf diese Weise würde auch den Patienten ohne Risiko für eine Fernmetastasierung eine für sie nutzlose Chemotherapie erspart werden. Weiterhin ist zu bedenken, dass bei einer pathologischen Aufarbeitung der Lymphknoten Metastasen nur ab einer bestimmten Minimalgröße erkannt werden können, sodass eine gewisse Zahl an vermeintlichen N0-Fällen der N+ Gruppe zuzurechnen ist. Grundsätzlich eignen sich für Untersuchungen keine Fernmetastasen. Zum einen sind sie oft inoperabel oder operativ schwer zugänglich, was zu kleinen Untersuchungskollektiven führt. Außerdem bleibt unklar, ob sich die Gruppe der Patienten ohne Fernmetastasierung zur Zeit der Diagnosestellung biologisch von denen mit Fernmetastase unterscheidet, sodass für die erste Gruppe gar kein Untersuchungsgut (M0) für einen Vergleich zur Verfügung stünde. Daher bieten sich Untersuchungen der Lymphknoten an. Denn die nächstliegenden Lymphknoten werden bei den meisten operativen Eingriffen mit entfernt, um anschließend auf Metastasenbildung untersucht zu werden. Daher stehen hier große Kollektive für Untersuchungen zur Verfügung. Da die lymphogene Metastasierung im linearen Modell der Metastasenbildung als erster Schritt zur Fernmetastasierung gilt (Klein, 2009), kommt ihr zudem ein hoher prognostischer Wert zu. Daher hat sich die hier vorliegende Arbeit auf die Lymphknotenmetastasierung als Indikator für eine Fernmetastasierung konzentriert.

Aufgrund einer Vielzahl an Untersuchungen ist bereits bekannt, dass Tumorinitiation, Metastasierung und Chemoresistenz von einer lediglich kleinen Anzahl von Tumorzellen, den Krebsstammzellen (KSZ), abhängen (Brabetz, 2005). KSZ vermitteln einige der *hallmarks of cancer*, wie Chemoresistenz (Todaro, 2007), EMT (epithelial-mesenchymale

Transition) (Mani, 2008) und die Fähigkeit zur Metastasierung (Ricci-Vitiani and Pagliuca, 2008). EMT stellt dabei eine wichtige Voraussetzung für die Metastasierung dar (Brabietz, 2013). Da in kolorektalen KSZ (kKSZ) *stemness* durch einen aktivierten Wnt-Signalweg induziert wird (Vermeulen, 2008), lassen sich kKSZ durch die Expression von nukleärem β -Catenin identifizieren. Somit wird ein *in situ* Nachweis von kKSZ möglich. So konnte gezeigt werden, dass sich kKSZ hauptsächlich an der *pushing border* (PB), der Invasionsfront, im KRK befinden (Brabietz, 2005; Huff, 2006). Erwartungsgemäß korreliert eine hohe Zahl an kKSZ an der Invasionsfront mit schlechtem Überleben also einer schlechten Prognose (Brabietz, 2005; Kajiwara, 2011).

Tumorzellen sind eine ausgesprochen plastische Zellpopulation, denn zum einen können aus kKSZ alle differenzierten Typen an Tumorzellen entstehen, zum anderen können jedoch auch aus ausdifferenzierten Tumorzellen wieder kKSZ induziert werden (Vermeulen, 2010). Für die Transdifferenzierung in kKSZ wurden Faktoren des Tumorstromas identifiziert, sodass dem *Microenvironment* eine essentielle regulatorische Rolle in der Tumorprogression und Tumopathologie zukommt (Liotta and Kohn, 2001). Gleichzeitig wird deutlich, dass die Regulation und Kontrolle des kKSZ-Kompartiments ein komplexes System darstellt. Insbesondere handelt es sich bei dem KSZ-Konzept nicht, wie bislang angenommen, um ein intrinsisches, sondern um ein bilaterales Konzept (Schwitalla, 2013) in welchem KSZ von ihrem Microenvironment abhängig sind und von diesem reguliert werden. Somit sollte neben den KSZ auch das Microenvironment von prognostischem Wert sein. Diesem Zusammenhang Rechnung tragend wurde der gesamte Krebsstammzell-Stroma-Komplex (KSSK) in die Untersuchungen einbezogen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Ausprägung des KSSK einen Prognosefaktor für die Lymphknotenmetastasierung darstellt. In KRK werden KSZ insbesondere an der *pushing border* Invasionsfront gefunden. Deshalb wurde ein besonderes Augenmerk auf KRK mit Ausbildung einer infiltrativen Invasionsfront gelegt, weil diese exemplarisch eine KSSK in diesem Kompartiment ausbilden sollten.

Insbesondere wurden für die Untersuchung Marker eingesetzt, die sowohl KSZ wie deren umgebendes Stroma - also das *Microenvironment* - identifizieren, um so den gesamten KSSK untersuchen zu können. Weiterhin sollten sich die Marker immunhistochemisch nachweisen lassen. Daher fiel die Wahl auf die beiden Marker CD44 und CD166.

CD44 ist ein membranöses Glykoprotein, das durch eine große Funktionsvielfalt gekennzeichnet ist, die in erster Linie durch verschiedene Isoformen vermittelt wird. Die Isoformen entstehen durch differentielles Splicing und Glykosilierung (Borland, 1998). CD44 wird auf Stromazellen, wie Lymphozyten, Makrophagen, Schwannschen Zellen aber auch auf mesenchymalen SZ (Kogeler, 2004) und KSZ (Du, 2008) nachgewiesen. In Zusammenhang mit KRK korreliert die CD44 Expression signifikant mit Metastasierung (Dalerba, 2007).

CD166 ist ein Leukozyten-Zelladhäsions-Molekül, das besonders bei Wachstums- und Migrationsprozessen exprimiert wird (Swart, 2002). Es wird von Stromazellen mit leukozytären, neuronalen, epithelialen oder hämatologischen Ursprungs exprimiert (Pollard and Earnshaw, 2002) aber auch von kKZK (Dalerba, 2007). Im KRK korreliert eine CD166-Überexpression signifikant (Weichert, 2002) mit kürzerem Überleben. Wegen dieser breiten Expression auf Zellen des Stomas und kKSZ und somit einer Markierung des KSSK waren beide Marker hervorragend für die Untersuchung der Hypothese geeignet.

Überraschenderweise konnte keine Korrelation zwischen der Expression der KSSK-Marker CD44 bzw. CD166 und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen an der *pushing border*-Invasionsfront im KRK aufgezeigt werden. Daraus lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ableiten:

1. Beide Marker sind nicht für einen klinischen Einsatz als Prognoseparameter geeignet.
2. Es könnte sein, dass kKSZ bzw. KSSK nicht ursächlich für die Lymphknotenmetastasierung verantwortlich sind. Allerdings wurde gezeigt, dass der Nachweis von kKSZ und deren Microenvironment mit einer schlechten Prognose einhergehen (Brabietz, 2005; Medema and Vermeulen, 2011; Schwitalla, 2013), und dass KSK ursächlich am Metastasierungsprozess beteiligt sind (Todaro et al, 2007; Dieter et al, 2011). Und wie bereits mehrfach erwähnt, hängt die Prognose vom Nachweis von Metastasen (LK- sowie Fernmetastasen) ab (siehe Einleitung 1.1.2).
3. Zu diskutieren bleibt also, ob kKSZ bzw. der KSSK lediglich für die Fernmetastasierung und nicht für die Lymphknotenmetastasierung verantwortlich sind. Obwohl der Metastasierungsprozess bis heute nicht vollständig verstanden ist, gilt im linearen Metastasierungsmodell die Annahme, dass er kaskadenartig fortschreitet. So gelangen Tumorzellen aus dem Primärtumor zunächst in lokale Lymphknoten, um dort Lymphknotenmetastasen auszubilden. Anschließend entwickeln sich aus diesen primär lokalen Metastasen, durch weitere Tumorzellstreuung, sekundäre Fernmetastasen (Klein, 2009). Dieses Modell wurde im TNM-System abgebildet (siehe Einleitung 1.1.2), das zur Einteilung des Tumorstadiums herangezogen wird. Dass diese Klassifikation auf einer richtigen Basis fundiert, kann daraus geschlossen werden, dass sie Prognosen über den klinischen Verlauf schafft. Allerdings hat dieses System noch keinen perfekten prognostischen Wert. Das kann daran liegen, dass nicht alle Lymphknotenmetastasen erkannt werden und damit Tumoren fälschlicherweise als N0 klassifiziert werden. Unter Annahme der Stufenprogression und der darin enthaltenen linearen Metastasierung sollten kKSZ bzw. KSSK nicht nur an der Fernmetastasierung beteiligt sein, sondern auch für die Lymphknotenmetastasierung eine essentielle Rolle spielen.
4. Somit drängt sich die Annahme auf, dass die beiden hier verwendeten Marker CD44 und CD166 für die Prognose der Lymphknotenmetastasierung nicht geeignet zu sein

scheinen. Daraus folgt umgekehrt wie zukünftige Untersuchungsansätze modifiziert werden könnten, um den vorhandenen Zusammenhang zwischen KSSK und Lymphknotenmetastasierung überhaupt und dann besser zu charakterisieren.

5. Nahe liegend wäre es auch, eine mangelhafte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als triviale Möglichkeit des negativen Ergebnisses und damit als Ursache für die fehlende Korrelation verantwortlich zu machen. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, weil zum einen eine Analyseregel mit klaren Regeln für die Auswertung geschaffen wurde und zum anderen diese durch die Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit Hilfe des Cohen' κ -Korrelationskoeffizienten als praktikable und reproduzierbare Regel validiert werden konnte.
6. Eine weitere grundsätzliche Einflussgröße könnten Kollektivgröße oder mangelnde Spezifität des Nachweises sein. Mit dem vorhandenen Kollektiv konnten Unterschiede im Bereich des 4-fachen Faktors erkannt werden. Wenn der Unterschied zwischen N0 und N+ kleiner ist, kann es durchaus sein, dass dieser nicht in der Untersuchung erkannt wurde. Jedoch stellt sich dann die Frage, ob dieser Parameter eine Rolle in der Diagnostik spielt, weil immunhistochemische Untersuchungen wegen der subjektiven Komponente im Routineeinsatz stets einen erheblichen Unterschied benötigen. Die Spezifität des Analysesystems wurde klar gezeigt, sodass dieses Argument keine Bedeutung hat.
7. Ebenfalls ausschließen lassen sich statistische Ursachen in der Planung. So wurde geprüft, dass die Färbeergebnisse nicht mit anderen klinisch-pathologischen Parametern, insbesondere dem Patientenalter (Patel, 2009), korrelierten, sodass von einer Unabhängigkeit ausgegangen werden kann.
8. Da zwischen der Expression der KSSK-Marker CD44 und CD166 an der PB-Invasionsfront von KRK einerseits und der Lymphknotenmetastasierung andererseits keine Korrelation besteht, stellt sich somit die Frage, wie zukünftige Untersuchungsansätze modifiziert werden könnten um einen möglicherweise vorhandenen Zusammenhang zwischen KSSK und Lymphknotenmetastasierung besser und überhaupt charakterisieren zu können. Denn von der Plausibilität her ist ein solcher Zusammenhang naheliegend.

Ein Hauptproblem kann in der Auswahl geeigneter KSZ-Marker liegen. Denn keiner der Marker, wie CD44 (Tereda, 2002; Martin-Redon, 2003), CD133 (Wang, 2002; Ricci-Vitiani, 2007), EpCAM (Dalerba, 2007), CD166 (Bruder, 1998; Weichert, 2004), CD2 (Shakleton, 2006), CD34 (Miraglia, 1997), CD24 (Vermeulen, 2008), Lgr5 (Vermeulen, 2008) oder nukleäres β -Catenin (Vermeulen, 2008) ist für KSZ oder KSSK spezifisch. Eine Möglichkeit die derzeit diskutiert wird, um einen möglichst hohen prognostischen Nutzen aus der

immunhistologischen Färbung von Tumoren ziehen zu können, ist die Untersuchung der Co-Expressionen mehrerer Marker (Horst, 2009; Schwitalla, 2013). Denn es konnte gezeigt werden, dass sich durch Untersuchung von Co-Expressionen Prognosen mit einer höheren Qualität treffen lassen. Zudem wird angenommen, dass die Auswertung mehrerer Marker robuster ist (Horst, 2009, Neumann, 2011). So kann beispielsweise anhand der gemeinsamen Verwendung der Marker CD133, CD166 und CD44 eine Unterscheidung zwischen einem niedrigen und hohen Risiko für Metastasierung im KRK erfolgen. Diese Trennung gelang jedoch nicht, wenn nur ein einziger Marker eingesetzt wurde (Horst, 2009). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Arbeit, die sich auf den Transkriptionsfaktor SOX2 konzentrierte. SOX2 ist in die Induktion von pluripotenten Stammzellen involviert. Zudem gilt es als β -Catenin-Repressor, das wie bereits erwähnt, ein Indikator für die Tumorprogression darstellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die SOX2 Expression mit dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen im KRK korreliert und eine Überexpression mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Um den Zusammenhang zwischen SOX2 und β -Catenin im KRK zu verstehen, wurde zudem die Co-Expression dieser Marker untersucht. Interessanterweise wurde dadurch eine genauere Zuordnung der Tumoren zu ihrem jeweiligen Stadium möglich, was den prognostischen Wert verbesserte (Otranto, 2012). Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass sich die besten Ergebnisse durch die Untersuchung von Co-Expressionen erzielen lassen.

Überträgt man diese Erkenntnisse auf das KSSK System, so bietet es sich an, die Co-Expression jeweils eines möglichst spezifischen KSZ- und eines Stroma-Markers zu untersuchen. Als KSZ-Marker würde sich besonders gut nukleäres β -Catenin eignen, da es ein sehr zuverlässiger Marker für „cancer stemness“ in kolorektalen Tumoren ist. Erwartungsgemäß ist β -Catenin mit Tumorprogression und schlechter Prognose im KRK assoziiert (Wong, 2004; Brabietz, 2005; Neumann, 2011) und würde sich somit als einer von zwei Markern in einer erneuten Untersuchung eignen. Ein Marker für das Stroma könnte beispielsweise α -smooth muscle actin (α -SMA) sein, welches von Myofibroblasten produziert wird. Myofibroblasten können durch verschiedene Zellen des *Microenvironments* aktiviert werden und zur Produktion von α -SMA angeregt werden. Dies geschieht, wenn die normale Gewebshomöostase, etwa durch eine Entzündung oder durch einen tumorösen Prozess, gestört wird und vermehrt ECM benötigt wird. In intaktem Gewebe werden die Zellen des Microenvironments durch die extrazelluläre Matrix (ECM) vor derartigen Stressfaktoren geschützt. Eine graduelle Vermehrung von ECM, beispielsweise im Falle einer chronischen Entzündung oder bei Auftreten eines Tumors, erhöht die Steifigkeit des Gewebes und es bilden sich kontraktile Mikrofilamentbündel aus Aktin. Dadurch werden weitere Wachstumsfaktoren aktiviert, die in Verbindung mit der steifen ECM erneut Myofibroblasten

zur Produktion von α -SMA anregen, was wiederum zu einer Veränderung der ECM führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die dadurch erzeugte veränderte Umgebung Zelltransformation, Invasion und Tumorwachstum unterstützen. Stroma, in dem α -SMA nachgewiesen werden kann, gilt als „aktiviertes“ Stroma und wird als Marker für Malignität verwendet (Neumann, 2011). Zudem wird in aktiviertem Stroma die Synthese spezieller ECM-Faktoren, wie beispielsweise Laminin-5 γ 2 (Hlubek, 2004) oder Tenascin C (Beiter, 2005), induziert, die beide als Induktoren für EMT, Migration und Invasion gelten. Interessanterweise sind beide Faktoren β -Catenin Zielgene (Hlubek, 2004; Beiter, 2005), was erneut die komplexe Interaktion zwischen Tumorzellen und dem *Microenvironment* zeigt. Laminin-5 γ 2 und Tenascin C lassen sich in Tumoren im Bereich mit der höchsten EMT-Aktivität nachweisen – also im KRK an der *pushing border*-Invasionsfront, wo sie Zellmigration und -invasion fördern.

Interessant können auch Entzündungsmarker sein. Denn Entzündung ist eines der zehn *Hallmarks of Cancer*. Seine Rolle in der Tumorinitiation konnte mehrfach nachgewiesen werden (Hanahan and Weinberg, 2011; Schwitalla, 2013). So erhöhen beispielsweise chronische Entzündungsreaktionen deutlich das Risiko, an Krebs zu erkranken (Grivennikov et al, 2010). Zudem findet die Entzündung lokal im Stroma statt, wodurch dieses Kompartiment durch einen Marker für Entzündung mit abgebildet werden könnte. Ein solcher Marker wäre beispielsweise der bereits erwähnte Entzündungsmediator NF- κ B, der in differenzierten Tumorzellen Dedifferenzierung hervorrufen kann und als eine der Schlüsselverbindungen zwischen Entzündung und Krebs gilt (Greten 2004; Schwitalla, 2013). Somit könnte die nukleäre NF- κ B-Expression ein anderer oder neben α -SMA ein weiterer geeigneter Marker zusammen mit β -Catenin sein, um das KSSK zu untersuchen. Auf diese Weise könnte es gelingen, qualitativ hochwertigere prognostische Aussagen zu treffen.

Denn es bleibt weiterhin von großem klinischem Interesse, Patienten möglichst vor Tumorzellstreuung identifizieren zu können, um diesen Hoch-Risiko-Patienten eine entsprechend rigide Therapie zukommen zu lassen und den Prozess der Fernmetastasierung frühzeitig unterbinden zu können.

5. Zusammenfassung

Die lymphogene Metastasierung gilt als eine der wichtigsten prognostischen Faktoren des kolorektalen Karzinoms, da es ein Parameter für Fernmetastasierung und somit für die Prognose und damit das Gesamtüberleben (OS, *overall survival*) von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (KRK) darstellt. Daher ist es von großem klinischem Interesse, Patienten mit einem Risiko für Fernmetastasierung bereits vor einer weiteren Fernmetastasierung anhand von spezifischen Markern identifizieren zu können.

Aufgrund experimenteller Erkenntnisse ist bekannt, dass Tumorinitiation und Metastasierung von einer lediglich kleinen Anzahl von Tumorzellen, den Krebsstammzellen (KSZ), abhängen. Diese befinden sich bei kolorektalen Karzinomen (KRK) hauptsächlich an der *Pushing Border* (PB), der Invasionsfront. Erwartungsgemäß korreliert das Auftreten einer hohen Anzahl kolorektaler KSZ (kKSZ) an der Invasionsfront mit schlechtem Überleben, also einer schlechten Prognose. kKSZ sind dabei eine ausgesprochen plastische Zellpopulation, denn sie können einerseits in alle differenzierten Typen von Tumorzellen differenzieren, andererseits können aber auch aus ausdifferenzierten Tumorzellen kKSZ induziert werden. Für die Transdifferenzierung in kKSZ wurden Faktoren des Tumorstromas identifiziert, was bedeutet, dass dem Tumorstroma oder *Microenvironment* eine wichtige regulatorische Rolle in der Regulation der Tumorprogression zukommt.

Somit sollte neben den KSZ auch das *Microenvironment* von prognostischem Wert sein, was zu der in dieser Arbeit untersuchten Hypothese führte, den gesamten Krebsstammzell-Stroma-Komplex (KSSK) zu untersuchen, um seine Ausprägung mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen als Prognosefaktor für Fernmetastasierung zu korrelieren.

Da in KRK die KSZ insbesondere an der PB-Invasionsfront gefunden werden, wurde ein besonderes Augenmerk auf den KSSK in diesem Kompartiment gelegt. Dazu wurde ein Kollektiv von 81 Patienten mit mäßig differenzierten (G2) KRK des Stadiums II/III erstellt, die sich nur hinsichtlich des Lymphknotenstatus voneinander unterschieden (T3N0M0 G2 vs. T3N1/2M0 G2). Anschließend wurden die histologische Schnitte dieser KRK jeweils immunhistologisch mit spezifischen Antikörpern für die beiden Marker CD44 und CD166 gefärbt. Diese beiden Marker wurden deshalb gewählt, weil sie sowohl auf KSZ als auch auf Zellen des die KSZ umgebenden Stromas - also dem *Microenvironment* – exprimiert werden, und es so ermöglichen, den gesamten KSSK untersuchen zu können. Dazu wurde die Spezifität jedes der beiden Marker getestet. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte anhand einer spezifisch erarbeiteten Auswertungsregel auf der Basis eines Färbeindexes. Die gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend mit dem Lymphknotenstatus korreliert.

Überraschenderweise zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Expression der KSSK-Marker CD44 bzw. CD166 und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen an der PB-Invasionsfront im KRK. Beide Marker eignen sich also nicht für den Einsatz als

Prognoseparameter im klinischen Alltag. Da jedoch weiterhin die Annahme bestehen bleibt, dass kKSZ und deren *Microenvironment* ein hoher prognostischer Wert zukommt, sollten andere geeignetere Marker in zukünftige Untersuchungen eingesetzt werden. Nach neuesten Erkenntnissen empfiehlt sich der parallele Einsatz mehrerer Marker. Auf das KSSK übertragen, würde es sich anbieten, gleichzeitig die Stromakomponente und KSZ zu analysieren und die Stromakomponente um Marker der Entzündung, wie NF-κB zu ergänzen.

6. Literaturverzeichnis

Altman DG (1991) Practical statistics for medical research. London, Chapman and Hall

Ausubel FM et al. (1989) Protocols in Molecular Biology, Greene and Wiley-Interscience, New York

Barker N, Ridgway RA, van Es JH (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*, 457: 608-6011

Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H (2012) Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell*, 11(4): 452-460

Beiter K, Hiendlmeyer E, Brabertz T, Hlubek F, Haynl A, Knoll C, Kirchner T, Jung A (2005) beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene*, 24(55): 8200-8204

Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC (2013) CD44 Staining of Cancer Stem-Like Cells Is Influenced by Down-Regulation of CD44 Variant Isoforms and Up-Regulation of the Standard CD44 Isoform in the Population of Cells That Have Undergone Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 8(2): 57314

Biernz M, Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103(2): 311-320

Birchmeier C et al. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(12): 915-925

Borland G, Ross JA, Guy K (1998) Forms and Functions of CD44. *Immunology*, 93: 139-148

Brabertz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Migrating Cancer Stem Cells - an Integrated Concept of Malignant Tumour Progression. *Nat Rev Cancer*, 5: 744-749

Brabertz T (2012) To differentiate or not - routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer*, 12: 425-436

Braig M, Brümmendorf TH (2009) Tumorstammzellen bei CML-Resistenzen und Therapieansätze, Onkologisch. Springer Medizin Verlag, Heidelberg: 6-8

Brembeck FH et al. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*, 18(18): 2225-2230

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP (1998) Mesenchymal Stem Cell Surface Antigen SB- 10 Corresponds to Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Is Involved in Osteogenetic Differentiation. *Journal Of Bone And Mineral Research*, 13: 655- 663

Bruns CJ et al. (2010) Manual Gastrointestinale Tumoren. Kolonkarzinom. Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München: 139-211

Cohen J (1969) Statistical power analysis for the behavioral sciences. New York, Academic Press

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells. *PNAS*, 104: 10158-10163

De Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6: 24-37

Dieter SM et al. (2011) Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell*, 9(4): 357-365

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin J, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q (2008) CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin Cancer Res*, 14: 6751- 6760

Esser MA, Offner S, Blanco-Bose WE, Waibler Z, Ulrich K, Duchosal MA, Trumpp A (2009) IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458: 904- 908

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767

Fodde R, Brabletz T (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant Behavior. *Curr Opin Cell Biol*, 19: 150–158

Grady WM, Markowitz SD (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3: 101-28

Gregorieff A, Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Dev*, 19: 877-890

- Greten FR, Karin M** (2004) The IKK/NF- κ B activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*, 206(2): 193-199
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M** (2010) Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 140: 883-899
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA** (2011) Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674
- Herold G et al.** (2007) Innere Medizin. Gerd Herold, Köln: 440-442
- Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T** (2004) β -Catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 γ 2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *International Journal of Cancer*, 108(2): 321-326
- Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A** (2009) Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest*, 27(8): 844-850
- Huff CA, Matsui WH, Douglas SB, Jones RJ** (2006) Strategies to Eliminate Cancer Stem Cells: Clinical Implications. *European Journal of Cancer*, 42: 1293-1297
- Ikushima H, Miyazono K** (2010) TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat rev Cancer*, 10: 415-424
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M** (2006) Cancer Stem Cells. *N Engl J Med*, 355: 1253-1261
- Joyce JA, Pollard JW** (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9(4): 239-252
- Kajiwara Y, Ueno H, Hashiguchi Y, Shinto E, Shimazaki H, Mochizuki H, Hase K** (2011) Expression of I1 cell adhesion molecule and morphologic features at the invasive front of colorectal cancer. *J Clin Pathol*, 136(1): 138-144
- Klein CA** (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Rev Cancer*, 9: 302-312

Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Los M (2008) Cancer Stem Cell Markers in Common Cancers – Therapeutic Implications. *Trends in Molecular Medicine*, 14: 450-460

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Münschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistrici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P (2004) A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *J Exp Med*, 200: 123-135

Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835): 375-379.

Lou H, Dean M (2007) Targeted Therapy for Cancer Stem Cells: The Patched Pathway and ABC Transporters. *Oncogene*, 26: 1357–1360

Mani SA et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4): 704-715

Martin-Rendon E, Watt SM (2003) Stem cell plasticity. *Br. J. Haematol*, 122: 877- 891

McCawley LJ, Matrisian LM (2001) Matrix Metalloproteinases: They're not just for Matrix Anymore!. *Curr Op Cell*, 13: 534- 540

Medema JP, Vermeulen L (2011) Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351):318–26

Mineault M, Batra SK (2006) Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells*, 24: 2319- 2345

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden J, Bray R, Waller E, Buck D (1997) A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning. *Blood*, 90: 5013- 5021

Moran A, Ortega P, De Juan C (2010) Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*, 2(3): 152-158

Müller M et al. (2008/09) Chirurgie für Studium und Praxis, Kolon und Rektum, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach: 182-195

Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Mejias-Luque R, Gerhard M, Kirchner T, Jung A (2011) SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer*, 11: 518

O'Brien CA et al. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123): 106-110

O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY (2004) Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1420-1425

Otranto M, Sarrazy V, Bonte F, Hinz B, Gabbiani G, Desmouliere A (2012) The role of the myofibroblast in tumor stroma remodelling. *Cell Adhesion & Migration*, 6(3): 203-219

Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Applying the Principle of Stem-Cell Biology to Cancer. *Nat Rev Canc*, 3: 895-902

Patel BB, Yu Y, Du J, Levi E, Phillip PA, Majumdar APN (2009) Age-related Increase in Colorectal Cancer Stem Cells in Macroscopically Normal Mucosa of Patients with Adenomas: A Risk Factor for Colon Cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 378: 344–347

Pollard TD, Earnshaw WC (2002) Cellular adhesion, Cell biology, W.B. Saunders Co., Philadelphia: 507–24

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA (2003) CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4: 33-45

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007) Identification and Expansion of Human Colon- Cancer- Initiating Cells. *Nature*, 44: 111- 115

Ricci-Vitiani L, Pagliuca A, Palio E, Zeuner A, De Maria R (2008) Colon Cancer Stem Cells. *Gut*, 57: 538- 548

Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin: 13-34

Schalhorn A et al. (2006) Kolonkarzinom, Manual Gastrointestinale Tumoren. Tumorzentrum München, W. Zuckschwerdt Verlag, München: 117-160

Schmiegel W et al. (2008) S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“-Aktualisierung 2008. *Gastroenterol*, 46: 799-840

- Schwendt G et al.** (2007) Taschenatlas der Analytik. Wiley –VCH Verlag, Weinheim: 45- 50
- Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P** (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, 152(1-2): 25-38
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE** (2006) Generation of a Functional Mammary Gland from a Single Stem Cell. *Nature*, 439: 84-88
- Smith HA, Kang Y** (2013) The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med*, 91: 411-429
- Skobe, M, Fusening, N.E** (1998) Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4562-1055
- Statistisches Bundesamt** (2007) Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4, Wiesbaden: 6
- Swart GWM et al.** (2002) Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (CD166/ALCAM): Developmental and Mechanistic Aspects of Cell Clustering and Cell Migration. *Eur J Cell Biol*, 81: 313-321
- Tereda N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW** (2002) Bone Marrow Cells Adopt the Phenotype of Other Cells by Spontaneous Cell Fusion. *Nature*, 416: 542-545
- Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G** (2007) Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1: 389-402
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C** (1991) The ras protein family: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, 30: 4637-4648
- Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ, Stassi G, Medema JP** (2008) Single-Cell Cloning of Colon Cancer Stem Cells Reveals a Multi-Lineage Differentiation Capacity. *PNAS*, 105: 13427- 13432
- Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K,**

Richel DJ, Stassi G, Medema JP (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 12(5): 468-476

Wang, X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2002) Cell Fusion is the Principal Source of Bone-Marrow-Derived Hepatocytes. *Nature*, 422: 897- 901

Weber G, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 271: 509- 512

Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G (2004) ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol*, 57: 1160-1164

Wielenga VJ, Heider KH, Johan G, Offerhaus A, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST (1993) Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression. *Cancer Res*, 53: 4754- 4756

Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F (2002) UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 1-18

Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chang JK, Hsiao WL (2004) Prognostic and diagnostic significance of beta catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 20(4):1401-1408

Zech N et al (2004) Adult Stem Cell Manipulation and Possible Clinical Perspectives. *J. Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 1: 91-99

7. Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	α-Smooth muscle actin
Abb.	Abbildung
ACF	Aberrant Crypt Foci, verdickte irreguläre Krypten der Kolonschleimhaut
AGO	Arbeitsgemeinschaft gastrointestinaler Onkologie
AK	Antikörper
ALCAM	Activated leukocyte Cell Adhesion Molecule
AP-1	Activation protein 1
APC	Adenomatous polyposis coli, Protein der Wnt-Signalkaskade
AS	Aminosäure
Bcl-X _L	B-Cell Lymphoma long form, antiapoptotisches Protein
CD	Cluster of Differentiation
cFLIP	Zelluläre FLICE inhibierende Proteine
CSC	Cancer Stem Cell
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma
EMT	Epithelial-mesenchymal Transition
EGFR	Epidermal growth factor
EpCAM	Epitheliales Cell Adhäsions Molekül
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet
G	Grading
GADD45	Gene associated with DNA damage
H ₂ O ₂	Wasseroxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horse Radish Peroxidase
ID	Identification
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
k-RAS	Kristen Rat Sarcoma
KRK	Kolorektales Karzinom
KSSK	Krebsstammzell-Stroma-Komplex
(k)KSZ	(kolorektale) Krebsstammzelle
LK	Lymphknoten
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
LRG 5	Leucine rich repeat containing G-Protein coupled Receptor 5
MW	Molecular Weight, Molekulargewicht
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OS	Overall Survival
p	Power
p53	Tumorsuppressorprotein 53
PB	Pushing Border
PED	Phosphoprotein Enriched in Diabetes
PUMS	p53 upregulated mediator of apoptosis
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smad-4	Small body size-Protein, mother against decapentaplegic
SPSS	Statistical package for the Social Sciences
SSC	Sodium Chloride Sodium Citrate Puffer

SZ	Stammzelle
Tab.	Tabelle
TGF β (RII)	Transforming Growth Factor- β (Rezeptor II)
TNM	Tumor-Nodulus-Metastase, Stadieneinteilung von malignen Tumoren
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZM	Tumor Zentrum München
UICC	Union international contre le cancer
Wnt	Wingless Int-1, Sekretierter Ligand und Protein der Wnt-Signalkaskade
δ	Effektgröße

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verteilung der Krebssterbefälle nach Organen	3
Abbildung 2	Das Adenom-Karzinom Modell zur Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms, vereinfachte Version nach Fearon und Vogelstein	7
Abbildung 3	<i>The Hallmarks of Cancer</i>	8
Abbildung 4	Tumoren sind komplexe Agglomerate aus Tumorzellen und Tumorstroma	9
Abbildung 5	KSZ gehen aus SZ hervor	11
Abbildung 6	Darstellung der Dynamik des KSSK im KRK	12
Abbildung 7	Darstellung der CD44-Standard-Exons und deren Varianten	14
Abbildung 8	Der Verlust der Domäne 1-2 (ΔN -ALCAM) verhindert eine ALCAM-ALCAM Interaktion	15
Abbildung 9	Anti-CD44 und Anti-CD166 Antikörper binden spezifisch ihr jeweiliges Antigen	23
Abbildung 10	Die Kollektivgröße lieferte bei einem zweiseitigen Test und angenommenen Fehlern von $\alpha=5\%$ und $\beta=10\%$ (Power=1- $\beta=90\%$) eine Effektgröße von 0,73	25
Abbildung 11	Unterschied in der Färbeintensität der histologischen Schnitte	26
Abbildung 12	Darstellung eines vergleichbaren Tumoreals mit IHC-Färbung von CD44 bzw. CD166 zum Vergleich der Färbungsmuster und Intensität	27
Abbildung 13	Darstellung zur Auswertung der histologischen Schnitte nach erfolgter immunhistologischer Färbung der KSSK-Marker CD44 und CD166	28
Abbildung 14	Positive und negative Färbung der PB Invasionsfront im KRK anhand von immunhistologischer Färbung des KSSK	32
Abbildung 15	Darstellung der Expression der KSSK-Marker CD44 und CD166 in der PB-Invasionsfront nach immunhistologischer Färbung	33

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation	4
Tabelle 2	UICC Stadieneinteilung für das KRK und assoziierte Sterberate	5
Tabelle 3	Verdünnung des Zellysts CD166	18
Tabelle 4	Verdünnung der Zellysts aus verschiedenen kolorektalen Zelllinien für CD44	18
Tabelle 5	Primärantikörper-Verdünnung von CD166 und CD44	19
Tabelle 6	Reagenzien	19
Tabelle 7	Produktinformationen der verwendeten Antikörper	20
Tabelle 8	In der Arbeit verwendete Lösungen zur immunhistochemischen Färbung mittels Benchmark XT	20
Tabelle 9	Bewertung des κ -Koeffizienten	22
Tabelle 10	Klinisch-pathologische Charakterisierung des Kollektivs	24
Tabelle 11	Bestimmung der Effektgröße mit Hilfe des Programms GPower 3.0.	25
Tabelle 12	Zusammenhang zwischen Färbeindex und dem Prozentsatz der Färbung von Tumorgewebe und gesundem Gewebe nach immunhistochemischer Färbung	28
Tabelle 13	Expression der Marker CD44 und CD166 korreliert nicht mit Alter der Patienten	30
Tabelle 14	Erstellter Färbeindex zur mikroskopischen Auswertung der PB-Invasionsfront	31
Tabelle 15	Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit	34
Tabelle 16	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	35