

**Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Metastasierung beim rechtsseitigen Kolonkarzinom
korreliert mit der Expression von SOX2**

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

vorgelegt von Fiorina McLeod, geb. Bahr
aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Jung

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Ochsenkühn

PD Dr. Axel Kleespies

Prof. Dr. Bruno Märkl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2018

Meinen Großeltern
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Epidemiologie von Krebs in Deutschland.....	5
1.2	Epidemiologie des Kolonkarzinom.....	6
1.3	Karzinogenese kolorektaler Karzinome.....	10
1.3.1	Histomorphologie der Adenom-Karzinom-Sequenz.....	10
1.3.2	Die molekulare Sequenz.....	10
1.3.3	Der kanonische Wingless pathway und β -Catenin.....	12
	Die adulte Stammzelle.....	15
	Bedeutung der Stammzelle – als Ursprung der Tumorenstehung.....	15
1.4	Tumorheterogenität.....	16
1.4.1	Das Tumorstammzellkonzept- Migrating Cancer Stem Cell Concept MCS.....	16
	Die embryonale Stammzelle.....	18
	Die Tumorstammzelle.....	18
	Der Tumorstammzellmarker <i>SOX2</i>	19
1.5	<i>SOX2</i>	19
1.5.1	Lokalisation.....	19
1.5.2	Vorkommen.....	20
1.5.3	Aufgaben.....	20
1.6	Interaktion <i>SOX2</i> mit β -Catenin.....	20
1.7	Ziele des Projektes/Hypothesen.....	21
2	Material & Methoden.....	21
2.1	Immunhistochemie/ Färbung der Schnitte.....	21
2.1.1	Die Färbung der Schnitte mit <i>SOX2</i>	21
2.1.2	Die Färbung der Schnitte mit β -Catenin spezifischen Antikörpern.....	23
2.2	Statistik.....	23
3	Ergebnisse.....	23
3.1	Das Kollektiv.....	24
3.2	Die Auswertungskriterien.....	25
3.2.1	Die Auswertungskriterien für <i>SOX2</i>	25
3.2.2	Die Auswertungskriterien der immunhistochemischen β -Catenin spezifischen Färbungen.....	27
3.2.3	<i>SOX2</i> und β -Catenin Expression im Kollektiv.....	28
3.2.4	Darstellung von <i>SOX2</i> und β -Catenin-Expression in ihrer Korrelation zueinander ..	35
3.3	Ergebnisse tabellarisch in der Gesamtübersicht.....	37
4	Diskussion.....	39
5	Konklusion.....	41
6	ABSTRACT.....	42
7	Zusammenfassung.....	43
8	Anhang.....	46
9	Literaturverzeichnis.....	48

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Krebs in Deutschland

Krebs steht nach den kardio-vaskulären Erkrankungen (40%) an zweiter Stelle der Todesursachen (25%). Insgesamt starben 221 611 Menschen im Jahr 2012 an Krebs (Abb.1.1a). [1,2] Im Zeitrahmen von 2000 bis 2012 nahm die Zahl der Todesfälle bei Krebserkrankungen im Vergleich zu den kardio-vaskulären Erkrankungen langsamer ab (2011 Krebs 26%; kardio-vaskulär -23%). Bei Frauen sank die Krebssterblichkeitsrate (altersstandardisiert) um 11% und bei Männern um 17%. Die absolute Sterberate an Krebs stieg bei Männern um 8% an, wobei die von Frauen konstant blieb. Dies ist auf die steigende Anzahl von Neuerkrankungen (Frauen 14%, Männer 21%) bedingt durch den demographischen Wandel der Bevölkerung zurückzuführen. [2,3]

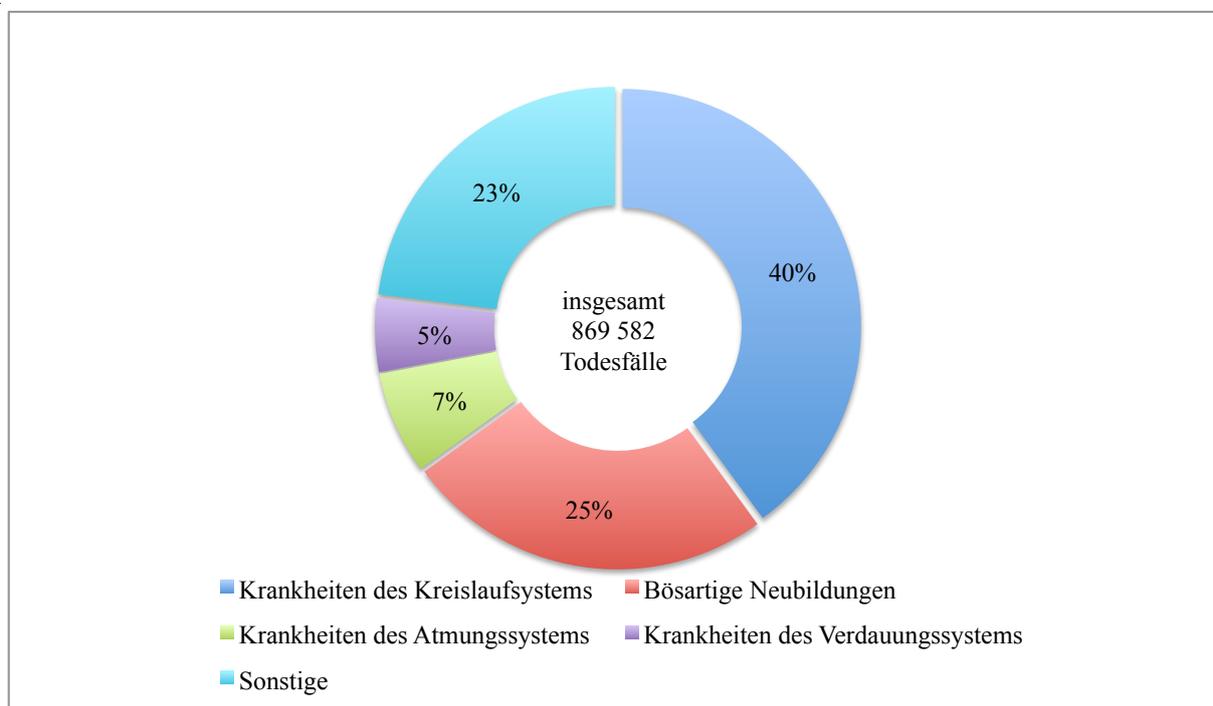


Abb.1.1a: Ursachen für Versterben in Deutschland 2012, Quelle: statistisches Bundesamt [1]

Insgesamt stieg die Rate an Krebsneuerkrankungen von 1980 bis heute (Tab. 1.1A).

Die Krebs-Neuerkrankungen im Jahr 2009 betragen bei Frauen 228 500 und bei Männern 253 100. Bis ins Jahr 2014 wird eine Zunahme der Neuerkrankten bei Frauen auf 236 200 und bei Männern auf 264 700 Neuerkrankungen erwartet (Tab. 1.1A). [3]

	2009		2010		Prognose für 2014	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	253.100	228.500	252.400	224.900	264.700	236.200
rohe Erkrankungsrate ¹	630,6	547,3	629,4	539,9	666,5	573,3
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	453,2	357,4	445,0	349,1	436,8	356,2
mittleres Erkrankungsalter ³	69	69	69	69		
Sterbefälle	116.381	99.152	117.855	100.403		
rohe Sterberate ¹	290,0	237,5	293,9	241,0		
standardisierte Sterberate ^{1,2}	201,4	128,6	198,7	127,9		
5-Jahres-Prävalenz	759.500	743.200	770.000	753.200		
absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴			52 (45-56)	59 (55-63)		
relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴			61 (54-66)	67 (62-71)		

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Tabelle 1.1A: Epidemiologische Maßzahlen bei Krebserkrankung aus dem deutschen Krebsregister 2013 [3]

Das Risiko einer Frau an Krebs zu erkranken, ist von 38% auf 43% und für einen Mann von 47% auf 51% im Jahr 2013 gestiegen. [3,4,5] Im Mittel sind 41,6% der an Krebs Erkrankten zwischen 45 bis 65 Jahre alt und ca. ein Viertel (23%) der unter 65 Jahre alten Patienten kommen durch Krebs zu Tode. [1,4,5] Primäre- und sekundäre Präventionen, um die Rate an Krebserkrankungen zu senken, sind leider immer noch unzureichend.

1.2 Epidemiologie des Kolonkarzinom

Darmkrebs (kolorektales Karzinom) nimmt in der Statistik der Krebs verursachten Todesfälle eine zentrale Rolle ein. Denn in der „westlichen Welt“ (Industriestaaten) also auch in Deutschland, ist Darmkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Todesursache bei Frauen und die zweithäufigste Todesursache und dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern. [3,4] Insgesamt erkrankten weltweit ca. 1,4 Millionen Menschen an kolorektalen Karzinomen. [6,7]

In Europa, Nordamerika, Australien, Neuseeland und Japan bestehen die höchsten Erkrankungsraten für Kolonkarzinome von ca. > 28,2 pro 100 000 unabhängig vom Geschlecht (Abb.1.2a). [7,8]

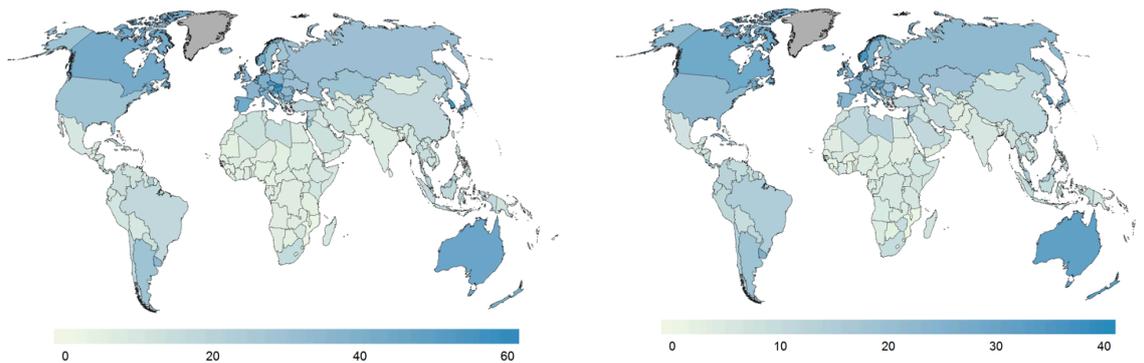


Abb. 1.2a: Internationale altersstandardisierte Erkrankungsrate für Kolonkrebs für Männer links und rechts für Frauen (Globocan 2012) [7]

In den Industriestaaten (More Developed Regions, WHO, Globocan 2012 [7]) erkrankten im Jahr 2012 insgesamt 3 244 000 Männer und 2 832 000 Frauen an Krebs, davon 398 903 Männer und 337 964 Frauen an kolorektalem Karzinom (55% der Gesamtinzidenz). In den Entwicklungsländern (Less Developed Regions, WHO, Globocan 2012 [7]) wiesen 347 395 Männer und 276 340 Frauen ein kolorektales Karzinom auf (45% der Gesamtinzidenz). [7] Im Verlauf vom Entwicklungsland zu Schwellenländern und weiter zu Industriestaaten kann man deutlich verfolgen, dass die Anzahl an kolorektalen Karzinomen zunimmt. In Schwellenländern liegt die Erkrankungsrate an vierter bis fünfter Stelle in Industriestaaten an zweiter bis dritter Stelle. [7,8] Leider kann man anhand der Entwicklung davon ausgehen, dass in Zukunft immer mehr Menschen an kolorektalen Karzinomen erkranken. Generell haben 13% der an Krebs Erkrankten in Deutschland ein Kolonkarzinom. In Deutschland erkrankten nach Krebsregisterprognose 2014 etwa 35.500 Männer und 28.400 Frauen an Dickdarmkrebs. [3] Die Inzidenzrate von Darmkrebs steht bei den deutschen Frauen mit 12,7% mittlerweile schon an zweiter Stelle nach dem Mammakarzinom mit 31,3% und an dritter Stelle der Lungenkrebs mit 7,6% (Abb.1.2c).

Die Inzidenzrate von Darmkrebs bei einem deutschen Mann beträgt 13,4% und steht an dritter Stelle. Prostatakrebs liegt mit 26,1% an erster Stelle gefolgt von Lungenkrebs mit 13,9% (Abb.1.2b).

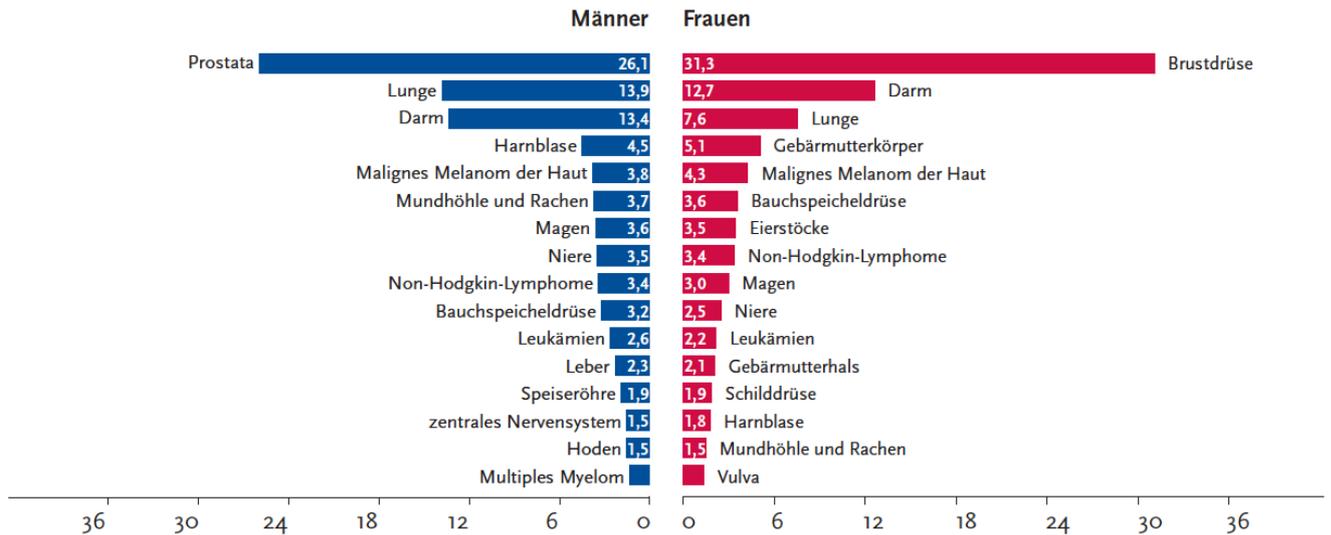


Abbildung 1.2b: prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation von Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 [3]

In Deutschland ist bei Frauen die häufigste tödlich verlaufende Krebserkrankung mit ca. 17,4% Brustkrebs, die zweithäufigste mit 13,6% Lungenkrebs und die dritthäufigste mit 12,5% Darmkrebs (Abb.1.2c).

Bei Männern ist die häufigste tödlich endende Krebserkrankung mit ca. 24,9% der Lungenkrebs, gefolgt von Darmkrebs (11,4%) und Prostatakrebs (10,8%) (Abb.1.2c). [3]

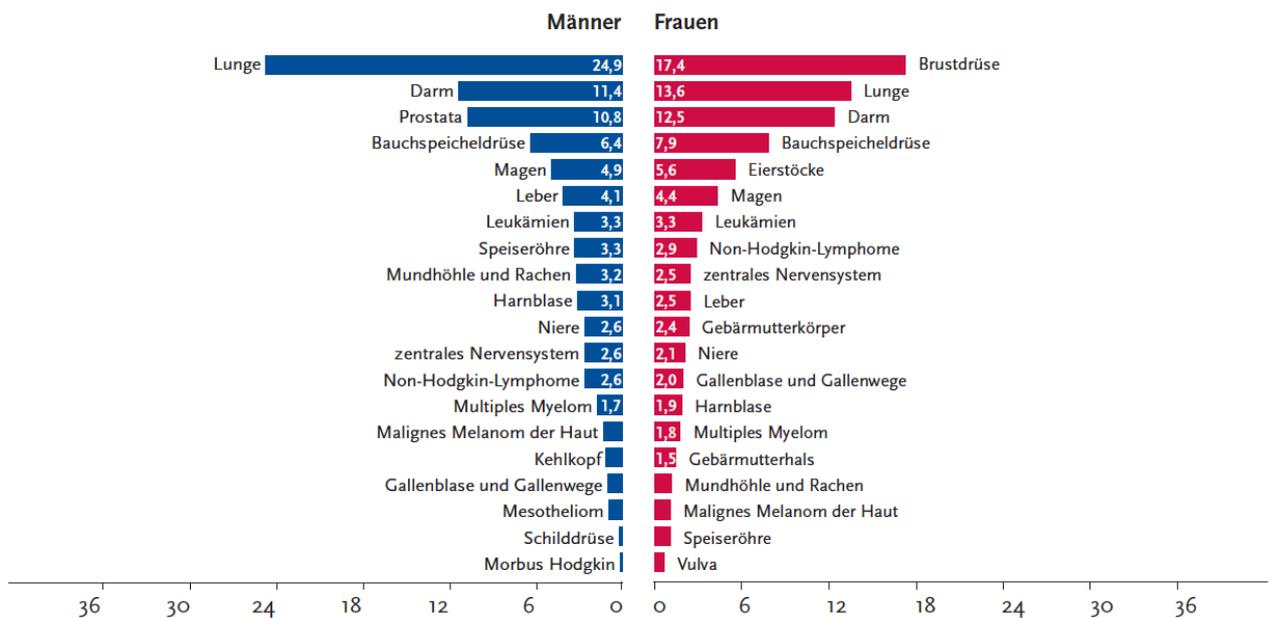


Abb. 1.2c: prozentuale Verteilung der Tumorlokalisation von Krebssterbefälle in Deutschland 2010 [3]

Anhand von Studien wird deutlich, dass die ansteigende Inzidenz an kolorektalen Karzinomen weltweit auf eine Zunahme der für Darmkrebs aber auch Krebs bedingenden Risikofaktoren zurückzuführen ist. [3,4,5,7,8] Diese Risikofaktoren, auch als Western Lifestyle bezeichnet, setzen sich unter anderem aus einer zu hohen Kalorienzufuhr, einer ballaststoffarmen, fettreichen Ernährung und geringer sportlicher Betätigung zusammen. [3,4,5,7,8,9]

Die Inzidenz des Kolonkarzinoms in Deutschland zwischen 1980 bis 2006 stieg bei Männern auf ca. 34% und bei Frauen auf ca. 26%, wahrscheinlich auf Grund des oben genannten Western Lifestyle und des demographischen Wandels. Der Höhepunkt der Inzidenz wurde im Jahr 2008 erreicht: Männer 35 000, Frauen 30 000. Erfreulicherweise ist laut der aktuellen Statistik des Zentrums für Krebsregisterdaten (9. Auflage 2013 [3]) für das Jahr 2010 eine leichte Regression bei Männern auf 33 800 und bei Frauen auf 28 630 zu verzeichnen. Zudem sinkt die Mortalität für Kolonkarzinome seit dem Beginn der 80er Jahre wegen steigender Präventionsmaßnahmen und verbesserter Therapie allerdings nur leicht.

Wenn man die Werte der 5-Jahres-Überlebensrate von 1980 bei 50% und 2010 mit ca. 65% vergleicht besteht keine deutlichere Verbesserung beim Überleben, obwohl Präventionsmaßnahmen (bezahlt durch Krankenkassen seit 2002) eingeführt wurden und eine S3 Leitlinie zur Therapie des kolorektalen Karzinoms (seit 1999) besteht. Unter anderem beinhaltet die S3 Leitlinie auch die Richtlinien der Tumorklassifizierung nach den TNM-Kriterien der Union International Contre le Cancer (UICC), nach welcher der Primärtumor nach der Tiefe der Infiltration in Gewebsschichten eingeteilt wird und ebenfalls Lymphknoten- und Fernmetastasen berücksichtigt (Anhang Tab. 1.2A/B/C/D). Die TNM-Klassifizierung versucht dabei die Tumorentwicklung auf der Basis des biologischen Verlaufs darzustellen, die mit den Schritten der molekularen Mechanismen der Transformation normaler Zelle erklärbar ist. [3,4,5,7,9]

Warum zeigt sich in 30 Jahren keine deutlichere Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate?
Woran könnte es liegen, dass durch Therapien keine bessere Überlebenschancen bestehen?
Muss man einen individuelleren gerichteten Angriffspunkt finden?

Zum Verständnis dieser Zusammenhänge ist es wichtig die histomorphologischen und molekularen Grundlagen zu verstehen.

1.3 Karzinogenese kolorektaler Karzinome

1.3.1 Histomorphologie der Adenom-Karzinom-Sequenz

Zum besseren Verständnis des Karzinoms wird zunächst die normale Schleimhaut des Dickdarms betrachtet. Die Zellerneuerung der normalen Dickdarmschleimhaut findet im basalen Teil der Krypten statt. In diesen basalen Krypten werden aus adulten Stammzellen Vorläuferzellen gebildet, die sich zunächst teilen, um dann zu differenzieren und dabei weiter in der Krypte nach oben wandern. [10,11,35,36] Das Risiko der Zellentartung durch chemische Noxen, Mutagene oder Onkogene ist in Verbindung mit Risikofaktoren (ballaststoffarme, fetthaltige Ernährung, Alkoholkonsum, Nikotinabusus, keine körperliche Betätigung etc.) hoch, was sich deutlich aus dem Vergleich der Inzidenzen von Kolonkarzinomen in der Bevölkerung von Entwicklungsländern und Industriestaaten ableiten lässt. [3,4,8,9]

Aus einer Läsion (Inflammation, Verletzung, Hypoxie, Strahlung, chemische Noxen etc.) der Darmschleimhaut entsteht durch dysplastisches Wachstum eine zunächst gutartige Wucherung, welche man als Adenom bezeichnet. Adenome werden nach ihren histologischen Wachstumsmustern in tubuläre (50-72%), villöse (5,5-15%) oder in tubulär-villöse (22-30%) Adenome unterteilt. Adenome haben zum Teil ein sehr hohes Risiko zu entarten, deshalb kann man auch von einer Präkanzerose sprechen. [9,12,13] Denn in histologischen Untersuchungen konnte man bei 96% der Kolonkarzinome nachweisen, dass diese ursprünglich aus Adenomen entstanden sind. [12,13]

Die *Adenom-Karzinom-Sequenz* beschreibt die Entstehung des Kolonkarzinoms aus Adenomen. Auf Grund des langsamen Wachstums kann man die Entwicklung von der Dysplasie in ein Adenom und die Weiterentwicklung vom Adenom ins Karzinom verfolgen. Die Entwicklung eines Adenoms bei einem Menschen liegt bei einer Wahrscheinlichkeit von 33% bis 50%. Es dauert ungefähr 10-15 Jahre, bis aus einem Adenom ein Kolonkarzinom entsteht. [12,13] Diese hochinteressante langsame Entwicklung konnte in ihren einzelnen Progressionsstufen sowohl histologisch als auch auf molekularer Ebene dargestellt werden und ist essentiell für das Verständnis der Tumorenstehung und Metastasierung.

1.3.2 Die molekulare Sequenz

Besonders interessant ist, dass sich der histomorphologischen Sequenz auf der molekularen Ebene einzelne Schritte oder Mutationen in Onkogenen (*gain of function*) oder

Tumorsuppressorgenen (*loss of function*) zuordnen lassen, sodass sich die kolorektale Karzinogenese einem genetischen Progressionsmodell zugeordnet lässt.

Die Entstehung kolorektaler Karzinome erfolgt durch eine Reihe von Mutationen, welche zur Aktivierung von Onkogenen (MYC, KRAS, BRAF) und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (APC, p16, p53, DCC) führt. Die Sequenz aufeinanderfolgender Mutationen wird als Multistep Carcinogenesis Modell des Dickdarmkarzinoms nach *Vogelstein et al.* bezeichnet. (Abb. 1.3.2a) [12,14,15,19]

Das Multistep Carcinogenesis Modell beginnt zu ca. 60-80% mit der Mutation des APC-Gens (Adenomatous polyposis coli, Gatekeeper). [14,19] Das APC-Gen wurde dabei durch Studien an Patienten mit der Erbkrankheit familiäre Polyposis Coli (FAP) ,einem autosomal-dominanten Gendefekt auf dem Chromosom 5q21, der Lokalisation des APC-Gens, entdeckt. Auf Grund der Veränderung des APC-Gen in FAP-Patienten, kommt es bei ca. 90% schon im Alter von ca. 16 Jahren zu Polypenbildung. Wenn keine Kolektomie durchgeführt wird, entwickelt sich ein Kolonkarzinom im Mittel im Alter von ca. 39 Jahren. [14,16,17] Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgen APC ist eine der wichtigsten Attribute die zu chromosomalen Instabilität (CIN) führt. CIN findet man in 85% und Mikrosatelliteninstabilität MSI in 15% aller sporadischen kolorektalen Tumoren. Die bedeutendste Aufgabe des APC besteht in der Regulation des Protoonkogen β -Catenin (CTNNB1). Wenn dieses durch Mutation aufgehoben wird, kommt es zur Stabilisierung von β -Catenin. Darauf folgen weitere Mutationen, z.B. im KRAS-Gen, das zuständig für die intrazelluläre Signalübertragung von der Zelloberfläche in den Zellkern ist. Durch diese Mutation kommt es zu einer gesteigerten Proliferation. Mutationen Im KRAS-Gen sind in Adenomen mit einem Durchmesser von >1 cm zu >50% nachweisbar. [14,18] Der dritte wichtige Schritt ist die Mutation von TP53 (p53), einem Tumorsuppressorgen, welches zuständig für die Induktion der Apoptose in der Zelle ist. TP53 Mutationen können in bis zu 75% der kolorektalen Tumoren nachgewiesen werden.

Bei diesem klassischen linearen Modell kommt es durch schrittweise (mindestens von sieben) genetische Alterationen in vier Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (z.B. APC, TP53, KRAS, DCC etc.) einerseits zum Verlust der Differenzierung andererseits zur Fähigkeit der Invasion und Metastasenbildung. [19] Nach *Vogelstein et al.* erwartet man, dass invasive Karzinome und Metastasen aus unregulierten monoklonalen Zellhaufen bestehen, welche sich aus einer adulten Stammzelle entwickelt haben. [14,19]

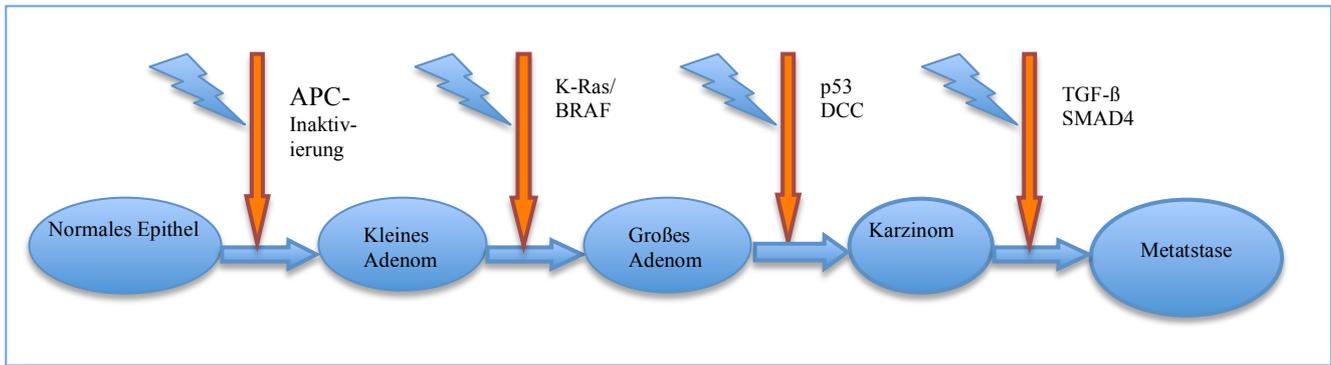


Abb.1.3.2a abgewandelte Darstellung des linearen Progressionsmodell nach *Vogelstein et al.*

Nun stellt sich die Frage, welche funktionielle Rolle der Inaktivierung des APC-Gens zukommt. Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz dieses Tumorsuppressorgens scheint es eine wichtige Rolle in der Regulation der kolorektalen Karzinogenese zu spielen und somit einen Erklärungsansatz für die Problematik der hohen Mortalität bietet.

1.3.3 Der kanonische Wntless pathway und β -Catenin

Der Gatekeeper APC, dessen Mutation bei vielen kolorektalen Karzinomen den erste Schritt zur chromosomalen Instabilität darstellt, ist Bestandteil des kanonischen Wntless Signalwegs. Der kanonische Wntless pathway (Wnt) ist zuständig für die kontrollierten Abläufe in einer Zelle und für die regulierte Proliferation. [10,14,19,20] Wnt ist wichtig für die Stabilisierung von β -Catenin. β -Catenin ist ein ambivalenter Faktor. Denn zum einen liegt β -Catenin hauptsächlich in der Zelle im Zytoplasma gebunden vor oder ist im Komplex mit E-Cadherin und α -Catenin, wo es ein intergaler Bestandteil der Zonula adhaerens ist, die für die Zelladhäsion zuständig ist. Zelladhäsion ist wichtig für die Bildung des epithelialen Zellverbandes. Zum anderen bestehen die Aufgaben von β -Catenin in der Aktivierung der Transkription für Gene, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung regulieren. (Abb. 1.3.3.a Teil A). Wenn der Wnt Ligand an seinen Rezeptor aus der Frizzled Familie und LRP5/6 bindet, wird β -Catenin von seinem destruktiven Komplex bestehend aus APC, dem direkten Bindungspartner zu β -Catenin im Zytoplasma, Axin, Dsh und GSK3- β gelöst und wandert in den Zellkern. Dort dockt β -Catenin an ein DNA-Bindungsprotein, das zur TCF/LEF Familie gehört, und zusammen mit β -Catenin die Transkription von Wnt-Zielgenen aktiviert (Abb. 1.3.3.a Teil B). Den aktivierten Wnt-Pathway, z.B. in den basal physiologischen Darmkrypten, kann man immunhistochemisch, durch eine Ansammlung von β -Catenin im Zellkern nachweisen.[10,45]

Die Zielgene, welche aufgrund der Bindung von β -Catenin an TCF/LEF transkribiert werden, führen zu Aktivierung oder Inaktivierung weiterer wichtiger Zielgene (MYC, Cyclin D1, MT1-MMP etc.).

- EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition):

E-cadherin  Vimentin  Fibronectin 

Aufgrund des Verlustes der Bindung von E-cadherin, β -Catenin und α -Catenin wird die Zelladhäsion gelöst und die Zelle somit aus Ihrem Zellverband befreit. Nachweisbar ist dies durch den Rückgang der Expression von E-Cadherin und die Zunahme der Expression von Vimentin und Fibronectin. Vimentin ist ein intermediäres Filament, welches in mesenchymalen Zellen stark exprimiert vorliegt. Fibronectin ist ebenfalls ein wichtiges extrazelluläres Protein unter anderem notwendig für die Angiogeneese. Auf Grund der Induktion von EMT treten gleichzeitig weitere Tumor fördernden Mechanismen (hallmarks of cancer) auf. [21,22,23,28,32]

- Proliferation: MYC  Cyclin D  p16 

MYC hat Einfluß auf die Proliferationsgeschwindigkeit und wird daher nur in Zellen nachgewiesen. Cyclin D ist ebenfalls nur in proliferierenden Zellen nachweisbar und kann nur nach Induktion von Wachstumsfaktoren gebildet werden. Cyclin D leitet die G1 Phase ein und im Komplex mit CDK4 kommt es zur Aktivierung der Transkription von Faktoren, die in der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus benötigt werden. p16 reguliert mit dem Rb-Gen die Zellteilung, welches nur u.a. möglich ist durch Anwesenheit von Cyclin D.[21,22,24]

- Migration: Laminin 5 γ -2  MT-MMP1  Tenascin-C 

Laminin 5 γ ist u.a. für die Zelladhäsion zur Bildung der Basallamina. Die kurze Kette von Laminin 5 γ -2 aktiviert die Auflösung der Zelladhäsion und führt zur Motilität von Zellen. [25] Um das kurz γ -2-Fragment zu generieren, wird MT-MMP1 benötigt, das Laminin 5 γ 2 hydrolysiert. Tenascin-C, ein Glykoprotein in der extrazellulären Matrix, zuständig für die Regeneration, und Verlust der Zelladhäsion, so dass epitheliale Zellen mesenchymaler werden (EMT).[21,22,26,27,28]

- Invasion: uPA ↑ uPAR ↑
Durch die Aktivierung des Urokinase Plasminogen Aktivator (UPA) und seines Rezeptors (UPAR), erfolgt die Auflösung der extrazellulären Matrix.[28,29]
- Angiogenese: VEGF ↑
Der Wachstumsfaktor Vascular Epidermal Growth Factor, induziert die Proliferation der Endothelzellen und dessen Immigration in minder perfundiertes Gewebe. [21,22]

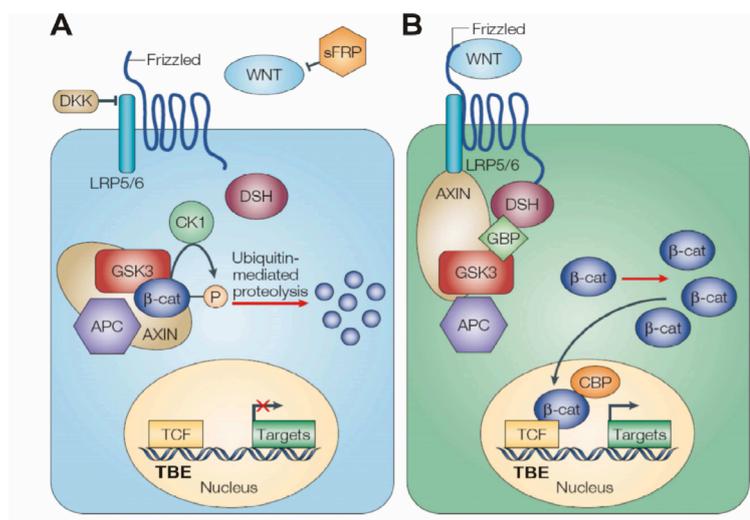


Abb. 1.3.3a: der kanonische Wnt-Signalingweg stellt den Entstehungsweg dar, aus der epitheliale Zelle (linke Abb.) zu mesenchymalen Zellen nach Andocken von Wnt an den Rezeptor Frizzled (rechte Abb.) (modifiziert nach Moon et al, S. Scheel) konvertieren. [30,31] β-Catenin liegt in epithelialen Zellen in einem Komplex aus APC und AXIN vor und wird durch CK1 und GSK3 phosphoryliert. Wenn Wnt die Zelle aktiviert (rechte Abb.), indem es den Frizzled/ LRP5/6 Komplex bindet, führt dies zur Aktivierung von DSH und Bindung von AXIN. Es erfolgt die Freisetzung von β-Catenin, welches in den Zellkern wandert und sich mit TCF/ LEF1 verbindet und so Transkription aktiviert.

Zusammengefasst führen Mutationen im APC-Gen (Gatekeeper), durch den kanonischen Wnt-pathway zur Freisetzung von β-Catenin und markiert den Beginn des Multigenen Karzinogenese Wegs, der letztendlich zur Karzinomentstehung und Metastasierung führt.

Nun stellt sich die Frage, welche kolorektalen Zellen für diese Entwicklung geeignet sind. Eine normale epitheliale Zelle des Dickdarms hat eine zu kurze Lebenszeitspanne, so dass

allein aus zeitlichen Gründen keine Akkumulation an Mutationen erfolgen kann, die im Bereich von Jahrzehnten anzusiedeln ist. Der einzige Zell-Typ im Dickdarm welcher eine lange Lebenszeitspanne besitzt sind adulte Stammzellen. Darüber hinaus besitzen adulte Stammzellen neben der langen Lebenszeit weitere wichtige Attribute zur Entwicklung eines Tumors: ❶ Oligopotenz, ❷ Proliferation und ❸ Selbsterneuerung. [28,32,35,50]

Die adulte Stammzelle

Diese drei wichtigen Eigenschaften (❶ Oligopotenz, ❷ Proliferation, ❸ Selbsterneuerung) besitzen nur Stammzellen, um z.B. neue sich weiter differenzierende Schleimhautzellen herzustellen oder bei Läsionen Gewebe reparieren zu können. [32,34,35,36] Adulte Stammzellen entwickeln sich wahrscheinlich aus embryonalen Stammzellen. Sie sind für die Selbsterneuerung und Zelldifferenzierung der Zellen eines Organes, in dem sie sich befindet z.B. der Haut, des Knochenmarks oder des Darms, verantwortlich. Adulte Stammzellen sind nicht mehr pluripotent sondern nur noch oligopotenz oder unipotent. [32,33] Betrachten wir eine Stammzelle z.B. aus dem Knochenmark, so können sich aus dieser die verschiedenen Zellreihen der Erythropoese oder Myelopoese neu regenerieren. Das Konzept von adulten Stammzellen wurde sehr gut an die der Hämatopoese beschrieben und untersucht. [34,35] Adulte Stammzellen des Darm befindet sich an der Basis der Krypten. Sie sind oligopotenz und können die differenzierten Zellen des Darmepithel nach Verletzungen regenerieren. [32,33,34,35,36]

Bedeutung der Stammzelle – als Ursprung der Tumorenstehung

Bei genauer Betrachtung der Tumorentstehung wird deutlich, dass durch die Mutationen in der Stammzelle erst ein Tumor entstehen kann. Die Mutationsrate kann durch exogene Faktoren gesteigert werden, wie Inflammation (z.B. Colitis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, etc.), Läsionen, Stress u.a.m., die auf die Zellen einwirken. In unterschiedlichen Studien (*in vivo*) konnte gezeigt werden, dass kolorektale Tumoren Tumorstammzellen enthalten, die ähnliche Eigenschaften wie adulte Stammzellen haben. So können sich aus Tumorstammzellen nach Xenotransplantation erneut heterogen differenzierte Tumoren entwickeln, wobei hierfür eine einzige Tumorstammzelle genügt. [37]

1.4 Tumorheterogenität

Nach der Feststellung, dass ein Tumor aus einer Stammzelle entsteht, ging man zunächst von der Annahme aus, dass Tumoren aus unregulierten monoklonalen Zellen bestehen. [19] Jedoch zeigt die Histologie, dass diese Annahme nicht stimmt, wenn man die Zellen eines Tumors mikroskopisch begutachtet. Zuerst ist die Zellmorphologie unterschiedlich, zweitens kann eine gewisse Struktur ähnlich zum entsprechenden Ursprungsgewebe erkannt werden. [32,35,38] Wenn ein Tumor nur aus Tumorstammzellen besteht, müsste in jeder Zelle β -Catenin im Zellkern nachweisbar sein, was jedoch nicht der Fall ist. Ein Teil der Zellen verlieren ihre mesenchymale Eigenschaften und differenzieren aus.[38] Ebenfalls müsste dann auch aus jeder Tumorzelle, ein neuer Tumor entstehen können. Dies ist wie oben genannt nur möglich, wenn es sich um eine Tumorstammzelle handelt. Tumoren sind heterogen organisiert, sodass sie aus Tumorstammzellen, den Vorläuferzellen und differenzierten Zellen bestehen. [32,35]

1.4.1 Das Tumorstammzellkonzept- Migrating Cancer Stem Cell Concept MCS

Eine Erweiterung des dargestellten Multistep Carcinogenesis Modell führt zum Tumorstammzellkonzept Migrating Cancer Stem Cell Concept - MCS. [22,28,32,35] Dabei beruht die Dynamik der Tumorprogression auf einem nichtlinearen d.h. gefächerten Eindringen von Tumorstammzellen. Dieses MCS Konzept führt zu einer besseren Beurteilung der neoplastischen Morphogenese oder des Patterning. Patterning ist ein zeitlicher und räumlicher Prozess, welcher zu tumorspezifischen Zellverbänden und Gewebestrukturen führt und damit diese definiert. [22,28,32,35]

Diese basalen Muster sind wichtige Merkmale und werden im Primärtumor sowie in dessen Metastasen beobachtet. So findet sich eine Invasionsfront zwischen gesundem Gewebe und dem Primärtumor bzw. den Metastasen. Das MCS Modell gilt sowohl für den Primärtumor als auch für dessen Metastasen.

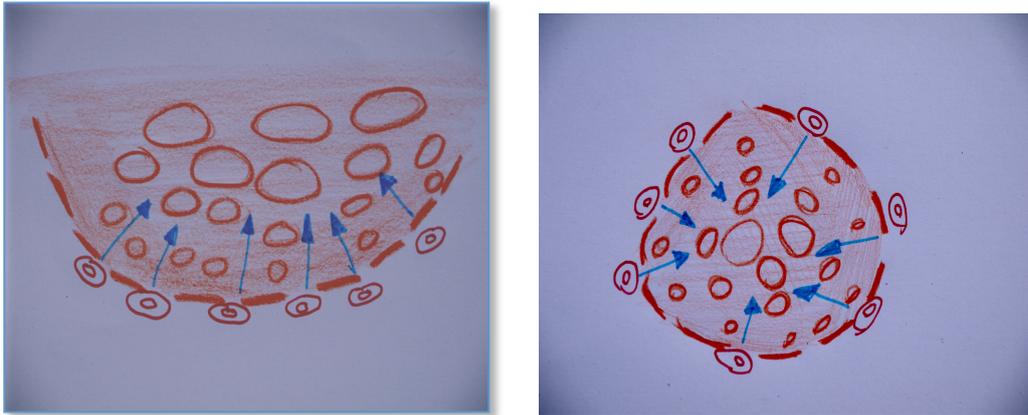


Abb. 1.4.1.a: zeigt schematisch links die Invasionsfront eines Primärtumor, rechts die Invasionsfront einer Metastase. Es erfolgt in Pfeilrichtung die Differenzierung der Tumorstammzellen nach *Brabletz et al.* [28,32]

Das MCS Modell beinhaltet einerseits als wichtigen Schlüsselfaktor den β -Catenin/Wnt-Signalweg (Abb.1.4.1a). Darüberhinaus ist β -Catenin in embryonalen Stammzellen über den Wnt-Signalweg aktiviert und übernimmt wichtige Rolle für Morphogenese, die Organogenese und EMT. [39] Transkriptionell aktives β -Catenin ist essentiell für alle Attribute eines Tumors (Kapitel 1.3.3).

1. Cancer stemness: Verfügt über einen permanent aktivierten Wnt-Signalweg und somit β -Catenin im Zellkern.
2. EMT: β -Catenin muss aus der Verbindung E-Cadherin und α -Catenin freigesetzt werden, damit aus epithelialen-mesenchymale Zellen entstehen können (EMT). Dies erfolgt über den permanent aktivierten Wnt-Signalweg und führt zur Mobilität der Zelle.[39]
3. Chemoresistenz: Tumorstammzellen werden auf Grund u.a. von MDR-1 und MRP-1, zwei Transportern, welche Zytostatika wieder aus den Tumorzellen entfernen, geschützt. [40] Ausserdem sind Tumorstammzellen infolge langsamer Zellteilung weniger für Chemotherapeutika angreifbar.
4. Metastasen: Werden von Tumorstammzellen gebildet, welche durch EMT Mobilität erlangen. An der Lokation der Disseminierung entstehen durch MET wieder differenzierte Tumorzellen. [39]

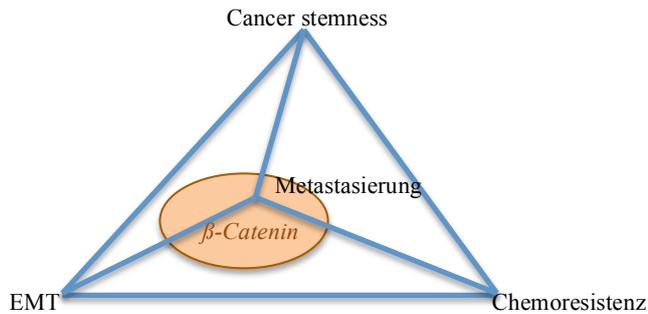


Abb.1.4.1a Modell der zentralen Stellung von β -Catenin in der Entwicklung des Kolonkarzinom, β -Catenin/Wnt-pathway ist immer die notwendige Grundlage für Cancer Stemness, EMT, Chemoresistenz und Metastasierung (siehe Text)

Andererseits ist das Stroma als Microenvironment ein Faktor bei der Tumorentstehung und für die Metastasierung. Es unterstützt die Zelldifferenzierung und Dedifferenzierung, also den Prozess Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) zu Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) und umgekehrt von MET zu EMT. Dies führt schlussendlich u.a. wieder zu den fünf Kennzeichen von Krebs (hallmarks of cancer) (Kap.1.3.3) [39,41,42,43]

Erneut stellt sich an diesem Punkt die Frage, welche Zelle am Besten dafür geeignet wäre. Die ähnlichsten notwendigen Eigenschaften besitzt die embryonale Stammzelle.

Die embryonale Stammzelle

Bei näherer Betrachtung der essentiellen Eigenschaften einer Stammzelle im Vergleich zu einer Tumorstammzelle, kann eine adulte Stammzelle nicht alle diese erfüllen. Infolgedessen ist die embryonale Stammzelle, welche keiner Restriktion unterliegt, der Tumorstammzelle am ähnlichsten. Die embryonale Stammzelle (ES) geht direkt aus dem inneren Zellhaufen (ICM) der Blastozyste hervor und kann sich unendlich reproduzieren und sich in alle 3 Keimblätter differenzieren (Pluripotenz). [44] In der embryonalen Stammzelle hat man einen aktivierten Wnt-pathway und findet β -Catenin im Zellkern, sowie hohe Werte an *SOX2*, *Oct4*, *Nanog* und *c-Myc* (*the magic four*). [46,51]

Die Tumorstammzelle

Tumorstammzellen haben im Vergleich zu adulten Stammzellen Eigenschaften, die sich in embryonalen Stammzellen finden, insbesondere die Unsterblichkeit (*cancer hallmark: eternal life*). Weiterhin findet sich in Tumorstammzellen die Expression von Proteinen, die sich sonst nur in embryonalen Stammzellen finden. [45,46] Umgekehrt bewirkt die retrovirale Transduktion insbes. von *SOX2* und/ oder den drei Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *MYC* und

KLF4) eine Aktivierung der Pluripotenz und der Möglichkeit Eigenschaften von embryonalen Stammzelle in sich zu tragen. [45,46]

Der Tumorstammzellmarker *SOX2*

Um direkt an der Invasionsfront des Tumors oder dessen Metastasen Tumorstammzellen aufzufinden, benötigt man spezielle Marker – die Tumorstammzellmarker.

Diese sollen Tumorstammzellen markieren und dadurch Hinweise auf die Stärke der Malignität geben, denn das hat für die weitere Tumorbehandlung Bedeutung. Besonders ist *β-Catenin* ein Tumorstammzellmarker, der sich bewährt hat. In vorliegender Arbeit soll eruiert werden, ob auch *SOX2* sich als Tumorstammzellmarker eignet.

1.5 *SOX2*

Aufgrund erhöhter Werte von Proteinen, welche normalerweise nur in dieser Konstellation in embryonalen Stammzellen vorliegen, wie z.B. *SOX2*, die jedoch auch in Tumorzellen nachgewiesen wurden. Es stellte sich die Frage ob es sich bei diesen Tumorzellen um Tumorstammzellen handelt. Ein Hinweis darauf ergibt sich ebenfalls in der Forschung mit adulten Stammzellmarkern wie *Lgr5*, *CD133*, jedoch sind diese als Tumorstammzellmarker nicht ausreichend geeignet, da sie nicht ausreichend die Tumorstammzellen nachweisen können. Es wird daher eine Tumorstammzellmarker benötigt, welcher prognostische Relevanz besitzt. *SOX2* ist ein Protein, welches in embryonalen Stammzellen, sowie in Tumoren nachgewiesen werden konnte. [50] Deshalb ist es interessant *SOX2* genauer zu erforschen, um die Relevanz in der Tumorenstehung besser verstehen zu können. Mit dem Ziel festzustellen, ob es sich um einen Tumorstammzellmarker handelt.

1.5.1 Lokalisation

Das *SOX2* Gen kodiert eine 1085bp lange kodierende mRNA und liegt auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 3 in der Region q26.3- 27. [47]

SOX2 ist ein SRY-related HMG-Box Protein, und hat die Funktion eines Transkriptionsfaktors. Es ist verantwortlich für die Pluripotenz und Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen. [49] Dies erfolgt einerseits über die direkte Bindung an der DNA mit kurzer wenig spezifizierter Sequenz oder andererseits durch die Möglichkeit des DNA- „aufbiegen“. Ebenfalls ist die Synergie von verschiedenen Transkriptionsfaktoren z.B. *SOX2* und *Oct3/4* zur weiteren Transkription ein Vorteil. [48]

1.5.2 Vorkommen

SOX2 wird unter anderem während der embryonalen Entwicklung exprimiert.

Die größte Menge an *SOX2* wird während der Gehirnentwicklung - genauer Nervenzellbildung - im extraembryonalen Ektoderm, in der pluripotenten ICM (Inner Cell mass = Embryoblast), im Epiblast, in den Keimzellen und in den Vorläuferzellen des Nervensystems nachgewiesen. [47,49]

Die Abnahme des *SOX2* Levels führt zur Zellmorphologieänderung, sowie zur Modifikation der Morphologie der Kolonie, sowie zum Verlust von anderen Stammzellmarkern. [49,51]

SOX2 gehört zu den embryonalen Faktoren der Stammzelltransfektion im embryonalen Kopfdarm und im Magenepithel des Menschen, sowie im Gastrointestinaltrakt der Maus. [46,49]

Große Mengen von *SOX2* findet man auch in embryonalen Karzinomen. [49]

SOX2-Expression wurde auch in Siegelring- und muzinösen Adenokarzinomen des Kolon, Oesophaguskarzinomen, Mammakarzinomen und Analkarzinomen gefunden. [45,49,50]

Embryonale Stammzellen werden durch 3 Faktoren in ihrer Pluripotenz und Selbsterneuerung reguliert: *Oct4*, *Nanog* und *SOX2*. [46,47,48,51]

1.5.3 Aufgaben

SOX2 und *Oct-3/4* können ihre eigenen Gene, sowie auch alle anderen Gene transkribieren, die für die Embryogenese verantwortlich sind. [52]

SOX2 ist essentiell in der Embryonalentwicklung, um Selbsterneuerung und Pluripotenz zu erhalten.

1.6 Interaktion *SOX2* mit β -Catenin

In einigen Studien [53] konnte ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen *SOX* Transkriptionsfaktoren und dem kanonischen *Wnt-pathway* und β -Catenin dargestellt werden. β -Catenin, welches nukleär vorliegt, ist ein Tumorstammzellmarker. *SOX2* ist ein embryonaler Stammzellmarker, wird jedoch auch in Tumoren festgestellt. Kann diesem eine regulatorische Komponente im Sinne einer noch nicht bekannten Interaktion bzw. Koppelung den *SOX* Transkriptionsfaktoren zugeschrieben werden?

1.7 Ziele des Projektes/Hypothesen

Die Beurteilung eines Karzinoms ist von grösster Bedeutung. Diesbezüglich werden verschiedene Tumormarker diskutiert. In dieser Studie soll eruiert werden, ob insbesondere *SOX2* ein prognostischer Tumorstammzellmarker für rechtsseitige Kolonkarzinome ist. Außerdem gehe ich davon aus, dass der Nachweis von *SOX2* und *β-Catenin* im rechtsseitigen Kolonkarzinom ebenfalls für eine hohe Tumoraktivität spricht und diese assoziiert ist mit Vorkommen von Lymphknoten- und Lebermetastasen. Neben dem eigentlichen Nachweis von *SOX2* und *β-Catenin* soll auch die Frage der Korrelation dieser Marker in Hinblick auf hohe Malignität überprüft werden. Ebenfalls soll die Frage des möglichen Vorkommens einer geschlechterspezifischen oder einer altersspezifischen Korrelation mit *SOX2* und *β-Catenin* geprüft werden.

2 Material & Methoden

2.1 Immunhistochemie/ Färbung der Schnitte

Die 5µm dicken Serienschnitte der 114 Fälle des Kollektivs wurden wie folgt immunohistologisch gefärbt.

2.1.1 Die Färbung der Schnitte mit SOX2

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung nach folgenden Schritten: Zuerst wurden die Schnitte in ein Xylol Bad [Staub, München] gegeben, dann folgte eine doppelt angelegte Ethanolreihe [Staub, München] mit 100%, 96% und 70% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte in deionisiertes Wasser [Noll München, Deutschland] gelegt. Jeder einzelne Schritt an sich dauerte ungefähr ca. 2 Minuten.

Um die Färbung vorzubereiten, wurden die Schnitte mit der Epitope Retrieval Solution pH 6 von Novocastra [Leica Wetzlar, Deutschland] vorbehandelt. Dies führte zur Demaskierung der Antigene. Die Epitope Retrieval Solution pH 6 wurde im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Schnitte wurden in einem Färberahmen in die Epitope Retrieval Solution eingetaucht, bis alle Objektträger komplett bedeckt waren. Anschließend wurden sie für 15 Minuten in der Mikrowelle bei 750 Watt behandelt, danach wurde die Epitope Retrieval Solution wieder nachgefüllt, so dass alle Objektträger mit der Epitope Retrieval Solution bedeckt waren. Erneut wurden sie bei 750 Watt für 15 Minuten in die Mikrowelle gegeben.

Dann wurden die Objektträger aus der Lösung herausgenommen und kühlen für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Als nächster Schritt folgte das zweimalige Spülen der Objektträger in einem Behälter mit TRIS-Puffer bei pH 7,5 jeweils für 5 Minuten. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch das Einlegen der Objektträger in wässriges 7,5% Wasserstoffperoxid [Roth Karlsruhe, Deutschland] für 10 Minuten. Anschließend wurden diese 10 Minuten lang unter fließendes Leitungswasser gestellt. Das gleiche Verfahren wurde mit TRIS- Puffer 7,5% für zwei Mal 5 Minuten durchgeführt. Die Schnitte waren damit für den eigentlichen Färbeprozess vorbereitet. Man verwendete dazu aus dem ImmPRESS Reagent Kit Anti-Kaninchen Immunglobulin von der Firma Vector [Vector Lab. Inc. Burlingame CA USA] das Blocking Serum, das den Zustand der freigelegten Antigenoberfläche konstant hält. Das Blocking Serum wurde auf die Schnitte mit dem Volumen von ca. 100-400 µl pipettiert, bis der jeweilige Objektträger komplett bedeckt war. Es wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach wurde der Überstand abgekippt. Der Primärantikörper *SOX2*-Klon wurde im Verhältnis 1:50 mit Antibody diluant background reducing component [Dako Hamburg, Deutschland] verdünnt und auf die Schnitte pipettiert in einer Menge von ca. 100-400 µl bis der einzelne Objektträger komplett bedeckt war, danach inkubiert der Primärantikörper *SOX2* für ca. 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Die gesamten Objektträger wurden dann zwei Mal jeweils für 5 Minuten mit TRIS-Puffer 7,5% gewaschen. Das Anti-Kaninchen Immunglobulin wurde in einer Menge von ca. 100-400 µl pipettiert bis jeder einzelne Objektträger komplett bedeckt war und inkubierte für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte anschliessend ein zweimaliges Spülen mit TRIS-Puffer 7,5% für 5 Minuten. Um den Prozess nicht unabsichtlich zu beschleunigen, erfolgte die Färbung mit einer 2°-8°C kalten AEC Lösung (Aminoethyl Carbazole) [Invitrogen Darmstadt, Deutschland], welche direkt auf die Schnitte in einer Menge ca. 100-400 µl pipettiert wurde, bis jeder einzelne Objektträger komplett bedeckt war und diese blieben bei einer Raumtemperatur für ca. 10 Minuten stehen.

Durch die Aufeinanderfolge der verschiedenen Verfahren entstand eine Rotfärbung durch den positiven Antigen-Antikörper Kontakt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten fließend gewässert (Leitungswasser). Die Gegenfärbung erfolgte durch eine 10 Sekunden lange Färbung mit Hematoxylin (Gill`s Formula) [Vector Lab. Inc., Burlingame CA USA], welche sofort danach mit Leitungswasser für 10 Minuten fließend gewässert wurde.

Anschließend folgte die Eindeckelung mit Kaisers Glyceringelatine [Merck Darmstadt, Deutschland].

2.1.2 Die Färbung der Schnitte mit β -Catenin spezifischen Antikörpern

Die Schnitte wurden in eine Ventana Benchmark XT [Ventana Medical Systems Inc., Oro Valley, Arizona, USA] gegeben, ein Gerät, welches mit Einsetzen eines speziell dafür entwickelten Produkt-Kits automatisch alle Färbeschritte durchführte.

Zur Färbung von β -Catenin setzt man den anti- β -Catenin mouse monoclonal antibody clone 14 [Ventana] und XT Ultra-View Diaminobenzidine Kits von Ventana [Ventana] ein. Der monoklonale anti- β -Catenin Antikörper der Maus wird nach Anweisung des Herstellers in den vorgesehenen Behälter gegeben und ebenfalls das Ultra-View Diaminobenzidine Kit von Ventana. Es wird das vom Hersteller vorgesehene Programm der Ventana Benchmark XT durchgeführt (siehe Herstellerverzeichnis S. 50).

2.2 Statistik

Die statistische Auswertung der immunohistochemischen Ergebnisse wurde durch den Chi-Quadrat-Test bestimmt. Alle Auswertungen wurden zweiseitig mit einem α -Fehler von 5% ($p < 0,05$) durchgeführt. Zur Berechnung wurde die Software SPSS Version 18.0 [54] (SPSS Inc., Chicago, IL) eingesetzt. Die statistischen Berechnungen wurden von *Herrn PD Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann* aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilian Universität erstellt.

3 Ergebnisse

Es wurden in einer Fall-Kontroll-Studie an metastasierten kolorektalen Karzinomen die Expressionen von *SOX2* und β -Catenin untersucht. Die Wahl des Studiendesigns als Fall-Kontroll-Studie berücksichtigt den retrospektiven Beobachtungszeitraum von 1994- 2004. Um die Qualitätssicherung zu gewährleisten (Kapitel 3.1 Kollektiv) wurden 57 Fälle von rechtsseitigem Kolonkarzinom mit Metastasen ($n=57$) gegenübergestellt zu Kontrollfällen ($n=57$), die in den Zuordnungskriterien (Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, gleiches Universitätskrankenhaus, definierter Zeitrahmen) genau als „matched pairs“ geeignet waren.

Die Fallgruppe (M1, $n=57$) bestand aus einem Patientenkollektiv, bei dem durch die Bildgebung ein rechtsseitiges Kolonkarzinom und eine oder mehrere Lebermetastase/n festgestellt worden war/en. Die Kontrollgruppe (M0, $n=57$) bestand aus einem

Patientenkollektiv, bei dem zum Zeitpunkt der Entfernung des rechtsseitigen Kolonkarzinoms keine Metastasen vorhanden waren. Die Patienten der Kontrollgruppe waren außerdem im Verlauf von mindestens 5 Jahren Rezidiv frei.

Die immunhistochemische Darstellung von *SOX2* und *β-Catenin* ist im Einzelnen am rechtsseitigen Kolonkarzinom und an dessen Metastasen wichtig, um die Frage zu klären, ob *SOX2* und *β-Catenin* als Tumorstammzellmarker angesehen werden können. Nukleäres *β-Catenin* ist ein anerkannter Marker für Tumorstammzellen und wurde dazu in verschiedenen Tumoren wie auch dem Kolonkarzinom bereits eingesetzt. *SOX2* liegt ebenfalls in hoher Konzentration in embryonalen Stammzellen vor und konnte unter anderem beim Magenkarzinom nachgewiesen werden. Ich zeige anhand meiner Studie, dass *SOX2* ebenfalls wie *β-Catenin* ein Tumorstammzellmarker ist und an der Invasionsfront des Primärtumors und in den Metastasen nachweisbar ist. Ebenso sollte der Zusammenhang von *SOX2* und *β-Catenin* zueinander bei der Annahme von hoher Expression von beiden im Zellkern bei metastasierenden Tumoren geprüft werden.

3.1 Das Kollektiv

Die Zusammenstellung des Kollektivs für die Fall-Kontroll-Studie, bestehend aus Fällen mit metastasierten und nicht metastasierten rechtsseitigen Kolonkarzinomen, erfolgte aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) München. In Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum München erhielt ich die relevanten Patientendaten und konnte für die Fall-Kontroll-Studie zwei abgestimmte Patientengruppen (matched pairs) zusammenstellen. In diesem Kollektiv hatte jeder Patient ein diagnostiziertes rechtsseitiges Kolonkarzinom, sowie die Fallgruppe ein rechtsseitiges Kolonkarzinom mit Lebermetastasen. Die Altersverteilung, Geschlechtsverteilung und die Tumorlokalisation (Colon ascendens/ rechtsseitig) war Bestandteil der Zuordnungskriterien.

Die Fallgruppe (M1) und Kontrollgruppe (M0) wurden unter Berücksichtigung der Tumorstadien-Einteilung nach den WHO (World Health Organisation) - Richtlinien von 2000 und nach den UICC (Union for International Cancer Control) - Richtlinien von 2009 zusammengestellt. [55, 56] Es konnten aus dem Zeitraum 1994 bis 2005 für das Kollektiv 114 Fälle mit 57 übereinstimmenden Patientenprofilpaaren erhoben werden. Das Kollektiv bestand aus kurativ entfernten, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten 114 rechtsseitigen Kolonkarzinomen. Zu jedem der 114 Fälle konnte mindestens ein repräsentativer in Paraffin eingebetteter Tumorblock für die Studie verwendet werden. Aus diesen Tumorblöcken wurden 5µm dicke Serienschnitte hergestellt. In der Fall- Kontroll-

Studie wurde nach Zuordnungskriterien „matched pairs“ bezüglich des Alters, des Geschlechtes und der Tumorlokalisation (rechtsseitiges Kolonkarzinom) gebildet. Durch diese angepassten Variablen ähneln sich die Gruppen, um eine Verzerrung (*bias*) so klein wie möglich zu halten. Die Fallgruppe (M1, n=57) bestand aus einem Patientenkollektiv, bei dem durch die Bildgebung ein rechtsseitiges Kolonkarzinom und eine oder mehrere Lebermetastase/n festgestellt wurde/n. Die Kontrollgruppe (M0, n=57) bestand aus einem Patientenkollektiv, bei dem zum Zeitpunkt der Entfernung des rechtsseitigen Kolonkarzinoms keine Metastasen vorhanden waren. Die Patienten der Kontrollgruppe waren außerdem im Verlauf von mindestens 5 Jahren Rezidiv frei.

3.2 Die Auswertungskriterien

3.2.1 Die Auswertungskriterien für SOX2

Die Auswertung der mit *SOX2* Antikörper gefärbten Tumorschnitte wurde von 2 Personen (*Fiorina McLeod, Jens Neumann*) unabhängig voneinander mit Hilfe von Lichtmikroskopen durchgeführt. Als Parameter für die Auswertung wurde die Intensität der immunhistochemischen Färbung und der prozentuale Anteil der gefärbten Zellkerne (Tab.3.2.1A-B) unabhängig beurteilt und in einer Exeltabelle unabhängig dokumentiert. Die Richtlinien sind angelehnt an das Bewertungsverfahren von *Park et al.* [57], nach dem auch die Auswertung vorgenommen wurden. Die Ergebnisse wurden überprüft und die korrelierenden Ergebnisse nach den unten genannten Richtlinien übernommen. Diskrepante Fälle wurden erneut untersucht und dann einer der vier Kategorien zugeteilt. Die Intensität und der prozentuale Anteil der gefärbten Zellkerne von *SOX2* wurde anhand folgender Einteilung als Richtlinie bewertet (Tab. 3.2.1 A).

Die Intensität *SOX2* positiver Zellkerne wurde durch vier Kategorien beschrieben:

Niedrig	0	keine Färbung
	1	schwache Färbung
Hoch	2	mäßige Färbung
	3	starke Färbung

Tabelle 3.2.1A: Intensität der gefärbten Zellkerne bei *SOX2*

Der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellkerne bei *SOX2* wurde in Schritten von 5 Prozent eingeteilt (Tabelle 3.2.1B):

Niedrig (<10%)	0	keine „prozentuale“ Anfärbung des Gewebes
	5%	entspricht einer 5 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	10%	entspricht einer 10 prozentigen Anfärbung des Gewebes
Hoch (>10%)	20%	entspricht einer 20 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	30%	entspricht einer 30 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	40%	entspricht einer 40 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	50%	entspricht einer 50 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	60%	entspricht einer 60 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	70%	entspricht einer 70 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	80%	entspricht einer 80 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	90%	entspricht einer 90 prozentigen Anfärbung des Gewebes
	100%	entspricht einer 100 prozentigen Anfärbung des Gewebes

Tabelle 3.2.1B: prozentualer Anteil der gefärbten Zellkerne bei *SOX2*

Die Schnitte mit einer Farbintensität von 0 und 1 bei *SOX2* werden mit „Niedrig“ im Text und in den Tabellen (Kapitel 3) bezeichnet. Mit einer Farbintensität von 2 und 3 werden bei *SOX2* die Ergebnisse im Text und den Tabellen als „Hoch“ beschrieben (Abb. 3.2.1c und Abb. 3.2.1d).

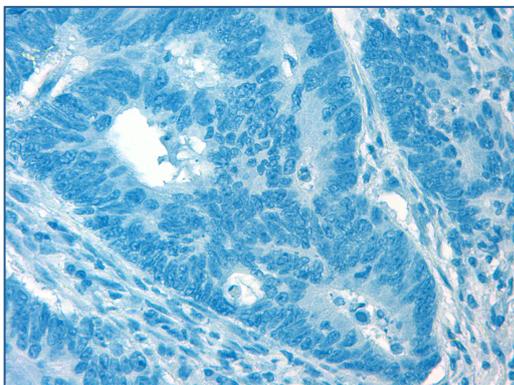


Abb.3.2.1a: Farbintensität 0 bei *SOX2*,
400-fache Vergrößerung

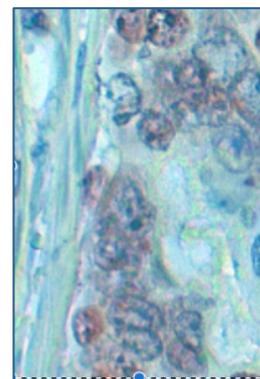


Abb.3.2.1b: Farbintensität 1 bei *SOX2*,
400-fache Vergrößerung +
Zoom

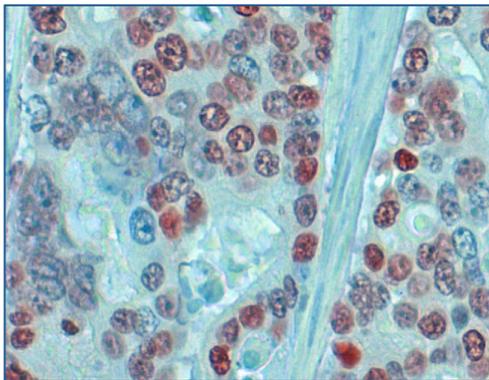


Abb. 3.2.1c: Farbintensität 2 bei *SOX2*,
400-fache Vergrößerung
+ Zoom

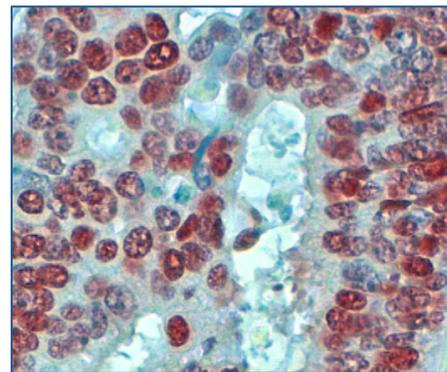


Abb. 3.2.1d: Farbintensität 3 bei *SOX2*,
400-fache Vergrößerung
+ Zoom

Die Schnitte mit der prozentualen Anfärbung der Zellkerne $< 10\%$ bei *SOX2* werden ebenfalls als „Niedrig“ im Text und den Tabellen bezeichnet. Eine prozentuale Anfärbung der Zellkerne bei *SOX2* $> 10\%$ wird im Text und den Tabellen als „Hoch“ beschrieben.

Die Färbung des Zytoplasmas wurde nicht bewertet.

3.2.2 Die Auswertungskriterien der immunhistochemischen β -Catenin spezifischen Färbungen

Serienschnitte des Kollektivs, die immunhistochemisch mit β -Catenin gefärbt worden waren und deren Ergebnisse standen aus vorhergehenden Untersuchungen für diese Arbeit zur Verfügung. [58] Die Auswertung dieser gefärbten $5\mu\text{m}$ dicken Tumorschnitte wurde von zwei Personen (*Jens Neumann, Lydia Kriegl*) unabhängig voneinander mit Hilfe von Lichtmikroskopen durchgeführt und die Ergebnisse korreliert. [58]

Diskrepante Fälle wurden gemeinsam erneut bearbeitet, diskutiert und ein Konsensus gefunden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte nach dem modifizierten Bewertungsverfahren von *Park et al.* [57]

Der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Zellkerne bei β -Catenin wurde in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 3.2.2A):

Niedrig	0	keine „prozentuale“ Anfärbung der Zellkerne
	1+	prozentuale Anfärbung $< 30\%$
Hoch	2+	prozentuale Anfärbung zwischen $30\text{-}60\%$
	3+	prozentuale Anfärbung $> 60\%$

Tabelle 3.2.2A: prozentuale Anfärbung der Zellkerne mit β -catenin

Die Schnitte mit der prozentualen Anfärbung der Zellkerne 0 und +1 bei β -Catenin werden im Text und in den Tabellen als „Niedrig“ bezeichnet. Die prozentuale Anfärbung der Zellkerne +2 und +3 der Schnitte von β -catenin werden im Text und in den Tabellen als „Hoch“ beschrieben.

3.2.3 *SOX2* und β -Catenin Expression im Kollektiv

Um den Nachweis zu führen, dass *SOX2* ein Tumorstammzellmarker ist, musste dieser in den Tumorstammzellen im Primärtumor und seiner Metastase/n immunhistochemisch dargestellt werden. Dazu wurde zunächst ein Färbeprotokoll entwickelt, das eine Sox-2 spezifische Färbung sicherstellte. Dazu wurden Gewebeblöcke eingesetzt, die normale rechtsseitige Darmkrypten (Abb. 3.2.3a) und normaler Magenmucosa (Abb. 3.2.3b) enthielten. Wie angenommen, stellen sich die Darmkrypten aus dem rechtsseitigen Kolon als Negativkontrolle und die normale Magenmukosa als Positivkontrolle dar.

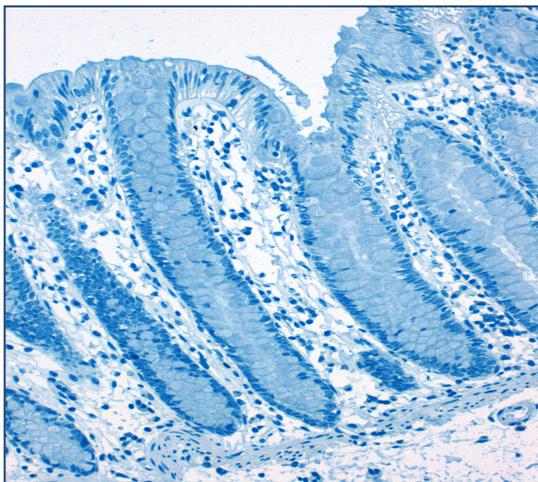


Abb.: 3.2.3a: normale Darmkrypten, 200-fache Vergrößerung

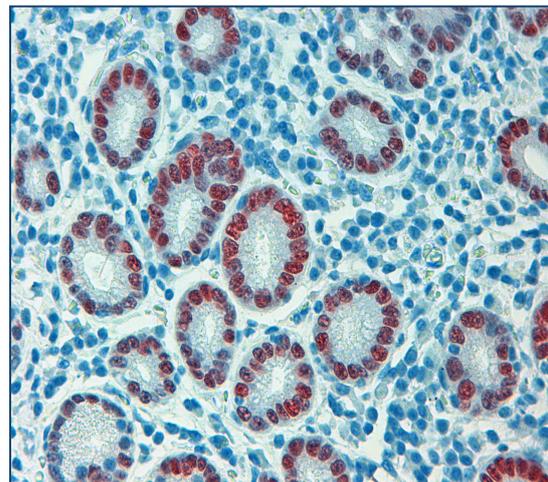


Abb. 3.2.3b: *SOX2* positiv- Kontrolle einer normalen Magenmucosa, 400-fache Vergrößerung

In 83 Fällen war auf den Tumorschnitten eine normale Kolonschleimhaut vorhanden (Abb. 3.2.3a). In 4,8% der Fälle konnte man eine nukleäre *SOX2*- Expression in Zellen an Basis der Darmkrypten nachweisen (Abb. 3.2.3c).

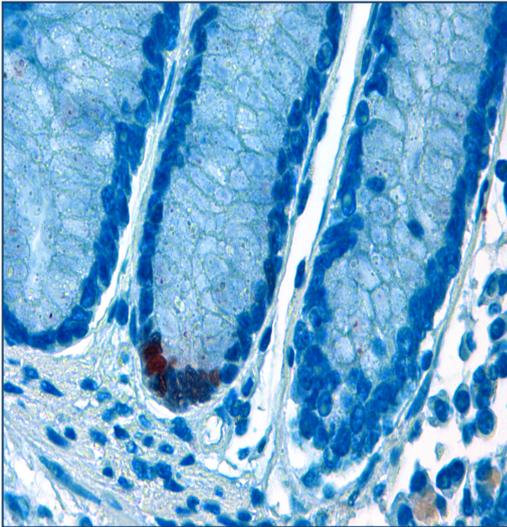


Abb.: 3.2.3c: normale basale Darmkrypten, *SOX2* stellt sich im Zellkern rot dar (bei 4,8% der Fälle), 630-fache Vergrößerung

Von den 114 rechtsseitigen Kolonkarzinomfällen ließ sich in 21,1% der Fälle immunohistochemisch *SOX2* im Zellkern nachweisen (Abb. 3.2.3e, Tab. 3.2.3A). Im Vergleich dazu eine Positiv- und Negativkontrolle eines Adenokarzinom (Abb. 3.2.3d, Abb. 3.2.3e) im rechtsseitigen Kolon.

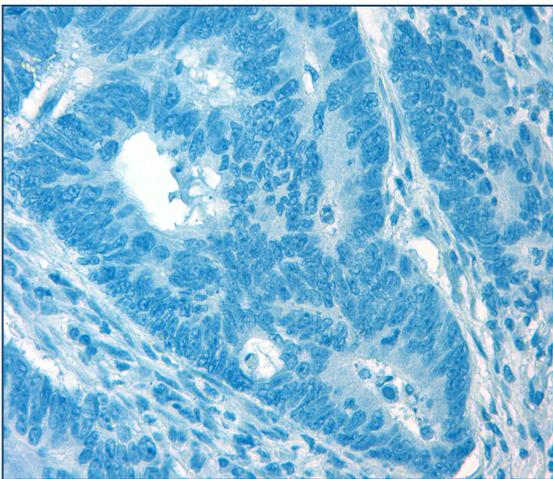


Abb. 3.2.3d: Adenokarzinom des rechtsseitigen Kolon stellt sich *SOX2* negativ dar

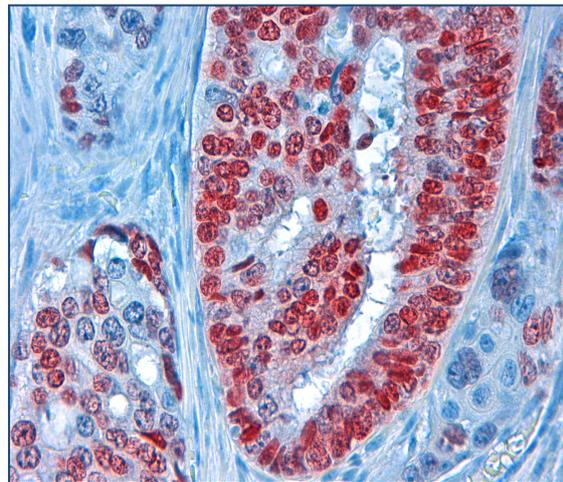


Abb. 3.2.3e: Adenokarzinom des rechtsseitigen Kolon stellt sich *SOX2* positiv dar positivem Nachweis im Zellkern

Im Zytoplasma betrug der Nachweis von β -*Catenin* im Kollektiv 91,2% (Abb. 3.2.3f). Dies ist zu erwarten, da β -*Catenin* normalerweise im Zytoplasma (Kapitel 1.3.3) gebunden vorliegt. β -*Catenin* konnte bei 33,3% der 114 rechtsseitigen Kolonkarzinome des Kollektivs im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 3.2.3g).

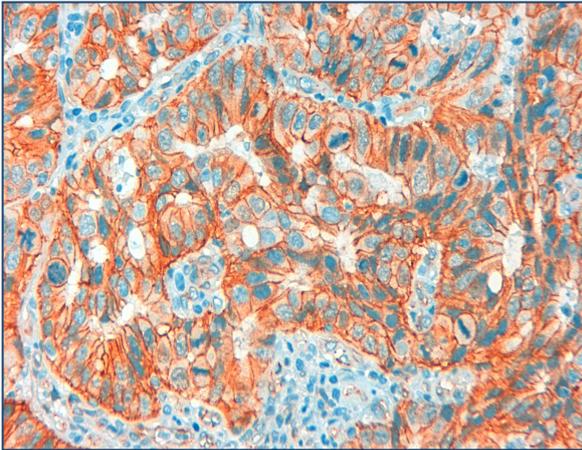


Abb. 3.2.3f: Zytoplasma und Zellmembran β -Catenin positiv

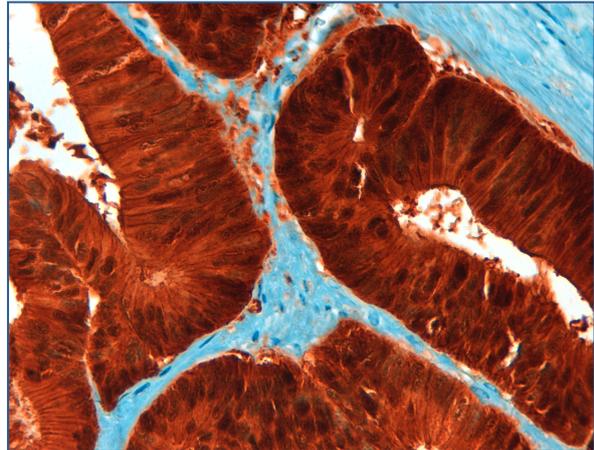


Abb. 3.2.3g: Adenokarzinom des rechtsseitigen Kolon, Tumorzellkerne β -Catenin positiv

Ausmaß (Intensität und Prozentangabe) der Anfärbung in Bezug auf den Lymphknotenstatus:

Wenn Lymphknotenmetastasen vorliegen und der Tumor schon die Submukosa oder die Mucosa muscularis infiltriert hat, konnte man davon ausgehen, dass auch Tumorstammzellen die Lymphknoten erreicht hatten und in diesen weiter proliferieren. Dann sollte auch *SOX2* als Tumorstammzellmarker in diesen „aktivierten“ proliferierenden rechtsseitigen Kolonkarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch nachzuweisen sein. Dies bestätigen auch die erhobenen Daten. Ein positiver *SOX2* Wert („Hoch“, n=24) wurde für den Lymphknotenstatus der Kontrollgruppe (N0) in 21% (n=5) der Fälle festgestellt und der Wert für den Lymphknotenstatus der Fallgruppe (N+) betrug 79% (n=19). Damit war der *SOX2* Wert in der Fallgruppe hoch signifikant $p = 0,006$ für Lymphknotenmetastasen (Chi²-Test, $p = 0,006$) (Gesamtmenge in Tab. 3.2.3A).

	Total (%)	<i>SOX2</i>		p
		Hoch (%)	Niedrig (%)	
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)	
Lymphknotenstatus				
N0	52 (45.6)	5 (4.4)	47 (41.2)	0.006
N+	62 (54.4)	19 (16.7)	43 (37.7)	

Tabelle 3.2.3A: statistische Auswertung von *SOX2*, Lymphknotenbefall gesamt

Nicht signifikant ($p=0,35$; Tab. 3.2.3B) war der Unterschied im Bezug auf β -Catenin im Lymphknotenstatus der Kontrollgruppe (N0) zu dem der Fallgruppe (N+).

	β -Catenin (Zellkern)			P
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	
Patienten gesamt	114 (100)	38 (33.3)	76 (66.7)	
Lymphknotenstatus				
N0	52 (45.6)	15 (13.2)	37 (32.5)	0.35
N+	62 (54.4)	23 (20.2)	39 (34.2)	

Tabelle 3.2.3B: statistische Auswertung von β -Catenin Lymphknotenbefall gesamt

Ausmaß (Intensität und Prozentangabe) der Anfärbung in Bezug auf den Fernmetastasenstatus:

Zu erwarten ist ebenfalls der Nachweis von *SOX 2* in den rechtsseitigen Kolonkarzinomen und in dessen Lebermetastase/n, wenn man annimmt, dass Tumorstammzellen über den Einbruch in die Blutgefäße zu den Organen entsprechend des venösen Abflussgebiets gelangen und in ihnen Fernmetastasen bilden. Der Lebermetastasenstatus der Kontrollgruppe (M0) unter alleiniger Betrachtung der Teilmenge der Gruppe mit hohem *SOX2* Wert ($n=24$) zeigte, dass bei 29,2% ($n=7$) der rechtsseitigen Kolonkarzinome die Zellkerne sich *SOX2* positiv darstellen. In der Fallgruppe (M1) konnte man beim Lebermetastasenstatus eine deutlich höhere Anzahl von 70,8% ($n=17$) *SOX2* positiven Kolonkarzinomen feststellen.

Im Chi-Quadratstest stellte man im Bezug auf die *SOX2* positiven („Hoch“-Gruppe) ein signifikantes Ergebnis von $p=0,022$ fest (Gesamtmenge in Tab. 3.2.3C).

	<i>SOX2</i>			p
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)	
Metastasen (Leber)				
M0	57 (50)	7 (6.1)	50 (43.9)	0.022
M1	57 (50)	17 (14.9)	40 (35.1)	

Tabelle 3.2.3C: statistische Auswertung von *SOX2*, Metastasenstatus

Bei alleiniger Betrachtung der Teilmenge mit hohem β -Catenin-Wert ($n=38$) betrug der Nachweis von β -Catenin in der Kontrollgruppe (M0) 29% ($n=11$), dagegen waren es in der Fallgruppe (M1) entsprechend 71% ($n=27$). Dieser schon deutliche Verteilungsunterschied wird durch ein hoch signifikantes Ergebnis im Chi-Quadratstest untermauert ($p=0,001$; Gesamtmenge in Tab. 3.2.3D).

Dies bestätigt die Hypothese, dass bei Tumorprogredienz β -Catenin im Zellkern erhöht vorliegt.

	β -Catenin (Zellkern)			p
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	
Patienten gesamt	114 (100)	38 (33.3)	76 (66.7)	
Metastasen (Leber)				
M0	57 (50)	11 (9.6)	46 (40.4)	0.001
M1	57 (50)	27 (23.7)	30 (26.3)	

Tabelle 3.2.3D: statistische Auswertung von β -Catenin, Metastasenstatus

Zur zusätzlichen Qualitätsprüfung der Fall-Kontroll-Studie wurde ebenfalls die Altersverteilung und die Geschlechterverteilung, durch den Chi-Quadratstest validiert, mit den zu erwartendem negativem Ergebnis.

Altersverteilung:

Um die Variablen in der Altersverteilung unabhängig zu halten, wurden die matched pairs nach Alter zusammengestellt. Das mittlere Alter lag bei 66 Jahren: es gab jeweils 57 Patienten für die Gruppe ≤ 66 Jahre und ≥ 67 Jahre. In der Altersverteilung ergaben sich hinsichtlich der Anfärbung mit *SOX2* keine signifikanten Unterschiede ($p=0,646$; Tab. 3.2.3E).

Im Zusammenhang mit β -Catenin konnte man ebenfalls keine Korrelation in der Altersverteilung feststellen ($p=0,23$; Tab. 3.2.3E).

Verteilung nach Geschlechtern:

Um die Variablen in der Geschlechterverteilung unabhängig zu halten, wurden die matched pairs nach Geschlechtern zusammengestellt. Das Kollektiv besteht aus 58 Männer und 56 Frauen. Zwischen den beiden Geschlechtern konnte man keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die *SOX2*-Expression erkennen ($p=0,20$; Tab. 3.2.3E).

Zwischen den beiden Geschlechtern konnte man ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Ergebnisse mit β -Catenin feststellen ($p=0,29$; Tab. 3.2.3E).

	<i>SOX2</i>				<i>β-Catenin</i> (Zellkern)		
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	p	Hoch (%)	Niedrig (%)	p
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)		38 (33.3)	76 (66.7)	
Alter (Mittelwert 66.5 Jahre)							
≤66	57 (50)	11 (9.6)	46 (40.4)	0.646	22 (19.3)	35 (30.7)	0.23
≥67	57 (50)	13 (11.4)	44 (38.6)		16 (14.0)	41 (36.0)	
Geschlecht							
Männlich	58 (50.9)	15 (13.2)	43 (37.7)	0.20	22 (19.3)	36 (31.6)	0.29
Weiblich	56 (49.1)	9 (7.9)	47 (41.2)		16 (14.0)	40 (35.1)	

Tabelle 3.2.3E: statistische Auswertung von *SOX2* und *β-catenin* nach Alter und Geschlecht

Tumorstadien:

Zunächst wurde geprüft, ob zwischen den Tumorstadien und der *SOX2*- sowie *β-Catenin* Expression ein Zusammenhang besteht, basierend auf Annahme, dass diese im Verlauf von T1 nach T4 prozentual und in der Farbintensität zunimmt. In der Tumorstadieneinteilung T1 bis T4 nach UICC wurde keine *SOX2*-Anfärbung bei den Tumorstadien T1 und T2 nachgewiesen (Tab. 3.2.3F). Betrachtet man alleine die Teilmenge mit hohem Anteil an *SOX2* färbten sich die Tumoren des Stadium T3 mit 87,5% (n=21) und die Tumoren des Stadiums T4 mit 12,5% (n=3) an (Gesamtmenge in Tab. 3.2.3F). Allerdings waren diese Unterschiede in Bezug auf die Anfärbung mit *SOX2* in der Tumorstadieneinteilung nach UICC nicht signifikant (Tab. 3.2.3F).

Betrachtung der Teilmenge mit hohem Anteil an *β-Catenin*:

Bei Tumoren des Stadiums T1 mit 3% (n=1) und Tumoren des Stadiums T2 mit 5% (n=2) war *β-Catenin* in den Zellkernen kaum nachweisbar (Tab. 3.2.1F), im Gegensatz zu den Tumoren des Stadiums T3 mit einem positiven *β-Catenin* Nachweis von 82% (n=31) und den Tumoren des Stadiums T4 mit 10% (n=4) (Tab.3.2.1F). In der Tumorstadieneinteilung T1 bis T4 nach UICC kann jedoch keine Korrelation in Bezug auf *β-Catenin* gezeigt werden (Gesamtmenge in Tab. 3.2.1F). Als Resultat musste festgestellt werden, dass weder *SOX2* noch *β-Catenin* in Bezug auf die Tumorstadien „Hoch“ noch „Niedrig“ ein signifikantes Ergebnis erreichten.

	<i>SOX2</i>				<i>β-Catenin</i> (Zellkern)		
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	p	Hoch (%)	Niedrig (%)	p
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)		38 (33.3)	76 (66.7)	
Tumorstadien (UICC)							
T1	2 (1.8)	0 (0)	2 (1.8)	0.280	1 (0.9)	1 (0.9)	0.607
T2	10 (8.8)	0 (0)	10 (8.8)		2 (1.8)	8 (7.0)	
T3	86 (75.4)	21 (18.4)	65 (57.0)		31 (27.2)	55 (48.2)	
T4	16 (14)	3 (2.6)	13 (11.4)		4 (3.5)	12 (10.5)	

Tabelle 3.2.3F: statistische Auswertung der *SOX2*- und *β-Catenin* Anfärbung, Tumoreinteilung

Tumorgraduierung:

Für die Frage der Tumormalignität anhand der Zelldifferenzierung war zu überprüfen, ob *SOX2* und *β-Catenin* signifikante Hinweise geben, daher wurden die Färbungen diesbezüglich untersucht.

Die einzelnen Werte nach der Tumorgraduierung bei Betrachtung der Teilmenge mit hohem Anteil an *SOX2*: Bei der Differenzierung G1 konnte kein *SOX2* nachgewiesen werden, jedoch war der *SOX2*-Nachweis positiv bei der Differenzierung G2 mit 29,2% (n=7), bei der Differenzierung G3 mit 62,5% (n=15) und bei der Differenzierung G4 mit 8,3% (n=2) (Gesamtmenge in Tab. 3.2.3G). Bei der Tumorgraduierung G2 bis G4 nach WHO (keine Anfärbung bei G1) konnte für die Tumoren mit *SOX2* Vorkommen ein mäßig signifikanter Unterschied mit p=0,043 festgestellt werden (Tab. 3.2.3G).

	<i>SOX2</i>			
Eigenschaften	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	p
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)	
Tumorgraduierung (WHO)				
G2	44 (38.6)	7 (6.1)	37 (32.5)	0.043
G3	66 (57.9)	15 (13.2)	51 (44.7)	
G4	4 (3.5)	2 (1.8)	2 (1.8)	

Tabelle 3.2.3G: statistische Auswertung von *SOX2*, Graduierung

Die einzelnen Werte nach der Tumorgraduierung bei alleiniger Betrachtung der Teilmenge mit hohem Anteil an *β-Catenin*:

Für *β-Catenin* stellte sich die Differenzierung G1 mit 0%, die Differenzierung bei G2 mit 42% (n=16), die Differenzierung bei G3 mit 55% (n=21), und die Differenzierung bei G4 mit

3% (n=1), dar. Es bestand für β -Catenin keine Korrelation bei der Tumorgraduierung G2 bis G4 nach WHO (keine Anfärbung bei G1) (p= 0,567; Gesamtmenge in Tab. 3.2.3H).

	β -Catenin (Zellkern)			p
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	
Patienten gesamt	114 (100)	38 (33.3)	76 (66.7)	
Tumorgraduierung (WHO)				
G2	44 (38.6)	16 (14.0)	28 (24.6)	0.567
G3	66 (57.9)	21 (18.4)	45 (39.5)	
G4	4 (3.5)	1 (0.9)	3 (2.6)	

Tabelle 3.2.3H: statistische Auswertung von β -Catenin, Graduierung

Das Resultat zeigte ein signifikantes Ergebnis für *SOX2* in Bezug auf die Tumorgraduierung, dies konnte jedoch nicht für β -Catenin bestätigt werden.

3.2.4 Darstellung von *SOX2* und β -Catenin-Expression in ihrer Korrelation zueinander

Für die Abschätzung der Malignität ist die Frage der Stärke der *SOX2* und β -Catenin Expression und der Korrelation untereinander zu prüfen. In dem Proteindarstellungsprofil mit hoher *SOX2*-Expression und mit hoher β -Catenin-Expression zeigte sich bei allen in der Fallgruppe (N+) mit dem positiven Lymphknotenstatus eine Übereinstimmung zu 100% (n=8). Es ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher *SOX2*- und hoher β -Catenin Expression (p=0,02; Tab. 3.2.4A).

In der Fallgruppe (M1) konnten unter alleiniger Betrachtung der Teilmenge mit hoher *SOX2* und hoher β -Catenin Expression zu 87,5% (n=7) Lebermetastasen nachgewiesen werden. Es bestand eine hoch signifikante Korrelation bei hoher *SOX2* und hoher β -Catenin Expression bei Fernmetastasen (p=0,001; Gesamtmenge Tab. 3.2.4A). Es bestätigte sich, dass bei Vorliegen von *SOX2* und β -Catenin man von einer hohen Tumormalignität ausgehen muss.

	Lymphknotenstatus		p	Fernmetastasen		p
	N0	N+		M0	M1	
SOX2 und β-Catenin niedrig	32 (28.1)	28 (24.6)	0.02	40 (35.1)	20 (17.5)	0.001
SOX2 niedrig und β-Catenin hoch	15 (13.2)	15 (13.2)		10 (8.8)	20 (17.5)	
SOX2 hoch und β-Catenin niedrig	5 (4.4)	11 (9.6)		6 (5.3)	10 (8.8)	
SOX2 und β-Catenin hoch	0 (0)	8 (7.0)		1 (0.9)	7 (6.1)	

Tabelle 3.2.4A: Korrelation der verschiedenen Kombinationen von *SOX2* mit β -Catenin [58]

In den Kombinationen von *SOX2* und β -Catenin konnten ansonsten keine Korrelationen nachgewiesen werden, die Verteilung zwischen der Fall- und Kontrollgruppe ist relativ ausgeglichen (Tab. 3.2.4A).

Grundsätzlich wurde die Anfärbung von β -Catenin in der Kategorie „Niedrig“ zusammengefasst mit 0 = keine Anfärbung und 1 = schwache Anfärbung (bis 30%); ferner wurde mit „Hoch“ die Kategorie 2 = deutliche Anfärbung (30-60%) und Kategorie 3 = starke Anfärbung (>60%) bezeichnet. Im genauen Vergleich zwischen den verschiedenen Kategorien von *SOX2* und β -Catenin konnte keine signifikante Korrelation erhoben werden (Tab.3.2.4B)

	SOX2		p
	Hoch (%)	Niedrig (%)	
β-Catenin (Zellkern)			
Kategorie 0	6 (5.3)	29 (25.4)	0.897
Kategorie 1	10 (8.8)	31 (27.2)	
Kategorie 2	5 (4.4)	19 (16.7)	
Kategorie 3	3 (2.6)	11 (9.6)	
niedrig (0 + 1)	16 (14.0)	60 (52.6)	1.0
hoch (2 + 3)	8 (7.0)	30 (26.3)	

Tabelle 3.2.4B: Korrelation von *SOX2* und β -Catenin-Expression

3.3 Ergebnisse tabellarisch in der Gesamtübersicht

Eigenschaften	SOX 2				β-Catenin (Zellkern)		
	Total (%)	Hoch (%)	Niedrig (%)	p	Hoch (%)	Niedrig (%)	p
Patienten gesamt	114 (100)	24 (21.1)	90 (78.9)		38 (33.3)	76 (66.7)	
Age (median. 66.5) years							
≤66	57 (50)	11 (9.6)	46 (40.4)	0.646	22 (19.3)	35 (30.7)	0.23
≥67	57 (50)	13 (11.4)	44 (38.6)		16 (14.0)	41 (36.0)	
Geschlecht							
Männlich	58 (50.9)	15 (13.2)	43 (37.7)	0.20	22 (19.3)	36 (31.6)	0.29
Weiblich	56 (49.1)	9 (7.9)	47 (41.2)		16 (14.0)	40 (35.1)	
Tumoreinteilung (UICC)							
T1	2 (1.8)	0 (0)	2 (1.8)	0.280	1 (0.9)	1 (0.9)	0.607
T2	10 (8.8)	0 (0)	10 (8.8)		2 (1.8)	8 (7.0)	
T3	86 (75.4)	21 (18.4)	65 (57.0)		31 (27.2)	55 (48.2)	
T4	16 (14)	3 (2.6)	13 (11.4)		4 (3.5)	12 (10.5)	
Lymphknotenstatus							
N0	52 (45.6)	5 (4.4)	47 (41.2)	0.006	15 (13.2)	37 (32.5)	0.35
N+	62 (54.4)	19 (16.7)	43 (37.7)		23 (20.2)	39 (34.2)	
Metastasen (Leber)							
M0	57 (50)	7 (6.1)	50 (43.9)	0.022	11 (9.6)	46 (40.4)	0.001
M1	57 (50)	17 (14.9)	40 (35.1)		27 (23.7)	30 (26.3)	
Tumorgrading (WHO)							
G2	44 (38.6)	7 (6.1)	37 (32.5)	0.043	16 (14.0)	28 (24.6)	0.567
G3	66 (57.9)	15 (13.2)	51 (44.7)		21 (18.4)	45 (39.5)	
G4	4 (3.5)	2 (1.8)	2 (1.8)		1 (0.9)	3 (2.6)	

Tabelle 3.3A: Gesamtübersicht der erhobenen Daten in der Fall-Kontroll-Studie [58]

	Lymphknotenstatus		p	Fernmetastasen		p
	N0	N+		M0	M1	
SOX2 und β-Catenin niedrig	32 (28.1)	28 (24.6)	0.02	40 (35.1)	20 (17.5)	0.001
SOX2 niedrig und β-Catenin hoch	15 (13.2)	15 (13.2)		10 (8.8)	20 (17.5)	
SOX2 hoch und β-Catenin niedrig	5 (4.4)	11 (9.6)		6 (5.3)	10 (8.8)	
SOX2 und β-Catenin hoch	0 (0)	8 (7.0)		1 (0.9)	7 (6.1)	

Tabelle 3.3B: Korrelation der verschiedenen Kombinationen von *SOX2* mit β -catenin [58]

	<i>SOX2</i>		p
	Hoch (%)	Niedrig (%)	
β-Catenin (Zellkern)			
Kategorie 0	6 (5.3)	29 (25.4)	0.897
Kategorie 1	10 (8.8)	31 (27.2)	
Kategorie 2	5 (4.4)	19 (16.7)	
Kategorie 3	3 (2.6)	11 (9.6)	
Niedrig (0 + 1)	16 (14.0)	60 (52.6)	1.0
Hoch (2 + 3)	8 (7.0)	30 (26.3)	

Tabelle 3.3C: Korrelation von *SOX2* und β -Catenin-Expression [58]

4 Diskussion

In dieser zweiarbig angelegten Fall- Kontroll Studie mit dem Kollektiv (M0/M1) sollte die Relevanz von *SOX2* und *β-Catenin* in Kolonkarzinomen untersucht werden. Um für die Prognose der Malignität und die adäquate Therapie Anhaltspunkte für das weitere Vorgehen in Bezug auf adjuvante Chemotherapie zu geben, sollten verschiedene in der Literatur bereits diskutierte Tumorstammzellmarker in ihrer Relevanz zu Metastasierungen geprüft werden.

Die Stammzelleneigenschaft wird durch das Vorliegen des Transkriptionsfaktor *SOX2* definiert, daher ist dieser Faktor von besonderer Wichtigkeit. Man findet ihn in den embryonalen Stammzellen, allgemein während der embryonalen Entwicklung, in den Keimzellen und in den Blastozysten. *SOX2* wurde auch in embryonalen Karzinomen, Mammakarzinomen, Oesophaguskarzinomen, Siegelringzell- und muzinösen Adenokarzinomen des Kolon und Analkarzinomen nachgewiesen.[48,49,50,57]

Dieser Zusammenhang zwischen den Vorkommen von *SOX2* in embryonalen Stammzellen und in Karzinomen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die sich mit *SOX2* anfärbenden Zellen embryonale Tumorstammzellen sind.

In der Untersuchung konnte bei 21,1% der rechtsseitigen Kolonkarzinome *SOX2* im Zellkern nachgewiesen werden, denn *SOX2* wurde als Transkriptionsfaktor gebildet und durch Anfärbung bestätigt. *SOX2* ist in der normalen Darmschleimhaut nicht vorhanden, entsprechend konnte in den basalen Krypten des normalen Kolons (83 Fälle) eine Färbung von *SOX2* nur bei 4,8 % der Fälle dargestellt werden. Daher ist das Auftreten von *SOX2* im Kolonkarzinom ein wichtiger Hinweis darauf, dass Tumorstammzellen vorhanden sind.

Diese Befunde in Bezug auf die basalen Krypten unterstreicht ihre Eigenschaft als adulte Stammzellen. [32,35,36]

Es ist festzuhalten, dass eine Anfärbung keine Aussage erlaubt, ob es sich um eine Tumorstammzelle oder eine adulte Stammzelle handelt. Erst wenn sich die Färbung von *SOX2* in deutlich größerem Umfang als nur in der Tiefe der Darmkrypte darstellt, ist der unmittelbare Verdacht auf Tumorstammzellen gegeben. Der direkte Zusammenhang zwischen der Stammzellnische in den basalen Krypten des normalen Kolons und den Tumorstammzellen in der Invasionsfront des Karzinoms ist somit durch *SOX2* nachzuweisen.

In einer Studie zu Oesophaguskarzinomen und zu Analkarzinomen im Vergleich zu Adenokarzinomen konnte keine Korrelation bei der Tumordifferenzierung festgestellt

werden.[49] Dagegen konnte in der vorliegenden Studie eine Korrelation von *SOX2* mit dem Tumorgrading ($p=0,043$) dargestellt werden; ähnliche Ergebnisse sind erhoben worden. [50,59,60]

Wenig differenzierte Tumore besitzen generell eine schlechte klinische Prognose [45], so konnte auch in dieser Studie nachgewiesen werden, dass *SOX2* - ein wichtiger Transkriptionsfaktor embryonaler Stammzellen - sich im Falle von rechtsseitigen Kolonkarzinomen hoch signifikant ($p=0,006$) bei positiven Lymphknotenmetastasen nachweisen lässt und signifikant ($p=0,022$) bei Lebermetastasen. Es zeigt sich also eine enge Korrelation von *SOX2* Vorkommen im rechtsseitigen Kolonkarzinom mit hoher Malignität; diese wichtigen Ergebnisse dieser Studie finden eine Bestätigung in anderen Veröffentlichungen. [45,59]

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob *SOX2* und *β -Catenin* sich ähnlich verhalten wie der bekannte Tumorstammzellmarker CD 133 [60,61,58,62], der sich immunhistochemisch und in situ in den basalen Krypten und an der Invasionsfront im Gegensatz zu *SOX2* gut nachweisen lässt.

Der Transkriptionsfaktor *SOX2* ist ein Tumorstammzellmarker, man kann ihn als Marker für eine höhere Malignität bei Kolonkarzinomen bezeichnen. [57,59] Dies hat insofern Bedeutung in Hinblick auf die Prognose der Malignität, da bei kolorektalen Karzinomen mit Metastasen (Stadium IV nach UICC) die 5 Jahres-Überlebens-Rate bei weniger als 3% liegt. [56]

Bei der Überprüfung der Tumore nach der Einteilung T1 und T2 ist in der vorliegenden Arbeit *SOX2* nicht nachweisbar, aber bei den T3 Tumoren mit 18,4% und bei den T4 Tumoren mit 2,6%. Gerade der Übergang der Kolonkarzinomentwicklung von Stadium II zur Lymphknoten-metastasierung und weiter im Verlauf zu Stadium IV mit Fernmetastasen ist bedeutend, leider ist diesbezüglich keine Aussage über die verschiedenen Tumoreinteilungen möglich, da das *SOX2* Ergebnis nicht signifikant ist ($p=0,28$). Andererseits ist aber interessant, dass für die Tumorgraduierung ($p=0,043$) ein signifikantes Ergebnis für *SOX2* erhoben wurde.

Wegen der Bedeutung von Tumorstammzellmarkern wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls wurde die Korrelation von *SOX2* und *β -Catenin* untersucht. Es wird angenommen, dass es *SOX2* ebenfalls ein Tumorstammzellmarker ist.

In 33,3% der Fälle beim rechtsseitigen Kolonkarzinom konnte in vorliegender Studie β -Catenin im Zellkern nachgewiesen werden.

In dieser Studie konnte eine signifikante Korrelation in vitro von *SOX2* und β -Catenin gezeigt werden. In einer Vergleichsstudie zwischen β -Catenin und CD133 konnte zwischen β -Catenin und CD133 trotz der Signifikanz auf Malignität keine Korrelation festgestellt werden. [62]

In der vorliegenden Studie konnte ein signifikantes Ergebnis erhoben werden (Tab 3.2A), dass *SOX2* und β -Catenin prognostische Marker für hohe Malignität darstellen. Eine wichtige Erkenntnis ist dabei der Zusammenhang von *SOX2* und β -Catenin Vorkommen bei Lymphknotenmetastasen ($p=0,02$) und bei Lebermetastasen ($p=0,001$). Allerdings konnte keine direkte Korrelation zwischen *SOX2* und β -Catenin immunhistochemisch dargestellt werden ($p=1,0$).

Besonders hochsignifikant waren die erhobenen Werte von β -Catenin ($p=0,001$) beim Vorkommen von Fernmetastasen. [62]

5 Konklusion

Auf Grund der hohen Bedeutung und der Zunahme an Kolonkarzinomen ist die Untersuchung auf aussagekräftige Tumorstammzellmarker von besonderer prognostischer Wichtigkeit. Durch die zahlreichen Untersuchungen an den immunhistochemischen Präparaten konnte festgestellt werden, dass *SOX2* ein relevanter Marker mit hoher signifikanter Korrelation zu Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen bei rechtsseitigen Kolonkarzinomen ist.

Ebenfalls hat β -Catenin eine hohe Signifikanz für Fernmetastasen bei rechtsseitigen Kolonkarzinomen. Eine gemeinsame hohe Korrelation von *SOX2* und β -Catenin trifft für Lebermetastasierung von rechtsseitigen Kolonkarzinomen sogar zu 100% zu.

6 ABSTRACT

***SOX2* correlates with metastases in rightsided colon cancer**

The evidence of *SOX2* and β -*catenin* in the cell core of colorectal cancer and its distant spread is of high scientific relevance, especially for the prognosis of tumor malignity.

β -*catenin* is a central transcription factor of the canonical Wnt/ β -*catenin* pathway. The results showed a high expression of β -*catenin* in the cell cores of rightsided colon cancer. The reason for the accumulation of β -*catenin* in the cell core is due to a dysregulation of the canonical Wnt/ β -*catenin* signal pathway, which is caused by a high percentage (85%) loss of the tumorsuppressor gene adenomatous polyposis coli (APC).

The aim in this study design was to examine the hypothesis, if the expression of *SOX2* in context of the migrating cancer stem cell concept would give the prove of correlation and also if the relation of β -*catenin* and *SOX2* expression in rightsided colon cancer would show significant results.

Material: A case-control-study with 114 patients with rightsided colon cancer (57 patients with distant spread group M1 and 57 patients without distant spread group M0) was designed in close collaboration with the Munich Cancer Registration Center.

Methods:

In a first step the 114 tumor paraffin-blocks were treated with preparing procedures to generate serial sections of 5 μ m thickness.

Immunohistochemical stainings with *SOX2* specific rabbit monoclonal antibody and with anti- β -*catenin* mouse monoclonal antibody were produced according to protocols; the score was developed and applied for the collection independently by two observers.

Results: In the study I was able to show, that the expression of *SOX2* correlates significantly with lymph-node and liver metastases. Also the expression of β -*catenin* correlates significantly with lymph-node and liver metastases. In the cases of high expression of *SOX2* and β -*catenin* found in the rightsided colon cancer there was even a 100% significant correlation with metastases.

Conclusion: *SOX2* and also the combination of *SOX2* and β -*catenin* are relevant markers for a significant correlation of lymph-node metastases and distant spread in rightsided colon cancer. Therefore there is a high diagnostic value of these tumor markers for the prognosis of the malignity of this disease.

7 Zusammenfassung

SOX2 korreliert mit Metastasierung beim rechtsseitigen Kolonkarzinom

Hintergrund: Das kolorektale Karzinom ist neben den Hämoblastosen eines der am besten untersuchten Tumoren, vor allem in seiner Tumorgenese. Trotz aller Forschungen steht das kolorektale Karzinom weltweit auf dem zweiten Platz der krebsassoziierten Mortalität mit weiter steigender Inzidenz, sodass die Mechanismen seiner Karzinogenese nicht ausreichend verstanden zu sein scheinen. So liefert das *Multistep Carcinogenese* Modell keine ausreichende Erklärungen, vor allem wie es zur Heterogenität in Tumoren oder zur Metastasierung kommt. Eine Erweiterung des Modells der Karzinogenese erfolgte durch das *Migrating Cancer* Konzept, das neben den aus dem *Multistep Carcinogenesis* Modell bekannten tumorgenetischen Mutation in den Tumorsuppressorgenen APC, TP53 und DCC sowie dem Onkogen KRAS regulatorische Plastizität einführte. Dadurch lässt sich zum einen die in Tumoren bekannte Heterogenität erklären wie auch die *hallmarks of cancer* (EMT, Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese). In kolorektalen Karzinomen spielt das Onkogene β -Catenin eine zentrale Rolle. Durch Mutationen im APC-Gen, die sich in der Majorität der kolorektalen Karzinome finden, wird in der Folge der kanonische β -Catenin/*Wnt*-Signalweg dereguliert. Durch seine subzelluläre Lokalisation bestimmt β -Catenin den Phänotyp (Membran: epithelial; Nucleus: mesenchymal) der Tumorzellen wie auch den funktionellen Zustand durch damit verbundene transkriptionelle Änderungen, da β -Catenin im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt. Auf diese Weise bestimmt β -Catenin die Eigenschaften: *Cancer stemness*, EMT, Chemoresistenz und Metastasierung. Die Regulation der subzellulären Lokalisation von β -Catenin wird dabei durch Signale aus dem Stroma reguliert. Jedoch lassen sich nicht alle Eigenschaften der Tumorstammzellen (*cancer stemness*) durch dereguliertes β -Catenin erklären. Interessanterweise wurde in verschiedenen Tumoren die Expression von Markern embryonaler Stammzellen (KLF4, MYC, nanog, SOX2) beschrieben, sodass angenommen werden konnte, dass kolorektale Tumorstammzellen neben den durch β -Catenin vermittelten Eigenschaften adulter Stammzellen zusätzlich durch Eigenschaften embryonaler Stammzellen gekennzeichnet sind. Das in kolorektalen Karzinomen die Expression von SOX2 beschrieben wurde, sollte in dieser Studie auf morphologischer Basis dieser Zusammenhang getestet werden. Dazu wurde ein Kollektiv humaner kolorektaler Karzinome eingesetzt, das sich hinsichtlich der Fernmetastasierung (M0/ M1) unterschied, um auf diese Weise gleichzeitig eine mögliche funktionelle Bedeutung

von SOX2 in der kolorektalen Karzinogenese untersuchen zu können. Interessant ist dabei auch, dass *SOX2* wie nukleäres β -Catenin ein Transkriptionsfaktor ist.

Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ❶ welche Überlappung die Expressionsmuster von β -Catenin und SOX2 haben und ❷ die Hypothese untersucht, dass die kombinierte Expression von β -Catenin und SOX2 mit Fernmetastasierung korreliert, um so dem Aspekt der embryonalen *cancer stemness* eine wichtige Rolle in der kolorektalen Tumorgenese zuordnen zu können.

Material: In Zusammenarbeit mit dem Tumorzentrum München wurde ein Kollektiv rechtsseitiger Kolonkarzinom in Form einer Fall-Kontroll-Studie (*matched pair collection*) erstellt. Das Gesamtkollektiv bestand aus 114 Patienten mit diagnostiziertem rechtsseitigen Kolonkarzinom. Die 57 Patienten der Fallgruppe (M1) entwickelten Lymphknoten- oder Lebermetastasen, dagegen entstanden bei der Kontrollgruppe (M0) von ebenfalls 57 Patienten im 5-Jahres-Beobachtungszeitraum keine Metastasen.

Methoden: Die Untersuchung erfolgte an histologischen Serienschnitten, an denen immunhistochemisch die Expression von β -Catenin und SOX2 untersucht wurde. Die Auswertung erfolgte unabhängig durch zwei Personen, um die naturgemäß subjektive Auswerteform zu objektivieren.

Ergebnisse: Es zeigte sich, dass die *SOX2* Expression signifikant mit Lymphknoten- und Lebermetastasen korrelierte, was für die β -Catenin Expression bestätigt werden konnte. In der Kombination, also kombinierte Expression von β -Catenin und SOX2 bestand sogar eine völlige Korrelation zwischen Metastasierung und einer hoher Expression der beiden Faktoren und Fernmetastasierung.

Schlussfolgerung: Neben Eigenschaften adulter Stammzelligkeit (*adult cancer stemness*) scheinen auch Eigenschaften embryonaler Stammzelligkeit (*embryonic stemness*) eine bedeutende Rolle in der kolorektalen Karzinogenese zu spielen. Diese Erkenntnis hat zwei Aspekte. ❶ Zunächst kann die kombinierte Expression von β -Catenin und SOX2 einen hohen prädiktiven Wert für die Entwicklung von Fernmetastasen haben. Dies müsste nun in einem Kollektiv kolorektaler Karzinome im Stadium UICC II/ III untersucht werden, indem die Expression der beiden Faktoren mit dem Gesamtüberleben korreliert wird. Dadurch würde sich klinisch die Entwicklung von Fernmetastasierung vorhersagen lassen. ❷ Biologisch würde die zusätzliche Expression von SOX2 im Vergleich zu adulten Stammzellen einen möglichen Angriffspunkt für therapeutische Interventionen liefern, insbes. wenn SOX2 für die zelluläre Plastizität der kolorektalen Tumorzellen verantwortlich wäre, die einen Hauptantrieb (*driver*) für das maligne Potential von kolorektalen Tumoren bzw. Tumorzellen

hat. Dieser Zusammenhang müsste nun in weiteren funktionellen Studien in experimentellen Modellen, wie Zellkultur untersucht werden.

Schlüsselwörter: *SOX2*, *β-catenin*, Kolonkarzinom, Lymphknotenmetastasen, Lebermetastasen

8 Anhang

	T- Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (Intraepithelial oder Infiltrationen in die Lamina propia)
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das nichtperitonealisierte perikolische Fett
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe und/oder perforiert das viszerale Peritoneum (schliesst auch erneute Infiltration anderer Segmente des Colorektums über die Serosa ein)
T4a	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

Tabelle 1.2A: TNM Klassifikation des kolorektalen Karzinoms [13,14]

	N- regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N1a	1 Lymphknoten befallen
N1b	2-3 Lymphknoten befallen
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht peritonealisierten perikolischen bzw. perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	4- 6 Lymphknoten befallen
N2b	7 oder mehr Lymphknoten befallen

Tab. 1.2B: TNM- Klassifikation des kolorektalen Karzinoms in Bezug auf regionäre Lymphknoten [13,14]

	M- Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in einem Organ (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
M1b	Fernmetastasen in mehreren Organen oder im Peritoneum

Tab. 1.2C: TNM- Klassifikation des kolorektalen Karzinom in Bezug auf Fernmetastasen [13,14]

	G- Grading
G1	Gut differenzierte bösartiges Gewebe („low grade“), hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe
G2	Mäßig differenziertes bösartiges Gewebe
G3	Schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe
G4	Nicht differenziertes bösartiges Gewebe („high grade“), (undifferenziert bzw. anaplastisch) keine immunohistologische Zuordnung des Ausgangsgewebe möglich

Tabelle 1.2D: TNM- Klassifikation des kolorektalen Karzinom in Bezug auf Graduierung [13,14]

9 Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt Deutschland, website: <https://www.destatis.de/>
- [2] Häufige Todesursachen Todesursachenstatistik
www.gbe-bund.de/stichworte/Todesursachenstatistik.html
- [3] Krebs in Deutschland 2009/2010 Zentrum für Krebsregisterdaten GEKID und Robert Koch Institut Gesundheitsberichtserstattung des Bundes 9. Auflage (2013)
- [4] Krebs in Deutschland 2007/2008 Zentrum für Krebsregisterdaten GEKID und Robert Koch Institut Gesundheitsberichtserstattung des Bundes 8. Auflage (2012)
- [5] Verbreitung von Krebskrankheiten in Deutschland Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010 Zentrum für Krebsregisterdaten GEKID und Robert Koch Institut Gesundheitsberichtserstattung des Bundes 7. Auflage (2010)
- [6] WHO Latest World Cancer statistics Global Cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancer must be addressed World Health Organization Press release N°223 12.Dezember 2013
- [7] Global Cancer facts & figures (2012)
- [8] Global Cancer facts & figures 2nd edition (2011)
- [9] S-3-Leitlinie “kolorektales Karzinom”
- [10] Clevers H.: Wnt/ β -catenin Signaling in Development and Disease *Cell* **127**,469-480 (2006)
- [11] Schneikert. J, Behrens J.: The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development *Gut* **56**, 417-425 (2007)
- [12] Riede U-N., Werner M., Schaefer H-E.: Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Komplet überarbeitet Auflage p. 721-726 Georg Thieme Verlag Stuttgart (2004)
- [13] Weitz J., Schalhorn A., Kadmon M., Krempien R., Büchler M.W. Kolon- und Rektumkarzinom, *Die Onkologie*, p 848-897, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2010)
- [14] Fearon E.R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer *Annu.Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011 **6**:479-507
- [15] Schalhorn A., Kolligs F.: Kolonkarzinom, *Manual Gastrointestinale Tumoren 2006*, Tumorzentrum München Zuckerschwerdtverlag (2006)
- [16] APC adenomatous polyposis coli Homo sapiens Gene ID:324 Updated 26.07.2015 NCBI
- [17] Jasperson K.W., Burt M.S., Burt W.R. APC-Associated Polyposis Conditions Gene Reviews Update March 27 (2014)
- [18] Jones S., Chen W., Parmigiani G., Diehl F., Beerenwinkel N., Antal T., Traulsen A., Nowak M.A., Siegel C., Velculescu V.E., Kinzler K.W. Vogelstein B., Willis J., Markowitz S.D. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution *PNAS*, Vol.**105**, No. 11, 4283-4288 (2008)
- [19] Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for Colorectal Tumorigenesis *Cell* **61**, 759-767 (1990)
- [20] Schneikert. J, Behrens J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development *Gut* **56**, 417-425 (2007)

-
- [21] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Übersetzung von Schäfer U.: *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Auflage WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1114-1116, 1289-1291, 1317-1331, 1347-1351, 1404-1412 (2008)
- [22] Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* **144**, 646-674 (2011)
- [23] Eriksson J.E., Dechat T., Grin B., Helfand B., Mendez M., Pallari H-M., Goldman R.D.: Introducing intermediate filaments: from discovery to disease *The Journal of Clinical Investigation* Volume **119** Nb. 7 1763-1769 (2009)
- [24] Jung, A., Schrauder M., Oswald U., Knoll C., Sellberg P., Palmqvist R., Niedobitek G., Brabletz T., Kirchner T.: The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D(1), and p16(INK4A) and is a region of low proliferation. *Am J Pathol* **159**: 1613–1617. (2001)
- [25] Ogawa T., Tsubota Y., Hashimoto Y., Karyia Y., Miyazaki K. The short arm of Laminin γ 2 Chain of Laminin 5(Laminin-332) Binds Syndecan-1 and Regulates Cellular Adhesion and Migration by Suppressing Phosphorylation of Integrin α 4 Chain *Molecular Biology of the Cell* Vol.**18**, 1621-1633 (2007)
- [26] Tucker R., Chiquet-Ehrismann R. The regulation of tenascin expression by tissue microenvironments *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 888–892 (2009)
- [27] Midwood K.S., Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 287–310 (2009)
- [28] Brabletz T., Hlubek F., Spaderna S., Spaderna S., Schmalhofer O., Hiendlmeyer E., Jung A., Kirchner T. Invasion und Metastasis in Colorectal Cancer: Epithel.Mesenchymal Transition, Mesenchymal- Epithelial Transition, Stem Cells and β -Catenin Cells *Tissues Organs* **179**: 56–65 (2005) DOI: 10.1159/000084509
- [29] Moreau M., Mourah S., Dosquet C.: β -Catenin and NF- κ B cooperate to regulate the uPA/uPAR system in cancer cells *International Journal of Cancer* Vol.**128** Issue 6 1280-1292 (2011) DOI 10.1002/ijc.25455
- [30] Moon R.T., Kohn A. D., De Ferrari G.V., Kaykas A.: Wnt and beta-signaling: diseases and therapies *Nature Reviews Genetics* **5**, 691-701 (2004)
- [31] Scheel S.K.: β -catenin in der kolorektalen Karzinogenese Dissertation LMU München (2010)
- [32] Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T.: Migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumor progression. *Nature Rev Cancer* **5**, 744-749 (2005).
- [33] Beier H.M., Fehse B., Friedrich B., Götz M., Hansmann I., Hucho F., Köchy K, Müller-Röber B., Rheinberger H.-J., Reich J., Ropers H.-H., Schöler H.R., Schöne-Seifert S., Sperling K., Tanner K., Taupitz J., Wobus A.M.: Neue Wege der Stammzellforschung Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen; Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina (2009)
- [34] Barlett P.F.: Pluripotential hemopoietic stem cells in adult mouse brain *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2722-2725 (1982)
- [35] Ricci-Vitiani L., Pagliuca A., Palio E., Zeuner A. De Maria R. Colon cancer stem cells. *Gut* **57**, 538- 548 (2008).

-
- [36] Barker N., Ridgway R.A., van ES J.H., van de Wetering M., Begthel H., van den born M., Danenberg E. Clarke A.R., Sansom O.J. Clever H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer *Nature* Vol **457** (29.January 2009)
DOI:10.1038/nature07602
- [37] Van der Horst G., Bos L., van der Pluijm Epithelial Plasticity, Cancer Stem Cells, and the Tumor-Supportive Stroma in Bladder Carcinoma *American Molecular Cancer Research* **10** (8), 995-1009, Association for Cancer Research DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0274 (2012)
- [38] Fodde R.,Smits R., Clevers H. APC signal transduction and genetic instability in colorectal cancer *Nature Review Cancer* **1** (1):55-67 (2001)
- [39] Brabletz T.,Hlubek F., Spaderna S., Schmalhofer O., Hiendlmeyer E., Jung A., Kirchner T. Invasion and Metastasis in Colorectal Cancer: Epithelial-Mesenchymal Transition, Mesenchymal-Epithelial Transition, Stem Cells and β -Catenin *Cells Tissues Organs*; **179**: 56-65 (2005) DOI: 10.1159/000084509
- [40] O'Connor R.: The Pharmacology of Cancer Resistance *Anticancer Research* **27**: 1267-1272 (2007)
- [41] Vermeulen, L., de Sousa e Melo, F., Richel, D. J. & Medema, J. P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol.* **13**, e83–89 (2012).
- [42] Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* **210**, 2851–2872 (2013).
- [43] 100. Kreso, A. *et al.* Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* **339**, 543–548 (2013).
- [44] Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843- 850 (2005)
- [45] Ben-Porath I., Thomson M. W., Carey V. J., Ge R., Bell, G.W., Regev A., Weinberg R.A. An embryonic stem cell- like gene expression signature in poorly differentiated aggressiv human tumors. *Nature Genetics* Vol. **4**, No. 5, 499- 507 (2008)
- [46] Brambrink T., Foreman R., Welstead G. G., Lengner C- J., Wernig M., Suh H., Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* **2**, 151- 159 (2008).
- [47] Stevanovic M., Zuffardi O., Collignon J. Lovell-Badge R., Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene *Mammalian Genome* **5**, 640-642 (1994)
- [48] Lefebvre V., Dumitriu, Penzo-Mendes A., Han Y., Pallavi B. Control of Cell Fate and Differentiation by Sry-related High-mobility-group Box (Sox) Transcription Factors *Int J Biochem Cell Biol.* **39** (12): 2195-2214 (2007)
- [49] Long K. B., Hornick J. L. Sox2 is highly expressed in squamosa cell carcinomas of the gastrointestinal tract. *Human Pathology* **40**, 1768- 1773 (2009).
- [50] Schoenhals M., Kassambara A., De Vos J., Hose D., Moreaux J., Klein B. Embryonic stem cell marker expression in cancers. *Biochemical and Research Communications* **383**, 157- 162 (2009).

-
- [51] Fong H., Hohenstein k. A., Donovan P. J. Regulation of Self- Renewal und Pluripotency by SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 1931- 1938 (2008).
- [52] Boer B., Kopp J., Mallanna S., Desler M., Chakravarthy H., Wilder P. J., Bernardt C., Rizzino A. Elevating the levels of SOX2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibis the expression of SOX2: Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Research* Vol. **35**, No. 6, 1773- 1786 (2007).
- [53] Kormish J.D., Sinner D., Zorn A.M. Interactions between SOX factors and Wnt/ β -catenin signaling in development and disease *Dev Dyn.* **239**(1): 56-68 (2010) DOI: 10.1002/dvdy.22046
- [54] SPSS Programm www.spss.de
- [55] WHO, www.who.com
- [56] UICC, www.uicc.org
- [57] Park ET, Gum JR, Kakar S, Kwon SW, Deng G, Kim YS Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int J Cancer*, **122**(6):1253-1260 (2008)
- [58] Neumann J., Bahr F., Horst D., Kriegl L., Engel J., Luque R.M., Gerhard M., Kirchner T., Jung A.: SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer
- [59] Saigussa A., Tanaka K., Toiyama Y., Takeshi Y., Okugawa Y., Ioue Y., Miki C., Kusunoki Correlation of CD133, OCT4 and SOX2 in Rectal Cancer and their Association with Distant Recurrence after Chemoradiotherapy *Ann Surg Oncol* **16**: 3488-3498 DOI 10.1245/s10434-009-0617-z
- [60] Horst D., Kriegel L., Engel J., Jung A., Kirchner T. CD 133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *EJC* **45**, 2034-2040 (2009).
- [61] Horst D., Scheel S. K., Liebmann S., Neumann J., Maatz S., Kichner T., Jung A. The cancer stem cell marker CD 133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J Pathol* **219**, 427-434 (2009).
- [62] Horst D., Kriegel L., Engel J., Jung A., Kirchner T.: CD 133 and nuclear β -catenin: The marker combination to detect high risk cancer cases of low stage colorectal cancer *EJC* **45**, 2034-2040 (2009).

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Fiorina McLeod, erkläre hiermit an Eides statt,
dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Metastasierung beim rechtsseitigen Kolonkarzinom korreliert mit der Expression von SOX2

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

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

München der 12.04. 2017

Fiorina McLeod