

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**LIN28A/B Expression im Dickdarmkarzinom und
Korrelation mit der Fernmetastasierung**

Dissertation

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

vorgelegt von Nicole Max
aus Ingolstadt

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg Schirra

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2021

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema ‚LIN28A/B Expression im Dickdarmkarzinom und Korrelation mit der Fernmetastasierung‘ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die 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 vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.03.2021

Nicole Max

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens H.L. Neumann, für seine hervorragende Unterstützung und Expertise in allen Bereichen meiner Dissertation bedanken. Darüber hinaus bin ich dankbar für seine exzellente Betreuung, insbesondere für schnelle und hilfreiche Ratschläge und seine Geduld während des Forschungsprojekts.

Großer Dank gilt auch meinem Freund, David, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir großen Rückhalt gegeben hat. Außerdem möchte ich mich bei meinem Sohn Teo bedanken, der mir zu jedem Zeitpunkt ein Lachen auf die Lippen gezaubert hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich solange ich denken kann in jeder Hinsicht unterstützt haben und für ihre helfenden Hände in der Enkelbetreuung.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	3
Danksagung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungen und deren Erklärung	6
Legenden der Abbildungen	7
Legenden der Tabellen	8
Zusammenfassung	9
1. Einleitung	11
1.1 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	11
1.2 Pathologie des kolorektalen Karzinoms	12
1.3.1 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	13
1.3 Etablierte Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinoms.....	15
1.4 Metastasierungsmuster	16
1.5 LIN28 als Prognosefaktor.....	19
1.6 Ziele	20
2. Material und Methoden	21
2.1 PatientInnenkollektiv	21
2.2 Immunhistochemie	22
2.3 Beurteilung der Immunhistochemie.....	22
2.4 Statistische Analyse	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Histopathologie	24
3.2 Ergebnisse der LIN28A-Auswertung	25
3.3 Ergebnisse der LIN28B-Auswertung	28
3.4 Korrelation der LIN28A- und LIN28B-Expression mit der synchronen Lebermetastasierung	29
3.5 Korrelation der LIN28A- und LIN28B-Expression mit histo- und molekularpathologischen Parametern	30
4. Diskussion	36
Literaturverzeichnis	43

Abkürzungen und deren Erklärung

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
H&E	Hämatoxylin und Eosin
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
KK	Kolonkarzinom
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
MMRD	Mismatchreparaturdefekt
NOS	Not otherwise specified
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
TNM	Tumour Node Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	Weltgesundheitsorganisation / World Health Organisation

Legenden der Abbildungen

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz. Modifiziert nach Fearon und Vogelstein. (7).....	12
Abbildung 2: Invasions-Metastasen Kaskade. Modifiziert nach Pretzsch et al. (28)	17
Abbildung 3: Tumorlokalisierung	25
Abbildung 4: Übersicht der positiven LIN28A-Expression	26
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von LIN28A und LIN28B im rechtsseitigen Kolonkarzinom bei 100facher Vergrößerung. Kolonkarzinome ohne LIN28A oder LIN28B-Expression (-) bzw. mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) cytoplasmatischer Färbung für LIN28A und LIN28B.	27
Abbildung 6: Übersicht der positiven LIN28B-Expression	28

Legenden der Tabellen

Tabelle 1: Verschiedene T, N und M Kategorien und ihr korrespondierendes prognostisches Stadium (I-IV) für Karzinome im Kolon und Rektum. Modifiziert nach AJCC/UICC (16).....	14
Tabelle 2: Prognostische Faktoren im kolorektalem Karzinom. Daten von Nagtegaal et al. (7).....	16
Tabelle 3: Übersichtstabelle des PatientInnenkollektivs.....	24
Tabelle 4: Korrelation zwischen LIN28A- und LIN28B-Expression mit der M-Kategorie.....	29
Tabelle 5: LIN28A-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.....	32
Tabelle 6: LIN28B-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.....	33
Tabelle 7: LIN28A- und B-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.....	35

Zusammenfassung

Hintergrund: Der Verlust der Differenzierung ist ein Merkmal fortgeschrittener Malignome. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass eine hochgradige LIN28A- und/oder LIN28B-Expression in einer Reihe von soliden und hämatologischen Tumoren mit niedriger Differenzierung sowie schlechter Prognose korrelieren. LIN28 ist ein RNA-bindendes Protein welches zwei Isoforme ausbildet, nämlich LIN28A und LIN28B. LIN28 wurde bereits in verschiedensten Spezies untersucht und es zeigte sich, dass es als Promoter für Pluripotenz dient. Für das Kolorektale Karzinom (KK) konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass eine hochgradige LIN28-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose korreliert. (1, 2) Da das Auftreten von Fernmetastasen einen der wichtigsten prognosebestimmenden Faktoren darstellt (3) haben wir in dieser Studie untersucht ob das die LIN28-Expression beim KK mit der Fernmetastasierung korreliert.

Methodik: 84 primäre Kolonkarzinome wurden retrospektiv auf das Ausmaß der LIN28A und LIN28B Expression mittels Immunhistochemie untersucht. Als Studiendesign wurde eine zweiarmige Fall-Kontroll-Studie ausgewählt. Der eine Arm der Studie bestand aus Kolonkarzinomen mit synchroner Lebermetastasierung, während der Kontrollarm der Studie PatientInnen mit Kolonkarzinom ohne Fernmetastasierung repräsentierte. Beide Parameter wurden, unter Verwendung von univariaten Analysen, mit klinisch-pathologischen Tumorparametern, der SOX2 und Beta-Catenin Expression und insbesondere der Fernmetastasierung korreliert.

Ergebnisse: In unserem Kollektiv zeigten 54% der PatientInnen eine starke LIN28A und 51% eine starke LIN28B Expression. Für beide Marker konnte keine Korrelation mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen nachgewiesen werden ($p=0,33$). Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LIN28A/B und SOX2 Expression ($p=0,02$).

Schlussfolgerung: Eine Vielzahl von Studien zeigt die Heterogenität der LIN28A und LIN28B Expression im Kolonkarzinom auf, welche durch unsere Studie bestätigt werden kann. Außerdem wird postuliert, dass die LIN28A/B-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert. Das Vorhandensein von Fernmetastasen beeinflusst wesentlich das Überleben von PatientInnen mit Kolonkarzinom und ist

somit einer der wichtigsten prognostischen Faktoren. In unserer Studie konnte jedoch keine Korrelation zwischen der LIN28A/B-Expression mit der hämatogenen Fernmetastasierung nachgewiesen werden. Daher ist zu vermuten, dass die ungünstige Prognose bei LIN28A/B-Expression über andere Mechanismen und nicht über die Fernmetastasierung zustande kommt.

1. Einleitung

Das Kolorektale Karzinom (KRK) ist das dritthäufigste Karzinom bei Männern und das Zweithäufigste bei Frauen weltweit. (4) Im Jahr 2012 wurden 1,4 Millionen neue Erkrankungsfälle weltweit diagnostiziert und ungefähr 700 000 PatientInnen verstarben an diesem Malignom bzw. an dessen Folgen. (5) Die Inzidenzraten weisen weltweit große Unterschiede auf: Während in Industrieländern wie Japan, Europa, Ozeanien und Nordamerika hohe Karzinomraten gefunden werden, können in Afrika, der Karibik, Südamerika sowie in einigen asiatischen Ländern niedrige Raten an Erkrankungsfällen verzeichnet werden. (5)

Deutschland gehört im internationalen Vergleich zu den Ländern mit hoher Inzidenz für das KRK. Im Jahr 2010 wurden in etwa 62 000 Neuerkrankungen und 26 000 Sterbefälle registriert. Nach der Einführung von Früherkennungsmaßnahmen im Jahr 2002 konnte ein Rückgang der altersstandardisierten Inzidenz bei Männern von 13,8% (66,1 auf 57,0 pro 100 000) und bei Frauen von 14,3% (42,6 auf 36,5 pro 100 000) verzeichnet werden. (6) In Hinblick auf die Mortalität war in Deutschland ein Rückgang von 20,8% bei Männern und von 26,5% bei Frauen festzustellen. (6)

1.1 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Das Wissen über die Entwicklung und das Verhalten bösartiger Dickdarntumoren stellt eine Grundvoraussetzung in der Verbesserung der Behandlung und des Therapieerfolgs Betroffener dar. Im Gegensatz zu anderen Malignomen, ist die Pathogenese des KRK teilweise bekannt. Fearon und Vogelstein haben 1990 erstmalig die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben. Dabei handelt es sich um eine langsam voranschreitende Umwandlung eines gutartigen Kolonadenoms in ein bösartiges Kolonkarzinom (KK) durch sukzessive genetische Veränderung. (7) Im ersten Schritt erscheinen Mutationen im Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gen, gefolgt durch die Aktivierung des Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) Onkogens und die Inaktivierung des Tumor-

unterdrückenden p53 Gens. Der mehrstufige Prozess der Tumorentwicklung ist in Abbildung 1 dargestellt. (7)

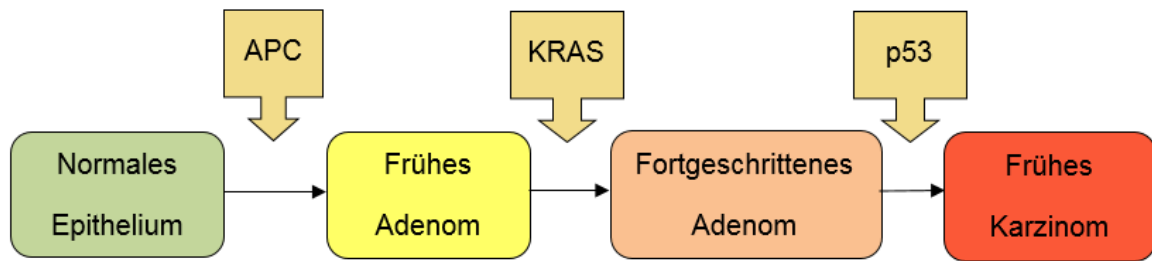


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz. Modifiziert nach Fearon und Vogelstein. (7)

Es ist besonders bemerkenswert, dass nicht alle KRK diesen Entwicklungsschritten folgen, sondern auf eine andere Art und Weise entstehen. 20% der sporadischen Karzinome folgen nicht der Adenom-Karzinom-Sequenz, sondern entstehen aus serratierten Vorläuferläsion. Diese Malignom Entwicklung basiert auf anderen molekularen Mechanismen, der sogenannten serratierten-Route, und entsteht häufiger im rechten Kolon. (8)

80% der Malignome entwickeln sich sporadisch, während 20% eine familiäre Häufung aufweisen. Bei 5% aller KRK liegt eine rein genetische Ursache in Form einer hereditären Erkrankung zugrunde. Beispiele dafür sind das Lynch-Syndrom, familiäre adenomatöse Polypose, Li-Fraumeni-Syndrom, Preutz-Jeghers-Syndrom oder das Cronkhite-Canada-Syndrome. (9)

1.2 Pathologie des kolorektalen Karzinoms

Makroskopisch treten die meisten KRK als ulzerierte, gut umschriebene Tumoren mit erhabenem Randsaum in Erscheinung. Die Beteiligung der Darmzirkumferenz kann eine Verengung oder Verschluss der Darmlichtung zur Folge haben. Weitere Wuchsformen sind die polypoide, ringförmige oder stenosierende. (10)

Histologisch wird das KRK durch die Weltgesundheitsorganisation / World Health Organisation (WHO) in verschiedene Subtypen eingeteilt. Das (konventionelle) Adenokarzinom NOS (not otherwise specified) ist das häufigste KRK und kommt zu 90% vor. Das Adenokarzinom wächst infiltrativ durch die *muscularis mucosae* in die *submucosa*. (10, 11)

Der nächst häufigste Subtyp des KRK ist das muzinöse Adenokarzinom. Basierend auf bevölkerungsbezogenen Studien kommt es weltweit mit einer Häufigkeit von 4% - 19% vor. (11-15) Die Tumorzellen des muzinösen Karzinoms produzieren reichlich Muzin (Schleim), weshalb der Tumor definitionsgemäß zu mehr als 50% aus Schleim bestehen muss. (10, 11)

Das Siegelzellringkarzinom macht ungefähr 1% aller KRK aus. (16-18) Die Hauptkomponente (mehr als 50%) dieses Tumortyps setzt sich aus isolierten Tumorzellen mit intrazytoplasmatischen Muzin und verdrängten Zellkern zusammen, die einem Siegelring ähneln. (10, 11)

Medulläre Karzinome, mikropapilläre adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse und kleinzellige Karzinome stellen sehr seltene Entitäten des KRK dar. (10, 11)

1.3.1 Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Die Stadieneinteilung eines Tumors hat das Ziel das Ausmaß des Tumorwachstums im Körper des Patienten zu klassifizieren. Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Union for International Cancer Control (UICC) hat das Tumour Node Metastasis (TNM) System standardisiert und eingeführt, um eine weltweit einheitliche Tumoreinteilung zu erzielen. (19) Die Tumoreinteilung basiert auf den anatomischen Gegebenheiten des Primärtumors, wie die Invasionstiefe und/oder Größe des Tumors (T), der Befall der lokalen Lymphknoten (N) und die Existenz von Fernmetastasen (M). In den letzten Jahren sind außerdem nicht-anatomische Prognosefaktoren hinzugefügt worden. (19)

Im KRK gibt es 5 Kategorien der T- Kategorie (T0-T4) welche die Invasionstiefe näher beschreiben. T0 bedeutet, dass es keinen Hinweis auf einen Primärtumor im Kolon oder Rektum gibt. T1 beschreibt die Invasion der *Submucosa* des Tumors, während bei T2 bereits die *muscularis propria* mit betroffen ist. Bei T3 infiltriert der Tumor bereits die *subserosa* oder das perikolische oder perirektale Gewebe. T4 bedeutet, dass der Tumor die Oberfläche des viszeralen Peritoneums penetriert (T4a) und/oder andere Strukturen durch den Tumor direkt infiltriert wurden (T4b). (19) Die Kategorien N0, N1 und N2 stratifizieren den Tumor abhängig vom Ausmaß der infiltrierten lokalen Lymphknoten. N0 bedeutet, dass keine Lymphknotenmetastasen vorliegen, während bei N1a 1 Lymphknoten, bei N1b 2

oder 3 Lymphknoten, bei N2a 4 bis 6 Lymphknoten und bei N2b mehr als 7 Lymphknoten betroffen sind. Die M Kategorie beschreibt das Vorliegen von Fernmetastasen. M0 bedeutet, dass keine Fernmetastasen vorliegen. M1a beschreibt das Vorliegen von Fernmetastasen in einem Organ (Leber, Lunge, Eierstöcke, nicht-regionale Lymphknoten), während M2 das Vorliegen von Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum beschreibt. (10, 19)

Die Kombination aus verschiedenen T, N und M Kategorien des KRK ergibt die Einteilung in die Tumorstadien I bis IV. Die Stadieneinteilung wird in Tabelle 1 verdeutlicht.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

Tabelle 1: Verschiedene T, N und M Kategorien und ihr korrespondierendes prognostisches Stadium (I-IV) für Karzinome im Kolon und Rektum. Modifiziert nach AJCC/UICC (19)

1.3 Etablierte Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinoms

Die klinisch-pathologische Stadieneinteilung nach dem AJCC/UICC TNM System wird als stärkster prognostischer Faktor für PatientInnen mit frühen und fortgeschrittenem KRK angesehen. PatientInnen mit intermediärem Tumorleiden ist eine Aussage über den Krankheitsverlauf schwerer zu prognostizieren und können in demselben Tumorstadium wesentlich verschiedene klinische Ergebnisse erleiden. (19-21) Ins Besondere PatientInnen mit einem KRK im AJCC/UICC Stadium II können schlechtere klinische Ergebnisse als PatientInnen mit AJCC/UICC Stadium III erfahren. Für PatientInnen in AJCC/UICC Stadium III wird eine adjuvante Chemotherapie empfohlen, während PatientInnen mit AJCC/UICC Stadium II nur eine adjuvante Chemotherapie erhalten, wenn sie ein erhöhtes Rezidiv Risiko aufweisen. (9, 20) Deshalb ist es von besonderer Wichtigkeit die Hoch-Risiko PatientInnen zu identifizieren und die klinische Entscheidungsfindung und Therapiemaßnahmen zu optimieren. Außerdem ist festzustellen, dass die Stadieneinteilung eines Tumors nur die anatomische Eindringtiefe widerspiegelt, nicht aber das biologisch aggressive Verhalten eines Tumors. (22, 23)

Prognosefaktoren, die unabhängig von der Stadieneinteilung sind, könnten als zusätzliches Werkzeug helfen die Prognosefindung zu verbessern. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über bereits bekannte Prognosefaktoren unabhängig vom TMN System. (10)

Günstige Faktoren	Ungünstige Eigenschaften des Primärtumors	Ungünstige Gefäßinvasion	Ungünstige Operationstechnik
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Intratumorale Entzündungsreaktion ➤ Peritumorale Entzündungsreaktion ➤ Desmoplasie ➤ Reaktive Lymphknoten 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Greater extent of circumferential involvement ➤ Darmverschluss ➤ Darmperforation ➤ Schlechte Differenzierung ➤ Infiltratives Muster der 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Blutgefäßinvasion ➤ Lymphgefäßinvasion ➤ Perineurale Invasion 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Kurzer Abstand zwischen Absetzungsrand und Tumor ➤ Inkomplette Exzision (R1)

	Tumorfront (Budding) ➤ Ungünstige molekulare Charakteristika		
--	--	--	--

Tabelle 2: Prognostische Faktoren im kolorektalem Karzinom. Daten von Nagtegaal et al. (10)

Wie bereits erwähnt haben die verschiedenen histologischen Subtypen nicht nur unterschiedliches mikroskopisches Erscheinungsbild, sondern auch einen unterschiedlichen prognostischen Wert. Das muzinöse Adenokarzinom, das Siegelzellringkarzinom sowie das mikropapilläre Adenokarzinom zeigen ein schlechteres Überleben im Vergleich zum konventionellem Adenokarzinom, während das medulläre Adenokarzinom eine günstigere Prognose aufweist. (18, 24-28) Zusätzlich sollten weitere prognostische Marker, wie Gefäßinvasion, perineurale Invasion, Tumornekrose, Entzündungsreaktion sowie Tumor Budding in die klinische Routine miteinbezogen werden. Die Lymph- und/oder Blutgefäßinvasion durch Tumorzellen ist ein essenzieller Prozess der Metastasierung. Die Blutgefäßinvasion ist ein unabhängiger Prognosefaktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf sowie die Ausbildung von Lebermetastasen. Die Signifikanz der Lymphgefäßinvasion ist demgegenüber weniger bekannt. (29)

1.4 Metastasierungsmuster

Der Prozess, dass einzelne Tumorzellen ihren Primarius verlassen und neue Absiedelungen in entferntem Gewebe produzieren wird bei der hämatogenen Metastasierung als Invasions-Metastasen Kaskade bezeichnet (Abbildung 2). (30) Diese Kaskade besteht aus fünf Schritten. Der erste Schritt beschreibt die lokale Invasion von Tumorzellen in die umgebende Matrix. Der zweite Schritt charakterisiert die Intravasation der einzelnen Tumorzellen in den Blutkreislauf. Im dritten Schritt werden die Tumorzellen systemisch transportiert. Der vierte Schritt zeigt die Kolonisation der Tumorzellen, während im fünften Schritt bereits die Tumor Absiedelung makroskopisch sichtbar ist. (31)

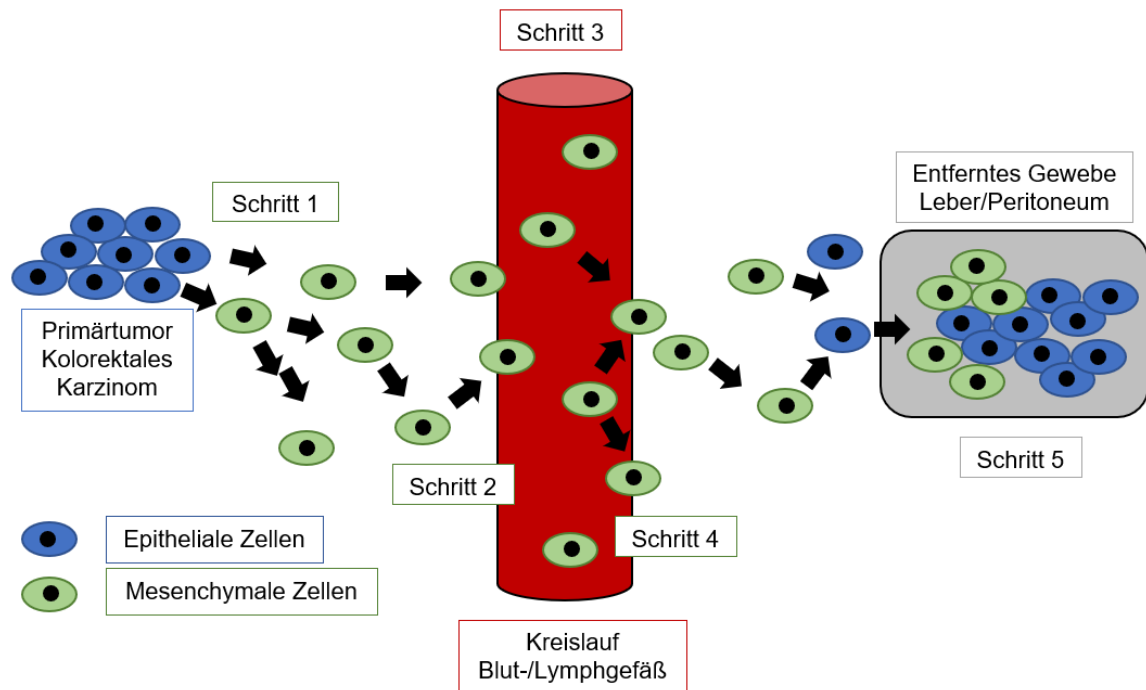


Abbildung 2: Invasions-Metastasen Kaskade. Modifiziert nach Pretzsch et al. (31)

Es wird vermutet, dass der zugrundeliegende Prozess die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) ist. Der Schlüsselprozess dieser Umwandlung ist der Verlust der Zell-zu-Zell Adhärenz und somit die Möglichkeit, dass zuvor unbewegliche epitheliale Zellen die Eigenschaften von mesenchymalen Zellen erlangen, welche essenziell für Invasion und Metastasierung verantwortlich sind. Diese Eigenschaften beinhalten eine gesteigerte Mobilität, Invasivität, erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose sowie Abbau und Produktion von extrazellulärer Matrix. E-Cadherin, ein transmembranöses Protein, welches von epithelialen Zellen exprimiert wird, spielt bei der Aufrechterhaltung des epithelialen Zustandes eine zentrale Rolle. Die Herabregulierung der E-Cadherin Expression ist mit Lymphknotenmetastasen, fortgeschrittenem Stadium, schlechter Differenzierung und Gefäßinvasion verbunden. (31)

Im Gegensatz zur hämatogenen Metastasierung, welche aufgrund von EMT die Mobilität und Invasivität der Tumorzellen ermöglicht, wird für die lokale peritoneale Metastasierung des KRK ein anderer Weg der Metastasierung diskutiert. (31, 32) Das Loslösen der Tumorzellen vom Primarius könnte einerseits im Rahmen der EMT geschehen oder folgenden Mechanismen unterliegen (33): Spontane Abschilferung von Tumorzellen im Rahmen des invasiven Wachstums

des KRK durch die Serosa (T4), spontanes Tumorzellshredding in die Lymphbahn aufgrund von erhöhtem Druck durch Flüssigkeitsspiegel im Darm um den Primärtumor, Operation-induzierte Tumorzellverbreitung bei Tumoreröffnung, Tumorzellverbreitung beim Durchtrennen von Lymph- oder Blutgefäßen oder der postoperativen Entzündung zum Beispiel bei Anastomoseninsuffizienz. (31, 32, 34, 35) Es ist immer noch unklar ob EMT gleichermaßen zur lokalen Tumorausbreitung beziehungsweise peritonealer Streuung oder zur Entstehung von Fernmetastasen beispielsweise der hämatogenen Streuung beiträgt.

Es wird diskutiert, dass die peritoneale Karzinomatose ein fortgeschrittenes Stadium der lokalen Tumorausbreitung sein könnte durch spontanes Tumorzellshredding in das lymphatische System oder Abschilferungen des Primärtumors in die peritoneale Flüssigkeit, während Lebermetastasen das Ergebnis von hämatogener Streuung sind. (31) Des Weiteren zeigen neuste Studien, dass die Adhäsionsmoleküle, welche den Zellen im Anhaftungsprozess am Zielorgan helfen, signifikante Unterschiede zwischen hämatogenen und peritonealen Metastasen aufweisen. (31) Wachsende Evidenz deutet daraufhin, dass peritoneale Karzinomatose im KRK das Endstadium eines lokal fortgeschrittenen Tumorleidens beschreibt, während hepatische Metastasen Ausdruck für ein hämatogen ausgebreitetes KRK ist, welches lokal noch beherrschbar erscheint. (31)

Bei Erstdiagnose eines KK präsentieren sich ca. 20% der PatientInnen mit Fernmetastasen. Anatomisch bedingt befinden sich die meisten Absiedlungen in der Leber (ca. 18%), gefolgt von der Lunge (2%). (9, 36) Ca. 25% der PatientInnen im UICC-Stadium II und 50-60% der PatientInnen im UICC-Stadium III erleiden innerhalb von 5 Jahren ein Rezidiv hauptsächlich aufgrund von Fernmetastasierung. (36) Die adjuvante Chemotherapie soll Fernmetastasen vorbeugen und das Überleben verbessern. Die Vorteile davon werden bei PatientInnen mit KK im UICC-Stadium III deutlich, bleiben jedoch im UICC-Stadium II umstritten. (36) Das Auftreten von Fernmetastasen ist bekanntermaßen einer der besten Prognosefaktoren für den ungünstigen Verlauf von Tumorerkrankungen. (3) Daher ist es von besonderer Wichtigkeit das Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen anhand von zusätzlichen prognostischen Markern zu bestimmen, einerseits um das Dilemma der unzureichenden Risikoabschätzung der

Tumorstadien II und III zu überwinden und andererseits individualisierte Therapiekonzepte zu implementieren.

1.5 LIN28 als Prognosefaktor

LIN28 ist ein RNA-bindendes Protein welches zwei Isoforme ausbildet, nämlich LIN28A und LIN28B. Ursprünglich wurde LIN28 in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als heterochronisches Gen, welches eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Geweberegeneration und Tumorgenese innehat, entdeckt. (37, 38) LIN28 wurde bereits in verschiedensten Spezies untersucht und es zeigte sich, dass es als Promoter für Pluripotenz dient. (39) Außerdem wurde berichtet, dass LIN28 in undifferenziertem Gewebe zu einem hohen Anteil exprimiert war, während die LIN28-Expression in bereits differenzierten Geweben herunter reguliert ist. (39) Daraus wurde geschlussfolgert, dass LIN28 die Pluripotenz fördert und somit als „Türsteher“ der Differenzierung fungiert. (39) In Säugetieren wird LIN28A und LIN28B in embryonalen Stammzellen exprimiert. (40) Die embryonale Stammzelle entwickelt sich aus der Blastozyste und kann sich einerseits selber unendlich oft reproduzieren und andererseits sich in alle 3 Keimblätter differenzieren (Pluripotenz). (41) Tumorstammzellen haben ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen, insbesondere die gemeinsame Fähigkeit der Unsterblichkeit. Außerdem finden sich in Tumorstammzellen die Expression von Proteinen, welche sich ansonsten nur in embryonalen Stammzellen finden, wie zum Beispiel LIN28, SOX2, OCT4, MYC und KLF4. (42-44) Es wird vermutet, dass LIN28 die Stammzellfunktion erhält, indem die Bildung von Vorläufern der *let-7* microRNA Familie verhindert, welches in geringen Leveln der ausgereiften *let-7* microRNA resultiert. (40) *Let-7* fördert die Zelldifferenzierung und erhält die Gewebeselbstregulation verschiedenster reifer Zelltypen. (40) Tatsächlich werden reife *let-7* microRNAs weitestgehend in endgültig differenziertem Gewebe detektiert, während LIN28A und LIN28B in diesem Gewebe nicht nachgewiesen werden. (40)

Manche Tumore wie zum Beispiel der bösartige Keimzelltumor des Hodens oder das Prostatakarzinom zeigen eine Überexpression von LIN28A (40, 45), während andere bösartige Neubildungen wie der Wilms-Tumor, das Neuroblastom oder das hepatozelluläre Karzinom ausschließlich LIN28B über exprimieren (40, 46-

48). Außerdem konnte gezeigt werden, dass manche Keimzelltumore, Mammakarzinome und das KRK beide Paraloge, also LIN28A und LIN28B, über exprimieren können (40, 49, 50). Diese Heterogenität wirft die Frage auf, ob LIN28A und LIN28B eine überflüssige oder eine unabhängige Rolle im Prozess der Tumorentwicklung spielen.

Die progrediente Entdifferenzierung von Tumorzellen ist bekanntermaßen Merkmal für fortgeschrittene Malignome im Menschen. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass hochgradige LIN28A- und/oder LIN28B-Expression in einer Reihe von soliden und hämatologischen Tumoren, vor allem in Tumoren mit niedriger Differenzierung sowie schlechter Prognose nachweisbar sind. (37, 40, 51). Die Studiengruppe um Tu et al. analysierte im Jahr 2015 die bisher größte Kohorte von PatientInnen mit KRK und stellte eine Korrelation zwischen der LIN28A und LIN28B Expression mit sowohl invasiver Tumorpathologie als auch ungünstiger Prognose fest. (40) Das Vorhandensein von Fernmetastasen beeinflusst wesentlich das Überleben von PatientInnen mit KK und ist somit ein wichtiger prognostischer Faktor. Da heutzutage eine Vielzahl von therapeutischen Möglichkeiten existieren, die trotz Metastasierung einen kurativen Therapieansatz verfolgen, ist es von großer klinischer Bedeutung prognostische Faktoren zu finden, die mit dem Auftreten der Fernmetastasierung korrelieren. (52)

1.6 Ziele

Ziel der aktuellen Fall-Kontroll-Studie war es, die Beziehung zwischen der LIN28A/B-Expression und der hämatogenen Fernmetastasierung in einer Kohorte von KK-PatientInnen zu untersuchen. Die hämatogene Fernmetastasierung stellt einen der wichtigsten prognostischen Faktoren da und bestimmt das Überleben von Patienten mit KK maßgeblich. Daher wollten wir die Frage beantworten, ob PatientInnen mit KK die LIN28A und/oder LIN28B-Expression mit dem Auftreten von Fernmetastasen korrelieren und somit die LIN28A/B-Expression als prognostischer Marker für das Auftreten von Fernmetastasen herangezogen werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 PatientInnenkollektiv

Von 84 PatientInnen mit Kolonkarzinom (KK), welche einer kurativen operativen Tumorresektion an der Ludwig-Maximilian-Universität München unterliefen, wurden die Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus den Archiven des Instituts der Pathologie zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben stammten aus den Jahren 1994 bis 2005. Die dazugehörigen klinisch-pathologischen Daten wurden vom Tumorregister München (Munich Cancer Registry, MCR) eingeholt. Aus statistischen Gründen wurde das Studiendesign einer zweiarmigen Fall-Kontroll-Studie mit selektionierter Kohorte ausgewählt. Der eine Arm der Studie bestand aus KK mit synchroner Lebermetastasierung, welche entweder durch Leberbiopsien oder klinische Bildgebung diagnostiziert wurden. Der Kontrollarm der Studie repräsentierte PatientInnen mit KK ohne Fernmetastasierung bei Diagnosestellung und einem krankheitsfreien Überleben von 5 Jahren nach der operativen Tumorresektion, um eine Metastasierung auszuschließen. Die PatientInnen beider Studienarme wurden in Bezug auf Tumorgrad (gemäß WHO 2010) (53), T Kategorie (gemäß TMN Klassifikation maligner Tumore 2017) (54) und Tumorlokalisation in 42 Paare eingeteilt.

Das PatientInnen-Kollektiv aus 84 Individuen bestand aus 42 Männern und 42 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 66 Jahren. Der jüngste Patient war 38 Jahre alt, während der älteste Patient 84 Jahre alt war. Alle KK waren im rechten Kolon lokalisiert. Zum rechten Kolon gehörten definitionsgemäß das Zökum, das Kolon ascendenz, die rechte Flexur sowie das Kolon transversum. Im Zökum befanden sich 22 KK, während im Kolon ascendenz 43, in der rechten Flexur 3 und im Kolon transversum 16 KK aufzufinden waren.

Die Studie wurde gemäß den Empfehlungen der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München durchgeführt.

2.2 Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden mit 5 µm dicken Gewebeschnitte der Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Gewebeproben durchgeführt.

Für die spezifische Färbung von LIN28A wurde eine Hitzevorbehandlung mit Pro Taqs II Antigen-Enhancer (Fa.Quartett, 401602192) durchgeführt. Als Antikörper wurde der rekombinante Anti-LIN28A Antikörper der Firma Abcam mit der Nummer ab124765 verwendet.

Für die spezifische immunhistochemische Färbung von LIN28B wurde die Hitzevorbehandlung mit Epitope Retrieval Solution pH6 (Fa.Novocastra, RE7113) durchgeführt. Als Antikörper wurde der Anti-LIN28B Antibody der Firma Atlas Antibodies mit der Nummer HPA036630 angewendet.

Anschließend folgte eine Inkubation aller Gewebeproben mit dem Primärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung von 1:1000. Als Detektionssystem wurde für alle Schnitte das Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Fa.Vector, PK6200) verwendet. Als Chromogen wurde DAB+ (Fa.Agilent Technologies, K3468) verwendet. Die Gegenfärbung wurde mit Hematoxylin Gill's Formula (Fa.Vector, H-3401) durchgeführt. Alle Färbungen wurden gemäß den Herstelleranweisungen durchgeführt.

Die immunhistochemischen Färbungen für SOX2, β-catenin und CD133 standen aus vorangegangenen Studien bereits zur Verfügung. (3, 36)

2.3 Beurteilung der Immunhistochemie

Alle immunhistochemischen Schnitte wurden von zwei unabhängigen, hinsichtlich klinisch-pathologischer Daten verblindeten Beobachtern (Jens Neumann und Nicole Max) auf ihre Immunreaktivität untersucht. Zur Beurteilung der Immunreaktivität wurde der H-Score verwendet. Dieser wurde folgendermaßen angewendet: Es wurde die Färbeintensität als auch die Ausbreitung dokumentiert. Die Färbeintensität wurde in die Kategorie **0**: keine Reaktivität, **1+**: schwach gefärbte Tumorzellen, **2+**: moderat gefärbte Tumorzellen, **3+**: stark gefärbte Tumorzellen eingeteilt. Dieser Färbeintensität wurde der jeweilige Anteil der Ausbreitung in Prozent zugewiesen. Somit ergab sich folgende Berechnungsformel: 3 x Prozentanteil der stark gefärbten Tumorzellen + 2 x Prozentanteil der moderat

gefärbten Tumorzellen + 1 x Prozentanteil der schwach gefärbten Tumorzellen. Ein H-Score zwischen 0 und 300 war somit möglich.

Für eine bessere statistische Auswertbarkeit führten wir eine weitere Stratifizierung für LIN28A durch: **Score 0 (Low)**: H-Score von 0 – 199, **Score 1 (High)**: 200 – 300. Für LIN28B wurde folgende Stratifizierung durchgeführt: **Score 0 (Low)**: H-Score von 0 – 159, **Score 1 (High)**: 160 – 300. Beide Cut-Off-Werte wurden gemäß dem Median bestimmt, das heißt Werte kleiner des Medians wurden als ‚Low‘ und Werte größer des Medians als ‚High‘ bezeichnet. Um eine Aussage über LIN28 zu treffen verwendeten wir folgenden Score: **Score 0**: LIN28A Low und LIN28B Low, **Score 1**: LIN28A High und LIN28B Low oder LIN28A Low und LIN28B High, **Score 2**: LIN28A High und LIN28B High.

2.4 Statistische Analyse

Assoziationen zwischen dem immunhistochemisch nachgewiesenen Ausmaß der LIN28A und LIN28B Expression und der Metastasierung wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. Des Weiteren wurde die Expression von LIN28A und LIN28B mit anderen histopathologischen und molekularpathologischen Parametern, wie Tumordifferenzierung, T-Kategorie, N-Kategorie, Angioinvasion, Alter, Geschlecht, CD133, hMLH1, MSI-Analyse, β -Catenin, SOX2 und BRAF verglichen.

Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig mit signifikanten Werten bei $p < 0.05$. Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von SPSS v23.0 (SPSS Inc.) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Histopathologie

Zwei (2%) PatientInnen wiesen ein pT1-, 8 (10%) ein pT2-, 58 (69%) ein pT3- und 16 (19%) ein pT4-Karzinom auf. Eine Lymphknotenbeteiligung konnte in 50 (59%) der Tumoren nachgewiesen werden. Diese gliedern sich in 23 (27%) KK mit metastatischem Befall von 1-3 Lymphknoten (pN1) und 27 (32%) Tumoren mit Metastasen in mehr als 4 Lymphknoten (pN2). Kein Tumor zeigte einen hohen (G1), 32 (38%) einen mittleren (G2) und 50 (60%) einen niedrigen Differenzierungsgrad (G3). In den verbleibenden 2 (2%) Fällen wurden undifferenzierte Karzinome (G4) nachgewiesen. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.

pT	n (%)	pN	n (%)	pM	n (%)	G	n (%)
pT1	2 (2)	pN0	34 (41)	pM0	42 (50)	G1	0 (0)
pT2	8 (10)	pN1	23 (27)	pM1	42 (50)	G2	32 (38)
pT3	58 (69)	pN2	27 (32)			G3	50 (60)
pT4	16 (19)					G4	2 (2)

Tabelle 3: Übersichtstabelle des PatientInnenkollektivs

Gemäß unserer Definition befanden sich alle KK im rechten Kolon und zeigten dort folgende Lokalisationen: 22 (26%) KK befanden sich im Zökum, während im Kolon ascendenz 43 (51%), in der rechten Flexur 3 (4%) und im Kolon transversum sich 16 (19%) KK aufzufinden waren. Ein Überblick gibt Abbildung 3.

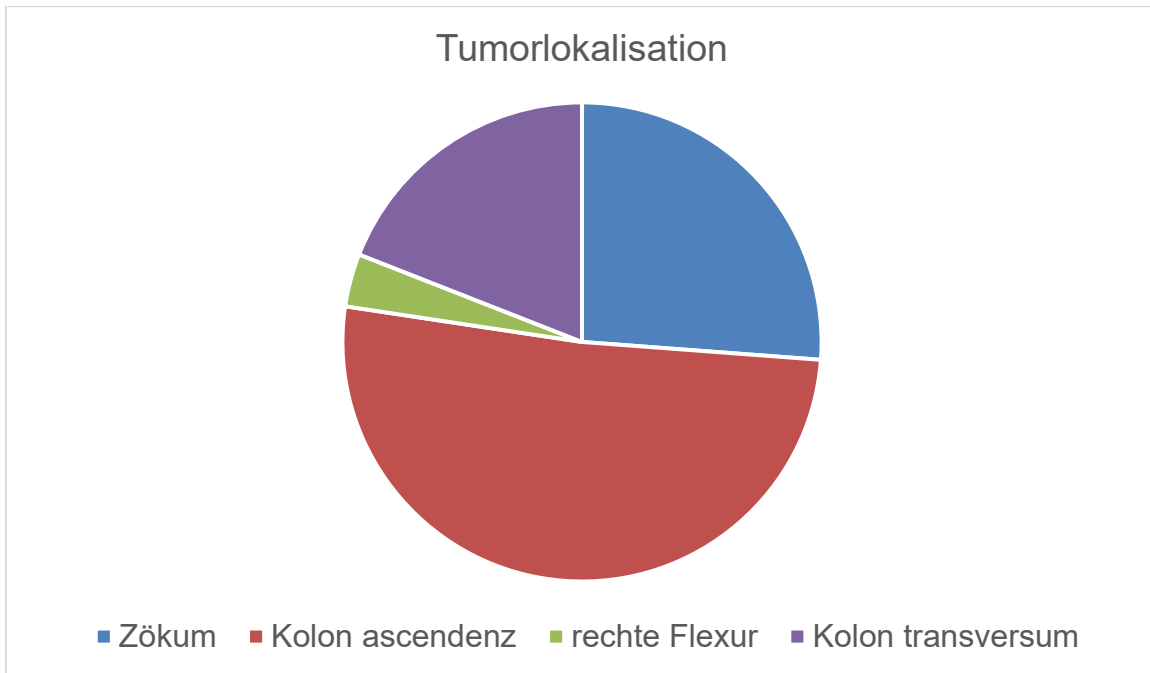


Abbildung 3: Tumorlokalisation

3.2 Ergebnisse der LIN28A-Auswertung

Eine LIN28A-Expression wurde in allen der 84 Tumoren gefunden. In 20 (24%) Fällen zeigte sich eine LIN28A-Expression von unter 30% der Tumorzellen. Eine Immunpositivität von 31 – 60% zeigte sich in 15 (18%) Fällen, eine Positivität von 61 – 90% in 27 (32%) und eine LIN28A-Expression von über 90% zeigte sich in 22 (26%) Fällen. Der H-Score zeige einen Median von 200. Daraus ergab sich in 39 (46%) Fällen der Score 0 (Low) und in 45 (54%) Fällen der Score 1 (High). Abbildung 4 veranschaulicht die Ergebnisse. Bei den PatientInnen ohne Metastasierung (n=42) zeigte sich in 17 (40%) Fällen der Score 0 und in 25 (60%) Fällen der Score 1. Die PatientInnen mit Metastasen (n=42) zeigten in 22 (52%) Fällen den Score 0 und in 20 (48%) der Fälle den Score 1. Abbildung 5 zeigt Beispiele für keine, schwache, moderate und starke LIN28A-Expression.

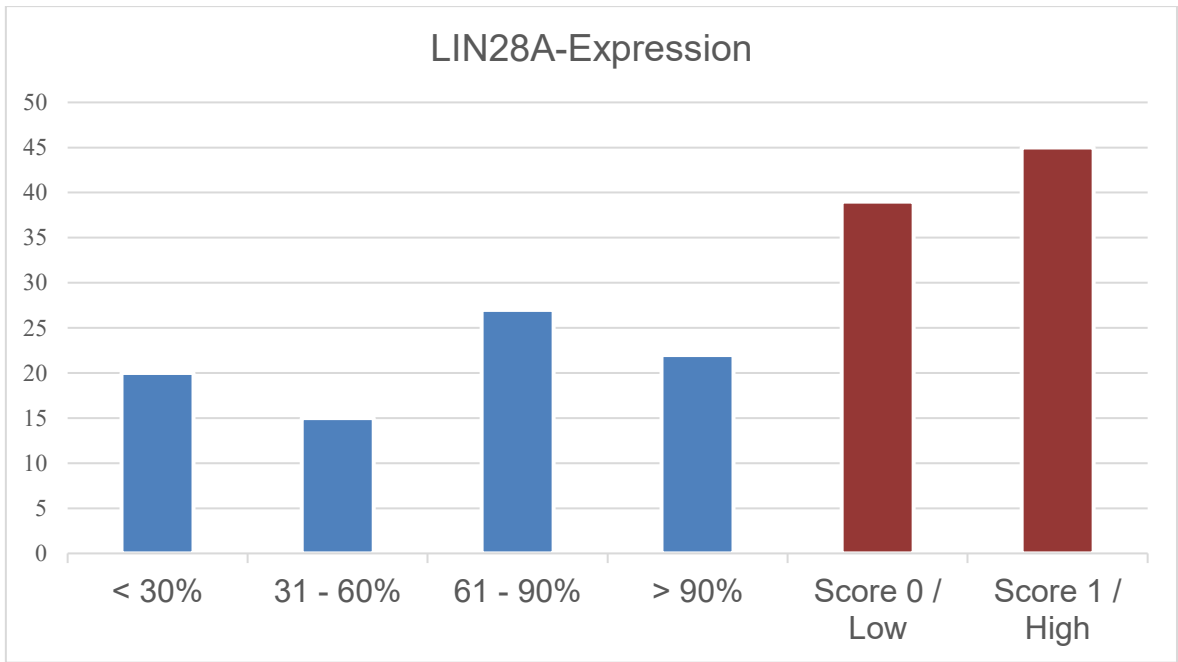


Abbildung 4: Übersicht der positiven LIN28A-Expression

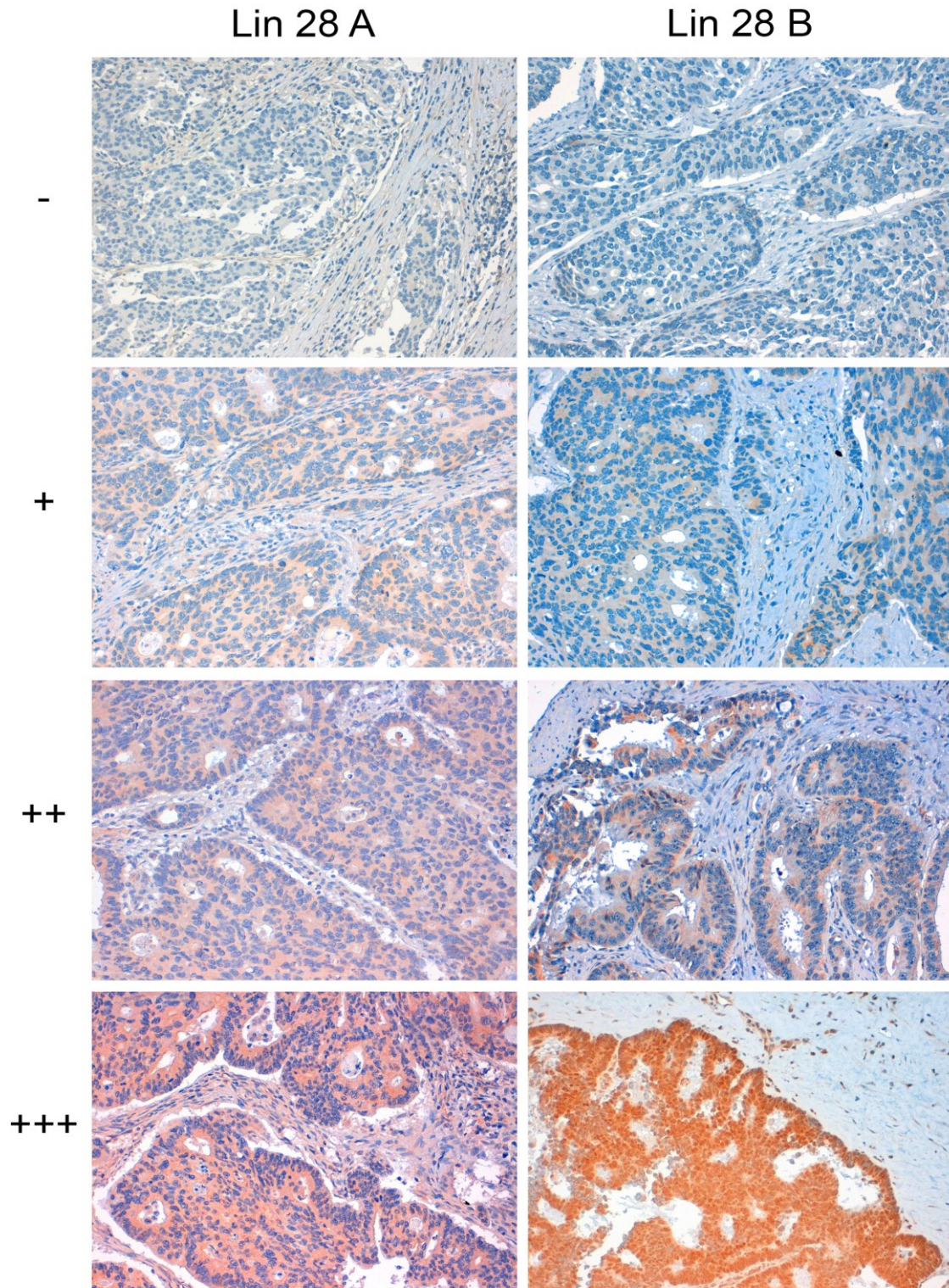


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von LIN28A und LIN28B im rechtsseitigen Kolonkarzinom bei 100facher Vergrößerung. Kolonkarzinome ohne LIN28A oder LIN28B-Expression (-) bzw. mit schwacher (+), moderater (++) und starker (+++) cytoplasmatischer Färbung für LIN28A und LIN28B.

3.3 Ergebnisse der LIN28B-Auswertung

Eine LIN28B-Expression wurde in 83 der 84 Tumoren gefunden. In 32 (38%) Fällen zeigte sich eine LIN28B-Expression von unter 30% der Tumorzellen. Eine Immunpositivität von 31 – 60% zeigte sich in 17 (20%) Fällen, eine Positivität von 61 – 90% in 30 (36%) und eine LIN28B-Expression von über 90% zeigte sich in 5 (6%) Fällen. Der H-Score wies einen Median von 160 auf. Daraus ergab sich in 41 (49%) Fällen der Score 0 (Low) und in 43 (51%) Fällen der Score 1 (High). Abbildung 6 veranschaulicht die Ergebnisse. Bei den PatientInnen ohne Metastasierung (n=42) zeigte sich in 20 (48%) der Fälle der Score 0 und in 22 (52%) der Fälle der Score 1. Die PatientInnen mit Metastasen (n=42) zeigten in 21 (50%) Fällen den Score 0 und in 21 (50%) der Fälle den Score 1. Abbildung 5 zeigt Beispiele für keine, schwache, moderate und starke LIN28B-Expression.

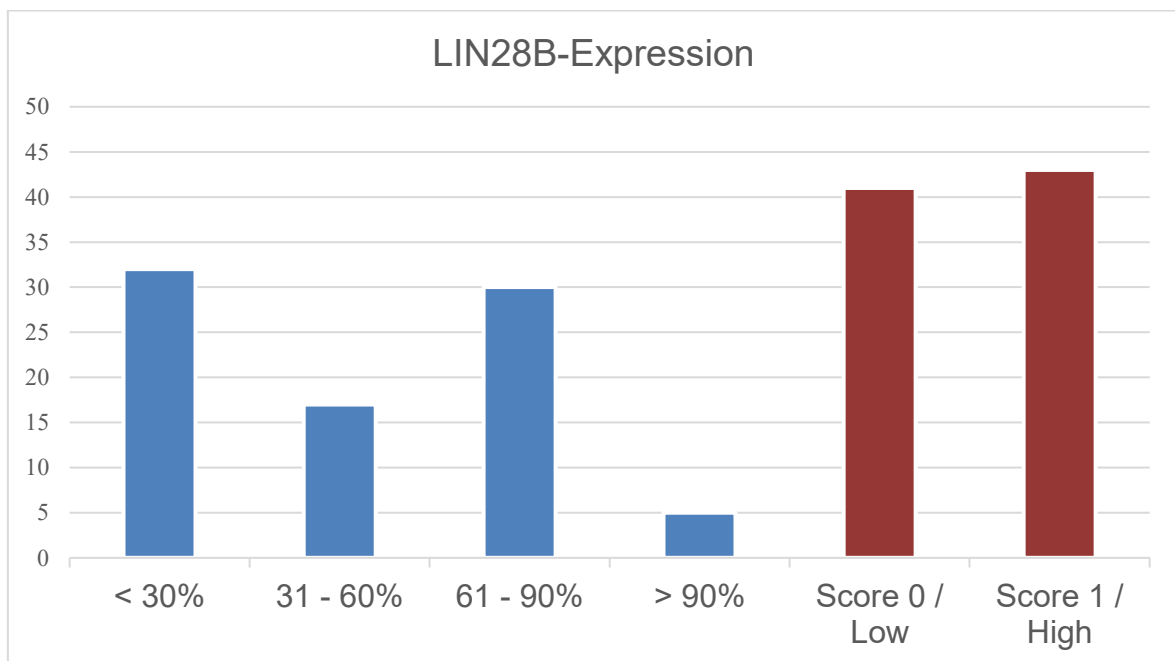


Abbildung 6: Übersicht der positiven LIN28B-Expression

3.4 Korrelation der LIN28A- und LIN28B-Expression mit der synchronen Lebermetastasierung

Wir führten eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse der LIN28A- und LIN28B-Expression mit dem Metastasierungsstatus durch. Hierbei zeigte sich kein signifikantes Ergebnis. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der LIN28A- bzw. LIN28B-Expression und der Metastasierung in unserer Kohorte von 84 Individuen detektiert werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 4.

Eine LIN28A-Expression konnte in 54% der Fälle beobachtet werden. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der positiven LIN28A-Expression und der Anwesenheit (M1, 44,4% bei positiver LIN28A-Expression vs. 56,4% bei negativer LIN28A-Expression) bzw Abwesenheit (M0, 55,6% bei positiver LIN28A-Expression vs. 43,6% bei negativer LIN28A-Expression) von Lebermetastasen ermittelt werden ($p= 0,27$). Ebenso zeigte sich in 51% der Fälle eine LIN28B-Expression in unserer Kohorte. Eine signifikante Korrelation mit positiver LIN28B-Expression sowie dem M1-Status (M1, 48,8% bei positiver LIN28B-Expression vs. 51,2% bei negativer LIN28B-Expression) oder M0-Status (M0, 51,2% bei positiver LIN28B-Expression vs. 48,7% bei negativer LIN28B-Expression) konnte nicht detektiert werden ($p= 0,83$).

LIN28A-Expression			
M-Kategorie	Score 0 (Low)	Score 1 (High)	p-Wert
M0	17 (40%)	25 (60%)	0,27
M1	22 (52%)	20 (48%)	
LIN28B-Expression			
M0	20 (48%)	22 (52%)	0,83
M1	21 (50%)	21 (50%)	

Tabelle 4: Korrelation zwischen LIN28A- und LIN28B-Expression mit der M-Kategorie

3.5 Korrelation der LIN28A- und LIN28B-Expression mit histo- und molekularpathologischen Parametern

Die Ergebnisse der LIN28A- und LIN28B-Immunhistochemie wurden zudem mit histo- und molekularpathologischen Parametern, wie Tumordifferenzierung, T-Kategorie, N-Kategorie, Angioinvasion, Alter, Geschlecht, CD133, hMLH1, MSI-Analyse, β -Catenin, SOX2 und BRAF korreliert. Einen Überblick über die relevanten Ergebnisse der Assoziation der LIN28A- und LIN28B Expression mit histopathologischen Parametern geben Tabelle 5 und 6. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p=0,04$) zwischen der hochgradigen LIN28A-Expression und der Mikrosatellitenstabilität. Des Weiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,02$) zwischen der hochgradigen LIN28A-Expression mit der SOX2 Expression festgestellt werden, während bei den anderen histopathologischen Parameter wie T- oder N-Status, Alter, Geschlecht, Tumordifferenzierung, Lymph- oder Blutgefäßinvasion keine signifikante Wechselverbindung detektiert wurde.

Gegenüber der LIN28A-Expression zeigte sich bei der hochgradigen LIN28B-Expression lediglich eine signifikante Korrelation ($p=0,04$) mit der SOX2 Expression. Dieser Zusammenhang mit SOX2 zeigte sich ebenso mit dem kombinierten Score der LIN28A und B-Expression.

Bei der Analyse der Lymphgefäßinvasion, der Blutgefäßinvasion und Mikrosatelliten-Analyse fehlten jeweils die entsprechenden Daten zu einem Fall, weshalb dieser ausgeschlossen wurde ($n=83$).

LIN28A-Expression					
		N	Score 0 (Low)	Score 1 (High)	p-Wert
Alter	≤ 65	44	18 (21%)	26 (31%)	0,29
	≥ 66	40	21 (25%)	19 (23%)	
Geschlecht	Männlich	42	19 (23%)	23 (27%)	0,83

	Weiblich	42	20 (24%)	22 (26%)	
T-Kategorie	T1	2	0 (0%)	2 (2%)	0,60
	T2	8	4 (5%)	4 (5%)	
	T3	58	27 (32%)	31 (37%)	
	T4	16	8 (10%)	8 (10%)	
N-Kategorie	N0	34	14 (17%)	20 (24%)	0,71
	N1	23	12 (14%)	11 (13%)	
	N2	21	11 (13%)	10 (12%)	
	N3	6	2 (2%)	4 (5%)	
Tumordifferenzierung	G1	0	0 (0%)	0 (0%)	0,71
	G2	32	13 (15%)	19 (23%)	
	G3	50	25 (30%)	25 (30%)	
	G4	2	1 (1%)	1 (1%)	
Lymphgefäßinvasion	Negativ	43	19 (23%)	24 (29%)	0,60
	Positiv	40	20 (24%)	20 (24%)	
Blutgefäßinvasion	Negativ	76	34 (41%)	42 (51%)	0,18
	Positiv	7	5 (6%)	2 (2%)	
Mikrosatelliten - Analyse	MSI	14	10 (12%)	4 (5%)	0,04
	MSS	69	28 (34%)	41 (49%)	
SOX2	Negativ	69	28 (33%)	41 (49%)	0,02
	Positiv	15	11 (13%)	4 (5%)	

CD133	Niedriggradig	61	29 (36%)	32 (40%)	0,84
	Hochgradig	20	9 (11%)	11 (13%)	

Tabelle 5: LIN28A-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.

LIN28B-Expression					
		N	Score 0 (Low)	Score 1 (High)	p-Wert
Alter	≤ 65	44	22 (26%)	22 (26%)	0,82
	≥ 66	40	19 (23%)	21 (25%)	
Geschlecht	Männlich	42	23 (27%)	19 (23%)	0,28
	Weiblich	42	18 (21%)	24 (29%)	
T-Kategorie	T1	2	0 (0%)	2 (2%)	0,19
	T2	8	4 (5%)	4 (5%)	
	T3	58	26 (31%)	32 (38%)	
	T4	16	11 (13%)	5 (6%)	
N-Kategorie	N0	34	18 (21%)	16 (19%)	0,31
	N1	23	13 (16%)	10 (12%)	
	N2	21	9 (11%)	12 (14%)	
	N3	6	1 (1%)	5 (6%)	
Tumordifferenzierung	G1	0	0 (0%)	0 (0%)	0,32
	G2	32	16 (19%)	16 (19%)	

	G3	50	23 (27%)	27 (33%)	
	G4	2	2 (2%)	0 (0%)	
Lymphgefäßinvasion	Negativ	43	20 (24%)	23 (28%)	0,59
	Positiv	40	21 (25%)	19 (23%)	
Blutgefäßinvasion	Negativ	76	36 (44%)	40 (48%)	0,22
	Positiv	7	5 (6%)	2 (2%)	
Mikrosatelliten - Analyse	MSI	14	6 (7%)	8 (10%)	0,66
	MSS	69	34 (41%)	35 (42%)	
SOX2	Negativ	69	30 (35%)	39 (47%)	0,04
	Positiv	15	11 (13%)	4 (5%)	
CD133	niedriggradig	61	31 (38%)	30 (38%)	0,95
	hochgradig	20	10 (12%)	10 (12%)	

Tabelle 6: LIN28B-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.

LIN28A und LIN28B-Expression					
		N	Score 0 (Low)	Score 1 (High)	p- Wert
Alter	≤ 65	44	13 (15%)	31 (37%)	0,84
	≥ 66	40	11 (13%)	29 (35%)	
Geschlecht	Männlich	42	13 (15%)	29 (35%)	0,63
	Weiblich	42	11 (13%)	31 (37%)	

T-Kategorie	T1	2	0 (0%)	2 (2%)	0,58
	T2	8	3 (4%)	5 (6%)	
	T3	58	15 (18%)	43 (51%)	
	T4	16	6 (7%)	10 (12%)	
N-Kategorie	N0	34	10 (12%)	24 (29%)	0,93
	N1	23	7 (8%)	16 (19%)	
	N2	21	6 (7%)	15 (18%)	
	N3	6	1 (1%)	5 (6%)	
M-Kategorie	M0	42	10 (12%)	32 (38%)	0,33
	M1	42	14 (17%)	28 (33%)	
Tumordifferenzierung	G1	0	0 (0%)	0 (0%)	0,71
	G2	32	8 (9%)	24 (29%)	
	G3	50	15 (18%)	35 (42%)	
	G4	2	1 (1%)	1 (1%)	
Lymphgefäßinvasion	Negativ	43	11 (13%)	32 (39%)	0,49
	Positiv	40	13 (15%)	27 (33%)	
Blutgefäßinvasion	Negativ	76	20 (24%)	56 (67%)	0,09
	Positiv	7	4 (5%)	3 (4%)	
Mikrosatelliten - Analyse	MSI	14	6 (7%)	8 (10%)	0,17
	MSS	69	17 (20%)	52 (63%)	
SOX2	Negativ	69	16 (19%)	53 (63%)	0,02

	Positiv	15	8 (10%)	7 (8%)	
CD133	Niedriggradig	61	19 (23%)	42 (52%)	0,60
	Hochgradig	20	5 (6%)	15 (19%)	

Tabelle 7: LIN28A- und B-Expression in Korrelation mit anderen histopathologischen Parametern.

4. Diskussion

Heutzutage stellt die histopathologische Beurteilung mit Ermittlung des Tumorstadiums und -types und der Vollständigkeit einer operativen Resektion sowie die Festlegung des Lymphknotenstatus eine wichtige Bewertungsgrundlage dar, um prognostische Aussagen für PatientInnen mit KRK zu treffen. Zusätzliche Informationen über die Tumorausbreitung bzw Fernmetastasierung gibt ein ausgedehntes Staging mittels Abdomen Sonographie, Thorax-Röntgen, gegeben falls CT oder MRT. (55) Diese Untersuchungen und Klassifizierungen sind die Basis für alle weiteren Therapieentscheidungen, obwohl sich seit der Einführung des TNM-Systems vor über 70 Jahren wenig verändert hat. Beim KRK wird das AJCC / UICC-TNM-System als der stärkste prognostische Parameter für PatientInnen mit frühen und fortgeschrittenen Krankheitsstadien angesehen, während es im Stadium II und III weniger in der Lage ist, den Krankheitsverlauf zu prognostizieren. (20, 21, 56) Es wurde erkannt, dass sich Tumoren im gleichen Stadium im Hinblick auf Tumoraggressivität bzw. Tumorbilogie und PatientInnen-Überleben oft sehr unterschiedlich verhalten. Insbesondere PatientInnen mit Stadium-II-KRK können einen schlechteren Krankheitsverlauf aufweisen als PatientInnen mit Stadium-III-KRK. Aufgrund des hohen Rezidivrisikos wird für alle PatientInnen im Stadium III eine adjuvante Chemotherapie empfohlen, während PatientInnen im Stadium II nur dann eine adjuvante Therapie erhalten, wenn sie ein hohes Risiko haben ein Rezidiv zu erleiden. (9, 20) Es gilt demzufolge PatientInnen im Stadium II mit hohem Rezidiv-Risiko, welche von einer adjuvanten Therapie profitieren, und PatientInnen im Stadium III, welche ein geringes Risiko für einen Krankheitsprogress und an den Nebenwirkungen der adjuvanten Therapie leiden, zu erkennen und zu selektionieren. Dieser Umstand macht darauf aufmerksam, dass zusätzliche Prognosefaktoren unabhängig vom Tumorstadium benötigt werden, um eine genauere Prognoseabschätzung und Individualisierung von Behandlungskonzepten zu erreichen.

Die Assoziation mit unterschiedlichen Tumorbiomarkern und dem Verhalten von KK wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. In diesen Analysen wurden eine Reihe von potenziell prognostisch bedeutsamen Parametern, darunter Proteine verantwortlich für Tumorentstehung und Tumorprogression, Zelltod, Tumorinvasion und Metastasierung miteinbezogen.

Gegenstand unserer Untersuchung war das RNA- bindende Protein LIN28 mit den Isoformen LIN28A und Lin28B. In unserer Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang mit der synchronen Lebermetastasierung sowohl bei der LIN28A-Expression als auch bei LIN28B-Expression nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Lymphknotenmetastasierung sowie Lymphgefäßinvasion. In der Literatur finden sich in Bezug auf das KK zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Die Studie von Wang et al. untersuchte das Verhalten und die Funktion von LIN28A und LIN28B im KK. (57) Dort konnte gezeigt werden, dass die LIN28B-Protein-Level bei PatientInnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant erhöht waren. Diese Korrelation konnte jedoch nicht bei LIN28A-Protein-Leveln und dem N-Status festgestellt werden. Dem gegenüber konnte gezeigt werden, dass die LIN28A-mRNA-Level einen signifikanten Zusammenhang in Bezug auf die Lymphknotenmetastasierung hatten, jedoch nicht die LIN28B-mRNA-Level. Des Weiteren waren die LIN28A-mRNA Expression bei PatientInnen mit Organmetastasen signifikant erhöht. Eine signifikante Korrelation zwischen der Prognose oder dem Überleben mit der LIN28A oder LIN28B Expression konnte nicht festgestellt werden. (57) Diese Ergebnisse deuten das heterogene Verhalten der LIN28 Homologe an und es wird vermutet, dass sie in unterschiedlicher Manier im Prozess der Metastasierung involviert sind. Ein Vergleich von histopathologischen Parameter mit dem immunhistochemischen Färbeverhalten wurde in der Studie von Wang et al. nicht vorgenommen. Jedoch wurde die Expressions-Frequenz des LIN28A und LIN28B Proteins der immunhistochemischen Färbung bestimmt. Dort zeigte sich eine hohe Expression von 100% bei LIN28B und von 88% bei LIN28A in KK. In unserer Studie zeigte sich ebenfalls eine hohe LIN28A-Expression von 100% und 99% bei LIN28B.

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der LIN28-Expression variieren in der Definition positiver Testergebnisse. Wang et al. beispielsweise unterschied bei der immunhistologischen Beurteilung zwischen negativer, niedriger, moderater und hoher Expression. Als Cut-off Werte wurde für die negative Expression 0%, für niedrige <25%, für moderate 25-50%, für starke >50% der Tumorzellenverfärbung angenommen. Als „positiv“ wurde jedoch jegliche LIN28-Expression gewertet. (57) Hamano et al. dem hingegen definierte die LIN28 Expression als hoch, wenn mehr als 50% der Tumorzellen gefärbt waren. Eine niedrige Expression lag vor, wenn 50% oder weniger der Karzinomzellen eine

Färbung aufzeigten. (58) Cao et al. definierte die LIN28-Expression ebenso wie wir, nämlich wie folgt: Die Färbeintensität wurde in die Kategorie **0**: keine Reaktivität, **1+**: schwach gefärbte Tumorzellen ($\leq 30\%$), **2+**: moderat gefärbte Tumorzellen (31-60%), **3+**: stark gefärbte Tumorzellen (61-90%) und **4+** sehr stark gefärbte Tumorzellen ($>90\%$) eingeteilt. (59) Des Weiteren entschieden sich verschiedene Forschungsgruppen für verschiedene Methoden der LIN28 Detektion. Als Verfahren kamen zum Beispiel die Immunhistochemie, Western blot, PCR oder Microarray Analysen zum Einsatz. Innerhalb der Immunhistochemie wurden zusätzlich verschiedene Antikörper verwendet. Diese methodischen Unterschiede machen eine vergleichende Interpretation der Ergebnisse schwierig. Daher ist es unumgänglich ein evidenzbasiertes Beurteilungssystem in der LIN28-Expression zu etablieren, um reproduzierbare und somit vergleichbare Ergebnisse bei der Erforschung von LIN28 zu erzielen.

Im Jahr 2011 postulierte King et al. die Theorie, dass eine Überexpression von LIN28B beim KK mit Tumorprogression und ungünstiger Prognose korreliert. (1) Außerdem zeigte King et al. im selben Jahr, dass LIN28B die Transformation von epithelialen Zellen des Dickdarms begünstigt und somit die Fähigkeit der Metastasenbildung durch den let-7-Pathway im KK bewirkt. (2) Sukzessiv zeigten mehrere Studien die Beteiligung von LIN28B bei der Tumorentstehung und Progression beim KK. (60, 61) Im Jahr 2015 analysierte Tu et al. die bis dato größte Kohorte (n=595) von PatientInnen mit KRK und stellten anhand von immunhistochemischen Färbungen eine Korrelation zwischen der LIN28A und LIN28B Expression mit sowohl invasiver Tumorpathologie als auch ungünstiger Prognose fest. (40) Außerdem wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LIN28A-Expression mit ungünstiger Prognose bei PatientInnen mit KRK im UICC Stadium I – III, jedoch nicht im Stadium IV festgestellt. Für die LIN28B-Expression konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. (40) In unserer Studie befanden sich aufgrund des Studiendesigns, einer zweiarmigen Fall-Kontroll-Studie, 50% der PatientInnen mit synchroner Lebermetastasierung im Stadium IV. Auch wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der LIN28A- und/oder LIN28B-Expression mit der Fernmetastasierung und der damit einhergehenden ungünstigen Prognose feststellen.

Die Forschergruppe von Tu et al., welche neben der größten Kohorte von PatientInnen mit KRK und zusätzlich in vivo das Verhalten der LIN28-Expression im

Mausmodell untersuchte, zeigte, dass beide LIN28 Isoforme die intestinale und kolorektale Tumorgenese, Wachstum und Invasivität fördern. Außerdem demonstrierten sie, dass die Aktivierung von LIN28 in Mäusen vom *Apc^{min/+}* Stamm eine wesentlich schnellere Tumorformation sowie invasivere Histologie bewirkte. Dem gegenüber konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der transgenetischen LIN28-Expression eine deutliche Tumordifferenzierung, geringere Invasivität und Tumorlast erzielte. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von LIN28 die Tumorprogression und Invasivität vorantreibt. (40) Als zugrunde liegender Mechanismus wird hierfür die LIN28/Let-7 Achse diskutiert. In mehreren Studien konnte in vivo gezeigt werden, dass beim KRK die LIN28 Expression hochreguliert, während die Biogenese von Let-7 niedrige Level aufzeigten. (2, 60, 62) Madison et al. konnte im Mausmodell demonstrieren, dass LIN28B ein klares onkogenetisches Potenzial innehat und eine wichtige Rolle in der Regulation der Let-7 miRNAs und dessen Kontrolle über das Wachstum von intestinalem Gewebe sowie Paneth Zell Differenzierung hat. Die individuelle Beteiligung der verschiedenen Let-7 miRNA sowie der Let-7 Gene konnte weniger genau dargelegt werden. (60) Die Forschergruppe um Zhang konnte in Zellkulturen von KRK zeigen, dass die erzwungene Expression von Let-7c die Apoptose induzierte und die Unterdrückung von LIN28 diese ebenso förderte. (62) Da das normale erwachsene intestinale Epithelium weder LIN28A noch LIN28B ausbildet ist die LIN28/Let-7 Achse ein gutes therapeutisches Ziel in der Behandlung des KRK, da nur minimale Effekte auf die intestinale Homöostase zu erwarten sind. Außerdem würde die Antagonisierung von LIN28 die Tumorzelldifferenzierung induzieren und könnte dadurch einen günstigen Effekt in Kombination mit der Chemotherapie aufweisen.

Die Ergebnisse der Mausmodelle sind jedoch nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Die aktuellen Mausmodelle für die Erforschung des KRK, inklusive des *APC^{Min/+}* Modells, verfehlen die Manifestation eines invasiven Karzinoms und somit auch die Widerspiegelung der Tumorpathologie eines KRKs im Spätstadium. Außerdem manifestieren sich die Tumoren meist im Dünndarm und nicht, wie beim Menschen, im Dickdarm. Es wird vermutet, dass die Inzidenz der Tumorformation mit der Anzahl von Stammzellen korreliert, welche sich bei der Maus vermehrt im Dünndarm befinden. (40) Daraus ist zu schließen, dass vor allem im Blick auf KRK im Spätstadium keine ausreichenden Ergebnisse der LIN28-Expression und dessen Auswirkungen auf die Tumorpathologie vorliegen. Es gibt

lediglich Hinweise, dass vor allem LIN28B im Mausmodell sowohl die Tumorentstehung als auch die Tumorprogression beeinflussen. (1, 2, 40, 60)

Takahashi und Parks haben einige Gene identifiziert, welche normalerweise in menschlichen embryonalen Stammzellen exprimiert und nun dazu benutzt werden künstlich Stammzellen zu erschaffen. Diese werden als sogenannte ‚induzierte pluripotente Stammzellen‘ (iPS) bezeichnet. (63-65) iPS entstehen durch die Einschleppung spezifischer Gene, die durch Induktion zur Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes beitragen. Das Vorhandensein von Alterationen oder Deletionen von iPS-verwandten Genen in humanen Tumorgewebe könnte möglicherweise dazu führen, dass sich Stammzellen differenzieren und vermehren. Eine solche Störung der Stammzellenfunktion könnte dadurch zur Karzinogenese und / oder Tumorprogression beitragen. (63-66) LIN28, SOX2, c-MYC, OCT3/4, KLF4 und NANOG wurden als iPS-verwandte Gene identifiziert. (66, 67) In der Studie von Saiki et al. wurde mit Hilfe von Laser-Mikrodissektion und Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) die genetischen Effekte der iPS-Gene auf klinisch-pathologische Faktoren in 79 Fällen von KRK untersucht. (66) Die Daten der Studie legen nahe, dass die LIN28-Expression stark mit dem Grad der Lymphknotenmetastasierung bei PatientInnen mit KRK korreliert. Die LIN28 Expression war in Dukes Stadium C / UICC-Stadium III signifikant höher als in jeglichen anderen Stadien. Des Weiteren korrelierten erhöhte SOX2-Expressionsniveaus mit zunehmenden Graden an Lymphknotenmetastasen. (66) Zusätzlich wurde festgestellt, dass SOX2 in Fällen mit Fernmetastasierung (Dukes D bzw. UICC-Stadium IV) in signifikant höheren Konzentrationen als in nicht-metastasierten Fällen von KRK exprimiert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine erhöhte SOX2-Expression eng mit einer hämatogenen und/oder lymphogenen Metastasierung im KRK verbunden ist. (66) Die Studie von Neumann et al., welche an demselben Kollektiv von PatientInnen mit KK durchgeführt wurde, konnte ebenso zeigen, dass die SOX2 Expression signifikant mit der lymphogenen als auch hämatogenen Metastasierung korrelierte. (3) Lymphknoten- und Fernmetastasen sind beide unabhängige Prognosefaktoren, die mit einem schlechten Überleben bei KK korrelieren. (3) So steht dies im Einklang mit der Literatur, welche die SOX2-Expression in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose und einem verringerten Gesamtüberleben bei Dickdarmkarzinomen stellen. (68, 69) Auch in unserer Studie zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang

der LIN28-Expression und der SOX2-Expression, jedoch kein Zusammenhang in Bezug auf Lymphknoten- oder Lebermetastasierung (siehe Tabelle 5-7). Es ist anzumerken, dass die LIN28A und/oder LIN28B-Expression mit der SOX2-Expression und die SOX2-Expression mit der Fernmetastasierung korreliert, jedoch die LIN28A/B-Expression in derselben Kohorte nicht mit der Fernmetastasierung in einem signifikanten Zusammenhang steht. Um dieses Problem weiter zu untersuchen, korrelierten wir die SOX2-Expression mit zuvor veröffentlichten Daten zu CD133, einem etablierten Marker für Tumorstammzellen, der eine schlechte Prognose und Fernausbreitung bei KK vorhersagt. (3, 70-72) Unerwarteterweise konnte in unserer Kohorte von KK-PatientInnen keine signifikante Korrelation zwischen der SOX2- und CD133-Expression und der LIN28A/B und CD133-Expression nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5-7). (3) Neben der gemeinsamen Eigenschaft von LIN28 und SOX2 somatische Zellen zu reprogrammieren und Pluripotenz zu induzieren weisen beide Proteine auch einen Einfluss auf den WNT-Signalweg auf. (3, 44) SOX2 unterdrückt die Aktivitäten von β -catenin, weshalb es zu einer Störung des WNT/ β -catenin Signalweges kommt. Die genauen Auswirkungen dieser Fehlregulation sind derzeit nicht bekannt. Eine erhöhte β -catenin Expression ist ebenfalls mit Tumorprogression und einer ungünstigen Prognose assoziiert. (3) Die Studie von Tu et al. konnte zeigen, dass im Mausmodell die Überexpression von LIN28A oder LIN28B ebenfalls mit dem WNT Signalweg zusammenwirkt und dadurch die Invasivität des intestinalen Adenokarzinoms gefördert wird. (40) In unserer Studie konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Es ist daher zu vermuten, dass neben dem WNT-Signalweg noch andere Mechanismen die Tumorentstehung und -progression beeinflussen, welche jedoch nicht aus unseren Daten ablesbar sind. Hierfür werden weitere Studien benötigt.

Beim KK ist der Nachweis eines Mismatchreparaturdefekt (MMRD) bzw. einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) neben dem Tumorstadium der wichtigste unabhängige prognostische Marker. Dickdarmkarzinome mit MMRD bzw. MSI im UICC-Stadium II und III weisen signifikant besseres Überleben auf. (73-75) Dabei zeigen Dickdarmkarzinome mit MSI weniger lymphogene oder hämatogene Metastasierung und somit niedrigere Tumorstadien als Mikrosatellitenstabile - KK. Insbesondere die Fernmetastasierungsrate beträgt bei MSS-KRK 27% im Vergleich zu nur 7,9% bei KRK mit MSI. In der Folge findet man MSI auch nur in maximal 2,7% der Lebermetastasen von KRK. (74, 76) In unserer Studie spiegelt sich diese

Raten wider. So liegt bei 83% der KK PatientInnen eine MSS vor, während, studienbedingt, bei 50% der PatientInnen eine hämatogene Fernmetastasierung vorliegt. Nur bei einer von vierzehn PatientInnen zeigte sich eine MSI bei gleichzeitiger synchroner Lebermetastasierung, dies entspricht einer Rate von 7,1%. In unserer Kohorte zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LIN28A-Expression und der MSS. Es wird vermutet, dass der ungünstige Krankheitsverlauf bei MSS-KK mit einer zunehmenden Fehlregulation des WNT-Signalwegs korreliert. (36) Dieser zugrunde liegende Mechanismus wird auch von LIN28 beeinflusst. Bisher finden sich in der Literatur nach bestem Gewissen keine Studien, die den Zusammenhang zwischen LIN28 und der MSI bzw. MSS untersucht haben. Um die Frage der Tumorprogression beim Menschen im Zusammenhang der LIN28 Expression zu klären, sind weitere Studien, die neue Einblicke in die molekularen Veränderungen von KK ermöglichen, nötig.

Viele Studien legten nahe, dass LIN28A und LIN28B hohe Expression bei Malignomen zeigt und, indem sie die Transformation und das Fortschreiten des Tumors fördern, als Onkogene fungieren. (1, 37, 40, 49, 57, 77) Ebenso konnten in unserer Studie die Ergebnisse einer hohen LIN28A und LIN28B Expression im KK klar bestätigt werden. Hieraus könnten sich neue Therapieziele für die individualisierte, zielgerichtete Krebstherapie mit einer Verringerung der Nebenwirkungen ergeben.

Literaturverzeichnis

1. King CE, Cuatrecasas M, Castells A, Sepulveda AR, Lee JS, Rustgi AK. LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer research*. 2011;71(12):4260-8.
2. King CE, Wang L, Winograd R, Madison BB, Mongroo PS, Johnstone CN, et al. LIN28B fosters colon cancer migration, invasion and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms. *Oncogene*. 2011;30(40):4185-93.
3. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Luque RM, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC cancer*. 2011;11:518.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
5. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016;25(1):16-27.
6. Brenner H, Schrotz-King P, Holleczeck B, Katalinic A, Hoffmeister M. Declining Bowel Cancer Incidence and Mortality in Germany. *Deutsches Arzteblatt international*. 2016;113(7):101-6.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
8. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Molecular pathology : MP*. 2001;54(4):206-14.
9. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9927):1490-502.
10. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-8.
11. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer management and research*. 2014;6:291-300.

12. Chew MH, Yeo SA, Ng ZP, Lim KH, Koh PK, Ng KH, et al. Critical analysis of mucin and signet ring cell as prognostic factors in an Asian population of 2,764 sporadic colorectal cancers. *International journal of colorectal disease*. 2010;25(10):1221-9.
13. Du W, Mah JT, Lee J, Sankila R, Sankaranarayanan R, Chia KS. Incidence and survival of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: a population-based study from an Asian country. *Diseases of the colon and rectum*. 2004;47(1):78-85.
14. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Schlemmer A, et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis? *Histopathology*. 2012;60(7):1060-72.
15. Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis DR, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer*. 2006;107(5 Suppl):1128-41.
16. Hyngstrom JR, Hu CY, Xing Y, You YN, Feig BW, Skibber JM, et al. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(9):2814-21.
17. Kang H, O'Connell JB, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Diseases of the colon and rectum*. 2005;48(6):1161-8.
18. Nitsche U, Zimmermann A, Spath C, Muller T, Maak M, Schuster T, et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Annals of surgery*. 2013;258(5):775-82; discussion 82-3.
19. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer; 2010.
20. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(10):2479-516.

21. Washington MK. Colorectal carcinoma: selected issues in pathologic examination and staging and determination of prognostic factors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(10):1600-7.
22. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(19):1420-5.
23. Quirke P, Dyson JE, Dixon MF, Bird CC, Joslin CA. Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *British journal of cancer*. 1985;51(1):99-106.
24. Max N, Cathomas G, Langner C. Carcinomas with Lymphoid Stroma within the Gastrointestinal Tract: Histology and Molecular Pathology. *Journal of Surgical and Molecular Pathology*. 2016;1(1):3-18.
25. Mekenkamp LJ, Heesterbeek KJ, Koopman M, Tol J, Teerenstra S, Venderbosch S, et al. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(4):501-9.
26. Resch A, Schneider NI, Langner C. Pathological evaluation of colorectal cancer specimens: advanced and early lesions. *Ceskoslovenska patologie*. 2015;51(1):12-22.
27. Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, Sukumar S, Karunamurthy A, Pragatheeshwar KD, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *International journal of oncology*. 2010;37(4):901-7.
28. Thota R, Fang X, Subbiah S. Clinicopathological features and survival outcomes of primary signet ring cell and mucinous adenocarcinoma of colon: retrospective analysis of VACCR database. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2014;5(1):18-24.
29. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Kornprat P, Schlemmer A, Rehak P, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118(3):628-38.
30. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer--pathobiological pathways with clinical significance. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(14):3719-37.

31. Pretzsch E, Bosch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of oncology*. 2019;2019:7407190.
32. Sluiter N, de Cuba E, Kwakman R, Kazemier G, Meijer G, Te Velde EA. Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options. *Clinical & experimental metastasis*. 2016;33(5):401-16.
33. de Cuba EM, Kwakman R, van Egmond M, Bosch LJ, Bonjer HJ, Meijer GA, et al. Understanding molecular mechanisms in peritoneal dissemination of colorectal cancer : future possibilities for personalised treatment by use of biomarkers. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;461(3):231-43.
34. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(34):7692-707.
35. Marcuello M, Mayol X, Felipe-Fumero E, Costa J, Lopez-Hierro L, Salvans S, et al. Modulation of the colon cancer cell phenotype by pro-inflammatory macrophages: A preclinical model of surgery-associated inflammation and tumor recurrence. *PloS one*. 2018;13(2):e0192958.
36. Neumann J, Horst D, Kriegl L, Maatz S, Engel J, Jung A, et al. A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer. *Histopathology*. 2012;60(3):416-26.
37. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, et al. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature genetics*. 2009;41(7):843-8.
38. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)*. 1984;226(4673):409-16.
39. Chatterji P, Rustgi AK. RNA Binding Proteins in Intestinal Epithelial Biology and Colorectal Cancer. *Trends in molecular medicine*. 2018;24(5):490-506.
40. Tu HC, Schwitalla S, Qian Z, LaPier GS, Yermalovich A, Ku YC, et al. LIN28 cooperates with WNT signaling to drive invasive intestinal and colorectal adenocarcinoma in mice and humans. *Genes & development*. 2015;29(10):1074-86.

41. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434(7035):843-50.
42. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics*. 2008;40(5):499-507.
43. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell*. 2008;2(2):151-9.
44. Zhang J, Ratanasirintrawoot S, Chandrasekaran S, Wu Z, Ficarro SB, Yu C, et al. LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell stem cell*. 2016;19(1):66-80.
45. Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, van Gurp RJ, Swartzman E, Cribbes S, et al. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *International journal of andrology*. 2011;34(4 Pt 2):e160-74.
46. Nguyen LH, Robinton DA, Seligson MT, Wu L, Li L, Rakheja D, et al. Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models. *Cancer cell*. 2014;26(2):248-61.
47. Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiyeh EF, Hou C, et al. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nature genetics*. 2012;44(10):1126-30.
48. Urbach A, Yermalovich A, Zhang J, Spina CS, Zhu H, Perez-Atayde AR, et al. Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes & development*. 2014;28(9):971-82.
49. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*. 2011;147(5):1066-79.
50. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, et al. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009;460(7257):909-13.
51. Zhou J, Ng SB, Chng WJ. LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(5):973-8.

52. Neumann JH. [Prognostic biomarkers for metastatic colorectal cancer]. *Der Pathologe*. 2016;37(Suppl 2):180-5.
53. Bosman F CF, Hruban R, Theise N. WHO classification of tumours of the digestive system.: Lyon : IARC Press; 2010.
54. Brierley J GM, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Oxford: John Wiley & Sons; 2017.
55. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019. AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 29.11.2019] [
56. Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA, Bokemeyer C, Langner C. Peritumoral eosinophils predict recurrence in colorectal cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2015;28(3):403-13.
57. Wang T, He Y, Zhu Y, Chen M, Weng M, Yang C, et al. Comparison of the expression and function of Lin28A and Lin28B in colon cancer. *Oncotarget*. 2016;7(48):79605-16.
58. Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Sugimura K, Tanaka K, Kurokawa Y, et al. High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(8):1415-23.
59. Cao D, Allan RW, Cheng L, Peng Y, Guo CC, Dahiya N, et al. RNA-binding protein LIN28 is a marker for testicular germ cell tumors. *Human pathology*. 2011;42(5):710-8.
60. Madison BB, Liu Q, Zhong X, Hahn CM, Lin N, Emmett MJ, et al. LIN28B promotes growth and tumorigenesis of the intestinal epithelium via Let-7. *Genes & development*. 2013;27(20):2233-45.
61. Ye Y, Madison B, Wu X, Rustgi AK. A LIN28B polymorphism predicts for colon cancer survival. *Cancer biology & therapy*. 2012;13(14):1390-5.
62. Zhang H, Zong Y, Qiu G, Jia R, Xu X, Wang F, et al. Silencing Lin28 promotes apoptosis in colorectal cancer cells by upregulating let7c targeting of antiapoptotic BCL2L1. *Molecular medicine reports*. 2018;17(4):5143-9.

63. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6.
64. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
65. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
66. Saiki Y, Ishimaru S, Mimori K, Takatsuno Y, Nagahara M, Ishii H, et al. Comprehensive analysis of the clinical significance of inducing pluripotent stemness-related gene expression in colorectal cancer cells. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(9):2638-44.
67. Voutsadakis IA. The pluripotency network in colorectal cancer pathogenesis and prognosis: an update. *Biomarkers in medicine*. 2018;12(6):653-65.
68. Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2010;23(3):450-7.
69. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(12):3488-98.
70. Horst D, Kriegl L, Engel J, Jung A, Kirchner T. CD133 and nuclear beta-catenin: the marker combination to detect high risk cases of low stage colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2009;45(11):2034-40.
71. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(8):1285-9.
72. Horst D, Scheel SK, Liebmann S, Neumann J, Maatz S, Kirchner T, et al. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *The Journal of pathology*. 2009;219(4):427-34.

73. Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(23):8332-40.
74. Neumann JH, Jung A, Kirchner T. [Molecular pathology of colorectal cancer]. *Der Pathologe*. 2015;36(2):137-44.
75. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *The British journal of surgery*. 2000;87(9):1197-202.
76. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, et al. Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(13):3831-9.
77. Zhang J, Xu A, Miao C, Yang J, Gu M, Song N. Prognostic value of Lin28A and Lin28B in various human malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Cancer cell international*. 2019;19:79.