

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

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Prognosemarkeranalyse bei kolorektalen Karzino-
men unter Nutzung einer neuen softwareunter-
stützten Mess- und Bewertungsmethode**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karim Yefsah

Mellrichstadt

2021

**Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. David Horst

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Jutta Nagel
Prof. Dr. med. Andreas Eigler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2021

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Prognosemarkeranalyse bei kolorektalen Karzinomen unter Nutzung einer neuen softwareunterstützten Mess- und Bewertungsmethode“

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, den 20.10.2021

Karim Yefsah

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Kolorektales Karzinom	1
1.1.1 Allgemeines und Grundlagen	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	3
1.1.3 Screening, Diagnose und Klassifikation	6
1.1.4 Therapie, Prognose und Nachsorge	9
1.2 Heterogenität und Plastizität von Tumorzellen	11
1.3 WNT-Signalweg	14
1.3.1 Grundlagen des WNT-Signalwegs	14
1.3.2 Unterschiedliche WNT-Aktivität in kolorektalen Karzinomen	18
1.4 Glykoprotein A33	20
2. Ziele der Arbeit	23
3. Materialien, Datensätze und Software	24
3.1 Tissue Microarrays	24
3.2 GPA33-Antikörper	24
3.3 VENTANA BenchMark XT Färbesystem	24
3.4 Gewebescanner Nanozoomer SQ	25
3.5 Mikroskope	27
3.6 Datensätze	27
3.7 Softwareprogramme	28
4. Methodik	29
4.1 Arbeitsschritte zur Beurteilung der Expression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen	29
4.2 Vergleich der Expression von GPA33 mit der WNT-Aktivität und der β -Catenin- Expression	30
4.3 Entwicklung, Anwendung und Validierung einer objektivierte Quantifizierungsmethode für GPA33	31
4.4 Vergleich der GPA33-Expressionsdaten mit den Outcome-Daten der CRC- Patienten	34

5. Ergebnisse.....	35
5.1 Darstellung der Expression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen	35
5.2 Beurteilung des Zusammenhangs von GPA33 mit der WNT-Aktivität und der β -Catenin-Expression bei kolorektalen Karzinomen	37
5.2.1 Darstellung der GPA33-Genexpression bei niedriger und hoher WNT-Aktivität	37
5.2.2 Vergleich der Expression von β -Catenin und GPA33.....	38
5.3 Darstellung und Validierung der objektivierten Quantifizierungsmethode für GPA33.....	40
5.3.1 Grundlagen und Messvorgang	40
5.3.2 Validierung der Messmethode.....	43
5.4 Überprüfung der Eignung von GPA33 als prognostischer Marker	47
5.4.1 Nachweis am TCGA-Kollektiv	47
5.4.2 Validierung am UICCII-Patientenkollektiv	48
5.4.2.1 Klinische Daten des UICCII-Patientenkollektivs	49
5.4.2.2 Analyse des tumorspezifischen Überlebens.....	50
5.4.2.3 Analyse des progressionsfreien Überlebens	54
6. Diskussion	58
6.1 Heterogene Verteilung von GPA33 in kolorektalen Karzinomen	58
6.2 Bedeutung der inversen Korrelation der GPA33-Expression mit der WNT-Aktivität.....	59
6.3 Weitere Einsatzmöglichkeiten der neuen, objektivierten und softwareunterstützten Quantifizierungsmethode	60
6.4 Bedingte Eignung von GPA33 als prognostischer Biomarker.....	62
7. Zusammenfassung	65
Literaturverzeichnis	III
Danksagung	IV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Häufigkeitsverteilung kolorektaler Karzinome.....	2
Abbildung 2: Stufenschema der Kolonkarzinogenese	4
Abbildung 3: Darstellung der Hallmarks of Cancer	5
Abbildung 4: TNM-Klassifikation bei kolorektalen Karzinomen.....	8
Abbildung 5: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	8
Abbildung 6: Modell der Tumorerheterogenität.....	12
Abbildung 7: Abbildung der Haupt-WNT-Signalwege	15
Abbildung 8: Gegenüberstellung des inaktivierten und aktivierten WNT/ β -Catenin-abhängigen Signalwegs.....	17
Abbildung 9: VENTANA BenchMark XT Färbesystem.....	25
Abbildung 10: Darstellung des Nanozoomers SQ der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH	26
Abbildung 11: Übersicht des Dekonvolutionsschritts	32
Abbildung 12: Abbildung der Threshold-Umwandlung.....	33
Abbildung 13: Gegenüberstellung der GPA33-Färbung bei normaler Darmschleimhaut und CRC-Schleimhaut.....	35
Abbildung 14: Abbildung der heterogenen Verteilung von GPA33 innerhalb des Tumors	36
Abbildung 15: Heatmap der Genexpressionsverteilung bei hoher und niedriger WNT-Aktivität.....	37
Abbildung 16: Gegenüberstellung der intratumoralen GPA33-Färbung mit der intratumoralen β -Catenin-Färbung.....	39
Abbildung 17: Vergleich der intratumoralen Verteilung der GPA33- und β -Catenin-Expression mit der WNT-Aktivität	39
Abbildung 18: Darstellung der Analyseschritte der Software Fiji im Haupttumorbereich des CRCs	41
Abbildung 19: Darstellung der Analyseschritte der Software Fiji im Tumordinvasionsfrontbereich des CRCs	42
Abbildung 20: Mittelwertvergleich des Haupttumors und der Tumordinvasionsfront bei Thresholdwerten 160 und 200.....	45
Abbildung 21: Regressionsanalyse zur Validierung der neuen Messmethode	46

Abbildung 22: ROC-Kurven- und Kaplan-Meier-Analyse des TCGA-Patientenkollektivs	48
Abbildung 23: ROC-Kurvenanalyse für das tumorspezifische Überleben.....	51
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse für das tumorspezifische Überleben	52
Abbildung 25: ROC-Kurvenanalyse für das progressionsfreie Überleben	55
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Analyse für das progressionsfreie Überleben.....	56

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Allgemeines und Grundlagen

In Anlehnung an die von der World Health Organisation veröffentlichten Zahlen wurde Krebs mit erwarteten 9,6 Millionen Todesfällen für das Jahr 2018 als eine der führenden Todesursachen weltweit eingeordnet. Kolorektale Karzinome (CRC) stellen dabei mit voraussichtlich 1,8 Millionen Erkrankungsfällen und geschätzten 860.000 Todesfällen die dritthäufigste Krebsart und die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen dar (Demeyer et al., 2007; Jemal et al., 2009; Torre et al., 2015; World Health Organisation, 2020). 70 Prozent aller Krebstodesfälle kommen in Ländern mit geringem oder mittlerem Einkommen vor. Als Hauptgrund werden häufig die mangelnden Diagnose- und Therapiemöglichkeiten in diesen Ländern genannt. Im Gegensatz zu einer Rate von 90 Prozent in Ländern mit hohem Einkommen, werden in weniger als 30 Prozent der Länder mit geringem Einkommen Behandlungsdienstleistungen als grundsätzlich verfügbar beschrieben (World Health Organisation, 2020).

Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigen neben den allgemeinen Befunden der B-Symptomatik, häufig auch gastrointestinale Auffälligkeiten. Die Patienten stellen sich unter anderem mit Blut im Stuhl (sichtbar oder okkult), Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Obstipationen, Anämien oder auch Diarrhöen klinisch vor. Besonders bei älteren Menschen sollten Änderungen der Stuhlgewohnheit über einen Zeitraum von über drei Wochen und perianale Blutungen stets als karzinomverdächtig eingeordnet werden (Strul und Arber, 2002; Berry et al., 2019). Die auftretende Symptomatik beim CRC hängt dabei besonders von der Lokalisation des Tumors ab. In Abbildung 1 wird die Häufigkeitsverteilung des CRCs schematisch dargestellt (Kasper et al., 2005). Im Allgemeinen kann eine Unterteilung der Symptomatik in einen rechts- und linksseitigen Hemikolonbefall vorgenommen werden. Bei einem rechtsseitigen Befall werden häufig okkultes Blut, Teerstühle, eine mikrozytäre Anämie und ein Leistungsknick beobachtet. Ein linksseitiger Befall äußert sich dagegen durch Blutauflagerungen im Stuhl, Stuhlnunregelmäßigkeiten, paradoxe Diarrhöen und Obstipationen (Kasper et al., 2005).

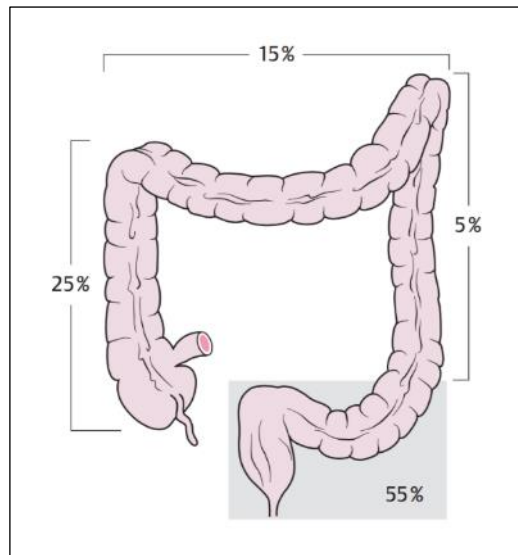


Abbildung 1: Übersicht der Häufigkeitsverteilung kolorektaler Karzinome. Schematische Darstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung kolorektaler Karzinome. Der höchste Verteilungswert zeigt sich hierbei im distalen Abschnitt des kolorektalen Bereichs. (Modifiziert nach Kasper et al., 2005)

Die Tumorausbreitung erfolgt primär polypoid in Richtung des Darmlumens, wobei auch eine infiltrative Beteiligung über die Muscularis propria hinaus in die Serosa möglich ist. Zudem kann beim CRC eine lymphogene und eine hämatogene Ausbreitung verzeichnet werden (Kasper et al., 2005). Die lymphogene Ausbreitung wird aufgrund des Tumorsitzes in drei Ebenen eingeteilt, die zwischen einer und drei sogenannten Metastasestraßen beinhalten. Als Referenzpunkt wird dabei der Abstand des Tumors zur Anokutanlinie betrachtet. Sitzt der Tumor mehr als 8 cm oberhalb der Anokutanlinie, dann metastasiert das CRC in die paraaortalen Lymphknoten (1. Metastasierungsstraße). Befindet sich der Tumor in der mittleren Etage, die 4 bis 8 cm proximal der Anokutanlinie liegt, dann wird zusätzlich die Beckenwand infiltriert (2. Metastasierungsstraße). Tritt das CRC in tiefer Lage von 0 bis 4 cm oberhalb der Anokutanlinie auf, kommen außerdem noch zusätzlich die inguinalen Lymphknoten als Metastasierungsort dazu (3. Metastasierungsstraße). Hämatogen metastasiert das CRC generell zunächst in die Leber und erst anschließend in die Lunge, Skelett und Hirn. Eine Ausnahme bilden dabei die tiefsitzenden Rektumkarzinome, die über die V. cava auch direkt in die Lunge metastasieren können (Kasper et al., 2005; Javarsiani et al., 2019). Dickdarmkarzinome entstehen zu 95 Prozent auf der Basis von Adenomen (Adenom/Dysplasie/Karzinom-Sequenz), weshalb Adenokarzinome den größten histologischen Subtyp darstellen. Weitere, jedoch deutlich seltenere Subtypen, sind das muzinöse Karzinom, das Siegelringkarzinom, das adenosquamöse, das medulläre und das

undifferenzierte Karzinom. Circa 5 Prozent aller Kolonkarzinome werden in diesem Zusammenhang auf genetische Faktoren zurückgeführt (Corley et al., 2015; Ballester et al., 2016; Kanth et al., 2017).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie von Dickdarmkrebs ist noch nicht vollkommen geklärt, jedoch kann sicher gesagt werden, dass neben genetischen Faktoren wie die Polyposis- und die Non-Polyposis-Syndrome auch Umwelteinflussfaktoren für die Tumorentstehung verantwortlich sind (Song et al., 2015; Kanth et al., 2017).

In diesem Zusammenhang müssen vor allem die Ernährungsfaktoren genauer betrachtet werden. Als potenziell kanzerogen werden der Konsum von fettreicher Nahrung, rotem Fleisch und ballaststoffarmer Kost beschrieben. Dagegen wird faser- und ballaststoffreicher Ernährung ein mildernder Effekt auf das Karzinomrisiko zugesprochen (Giovannucci, 2002; Yang et al., 2016; Balhareth et al., 2019). Zudem müssen der Konsum von Alkohol und Nikotin, sportliche Inaktivität, Übergewicht, die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) und ein hohes Alter als weitere Risikofaktoren für das CRC aufgelistet werden (Kasper et al., 2005). Wie bereits beschrieben entstehen 95 Prozent der CRCs auf dem Boden von Adenomen. Adenome sind neoplastische Kolonpolypen, die ein malignes Entartungsrisiko mit sich tragen und so in ein Kolonkarzinom übergehen können (Adenom-Karzinom-Sequenz). Auf histologischer Ebene werden die Kolonpolypen in neoplastische (95 Prozent) und nicht-neoplastische Polypen (5 Prozent) unterschieden, wobei etwa 90 Prozent aller Kolonpolypen zur Gruppe der Adenome gehören. Es kann davon ausgegangen werden, dass circa 5 Prozent aller Adenome entarten (Binefa et al., 2014; Corley et al., 2015). In Abbildung 2 werden die Entwicklungsschritte vom normalen Epithel des Dickdarms, über die Zwischenschritte des hyperproliferativen Epithels und des Adenoms hin zum Karzinom schematisch dargestellt. Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt, dass sich ein Adenom über Dysplasie zum Karzinom entwickelt.

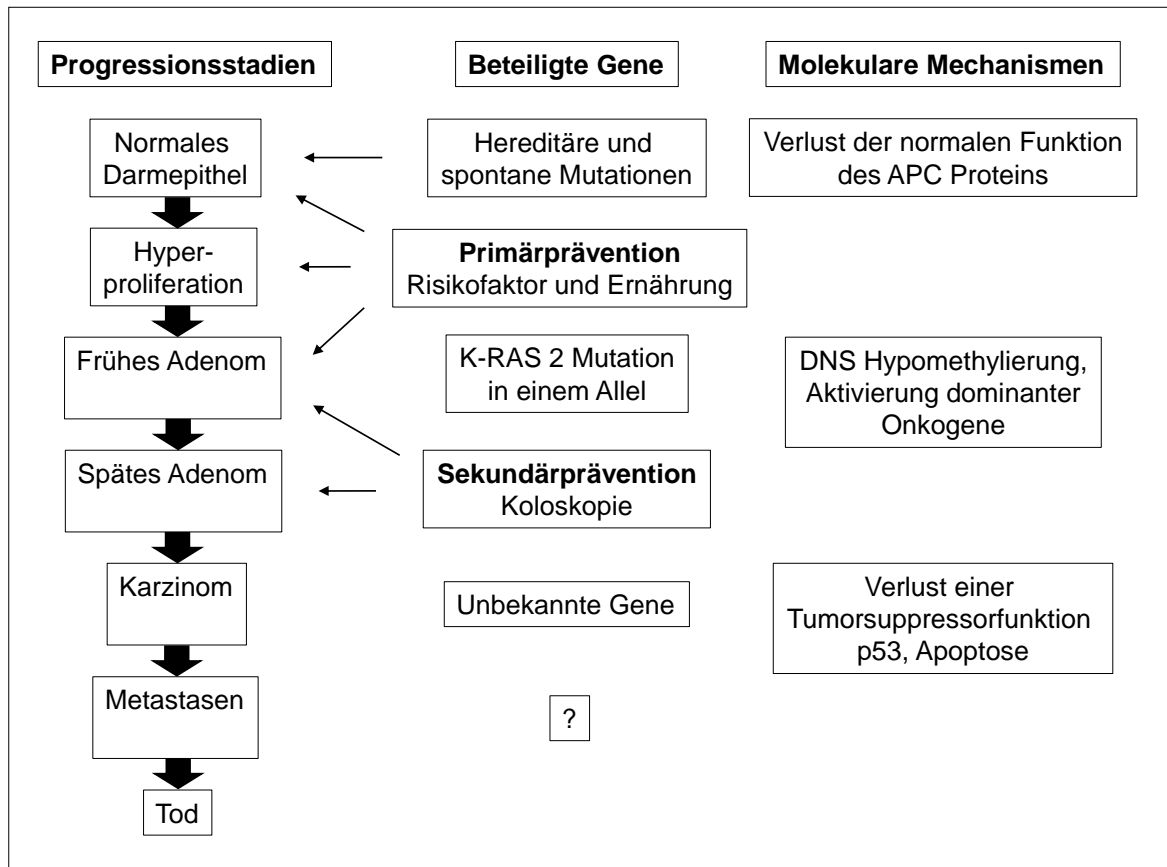


Abbildung 2: Stufenschema der Kolonkarzinogenese. Darstellung der einzelnen Progressionsstadien der Kolonkarzinogenese (Links) unter Berücksichtigung der beteiligten Gene und möglicher Präventionszeitpunkte (Mitte). Zudem Betrachtung der jeweiligen molekularen Mechanismen der einzelnen Progressionsstadien (Rechts). Abbildung übernommen von Hurrelmann et al., 2014.

Nach dem Stufenmodell von Vogelstein werden drei Schritte beschrieben. Im ersten Schritt führt eine Mutation im APC (adenomatous polyposis coli) Gen zur Bildung von adenomatösen Polypen. Daraufhin finden im zweiten Schritt nun onkogene K-RAS-Mutationen statt, welche schließlich mit der p53-Genmutation und den Deletionen auf dem Chromosom 18q im dritten Schritt zur malignen Entartung der Adenome führen (Lech et al., 2016). Besonders die Mutationen im APC-Gen, aber auch im β -Catenin-Gen führen zu einer Aktivierung des WNT-Signalwegs, auf welchen im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch stärker eingegangen wird.

Dickdarmkrebs entsteht durch mehrstufige Prozesse, die durch genetische und epigenetische Veränderungen bestimmt werden. Dabei spielen vor allem Genmutationen, die zu einer Aktivierung von onkogenetischen Signalwegen und zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, eine wichtige Rolle (Fearon und Vogelstein,

1990). Diese Mutationen führen dazu, dass normales Gewebe neue spezifische Eigenschaften erlangt, welche dazu führen, dass der Tumor unkontrolliert wachsen kann (Hanahan und Weinberg, 2000 und 2011). Die neu gewonnenen Eigenschaften werden als Hallmarks of Cancer bezeichnet. Einen Überblick über die wichtigsten neu gewonnenen, spezifischen Eigenschaften liefert Abbildung 3.

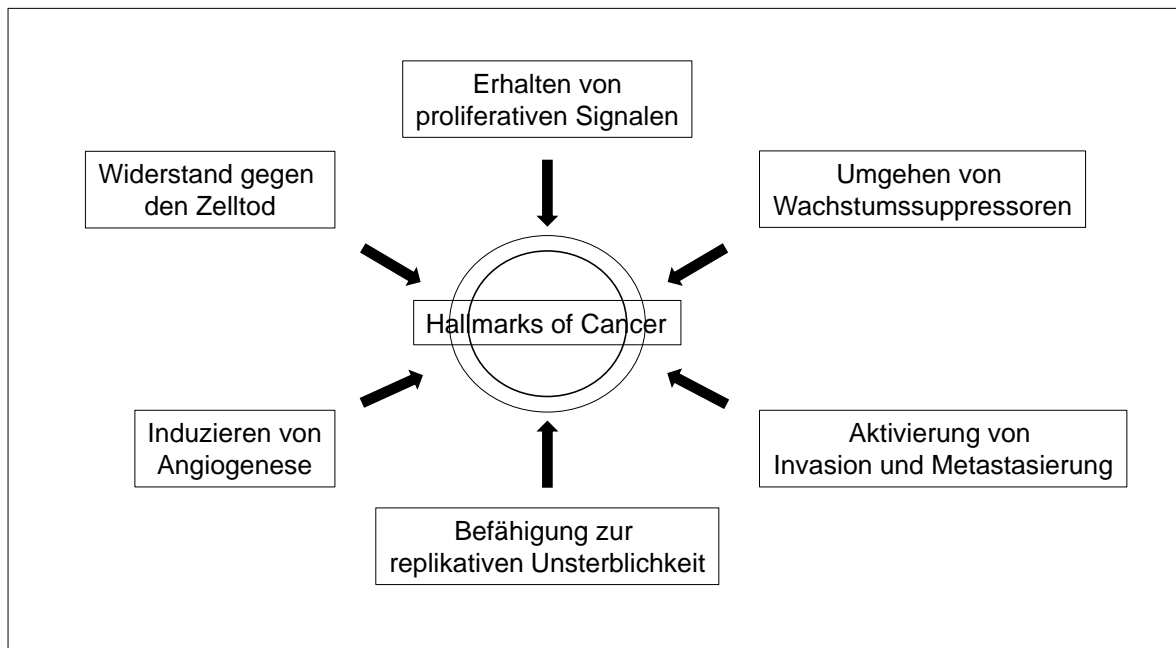


Abbildung 3: Darstellung der Hallmarks of Cancer. Schematische Übersicht der wichtigsten neu gewonnenen, spezifischen Eigenschaften von Tumorgewebe. Geführt werden die neu gewonnenen Eigenschaften unter dem Begriff Hallmarks of Cancer. Abbildung übernommen von Hanahan und Weinberg, 2011.

Insgesamt werden unter den Hallmarks of Cancer bis zum heutigen Tag 10 Kennzeichen beschrieben. Dazu gehören die „Selbstgenügsamkeit bei Wachstumssignalen“, die „Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstums-Signalen“, die „Gewebsinvasion und Metastasierung“, das „unbegrenzte Potential für die Zellteilung“, die „nachhaltige Bildung neuer Blutgefäße“, das „Umgehen des Apoptose-Zelltods“, der „deregulierte Metabolismus“, die „genomische Instabilität“, die „durch den Tumor ausgelösten entzündlichen Prozesse“ und das „Vermeiden von Zerstörung durch das Immunsystem“ (Hanahan und Weinberg, 2011; Gerdes et al., 2014). Jedoch werden nicht immer alle Eigenschaften zugleich vom selben Tumor ausgebildet, sondern die Anzahl der erwor-

benen Fähigkeiten variiert von Individuum zu Individuum und zeigt auch große Unterschiede in Bezug auf das jeweilige Organsystem und das Tumorstadium (Gerdes et al., 2014).

1.1.3 Screening, Diagnose und Klassifikation

Da die Prognose des CRCs sehr stark vom Fortschreiten der Tumorerkrankung abhängig ist, ist es sinnvoll die Diagnose des CRCs in einem möglichst frühen Stadium der Erkrankung zu stellen (Hall et al., 2015). Hierbei soll ähnlich wie beim strukturierten Mammographie-Früherkennungsprogramm bei Brustkrebs ein organisiertes Darmkrebs-Screeningprogramm unterstützen. Der Gemeinsame Bundesausschuss stellte bereits am 19. Juli 2018 die neuen Screeningrichtlinien für Darmkrebs vor. Nach dem Entschluss des Bewertungsausschusses über die Höhe der Vergütung im einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) können die neuen Leistungen seit dem 19. April 2019 in Anspruch genommen werden. Die neuen Richtlinien sehen neben einer regelmäßigen Einladung zur Darmkrebsvorsorge auch die Vermittlung von Informationen über die Krankheit, die Untersuchungen und die Datennutzung vor. Als basisdiagnostische Maßnahmen werden weiterhin, wie bisher auch, die Kontrolle auf Blut im Stuhl über einen immunologischen Test (iFOBT) und die Koloskopie empfohlen. In diesem Zusammenhang wird für Frauen die Darmspiegelung ab dem 55. und für Männer, auf Grund des höheren Risikos, bereits ab dem 50. Lebensjahr angeboten, die bei unauffälligem Befund nach 10 Jahren einmalig wiederholt werden sollte. Mit Hilfe der ermittelten Daten soll das Programm stetig evaluiert und weiterentwickelt werden. Ziel des Screeningprogramms ist es, die Erkrankung in einem möglichst frühen Stadium zu erkennen und damit einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf zu vermeiden und eine bessere Therapieprognose zu erwirken (Hall et al., 2015; Lung et al., 2015; Ma et al., 2018).

Zu Beginn der Diagnoseerhebung wird zunächst eine sorgfältige Anamnese durchgeführt. Dabei werden neben den klinischen Symptomen von neu aufgetretenen Stuhlnormregelmäßigkeiten, Blut im Stuhl, Leibschmerzen und Zeichen der B-Symptomatik, auch ein besonderes Augenmerk auf die Risikofaktoren und die Familienanamnese gelegt. Im Anschluss daran sollte eine strukturierte körperliche Untersuchung durch-

geführt werden. Diese beinhaltet die Inspektion, die Perkussion und Palpation des Abdomens, ergänzt durch die Inspektion der Analregion und eine digital-rektale Untersuchung (DRU), da in 20 bis 30 Prozent aller Darmkrebsfälle das Karzinom aufgrund seiner Lage mit dem Finger tastbar ist (Sohal et al., 2002; Binefa et al., 2014). Als sinnvolle Screeningmethode kann im Anschluss an die körperliche Untersuchung der immunologische Stuhltest (iFOBT) zum Nachweis von Blut im Stuhl angewendet werden. Bei weiterführendem Verdacht wird eine komplette Koloskopie mit Biopsie als diagnostische Standardmethode der Wahl hinzugezogen. Mit Hilfe der Biopsie kann histologisch der Differenzierungs- bzw. Entartungsgrad des Gewebes bestimmt werden (Grading). Zur Durchführung des Tumor-Stagings werden anschließend weitere apparative Diagnostikmethoden wie der Einsatz des CTs, der Sonographie, des Röntgens und gegebenenfalls des MRTs zur Hilfe genommen. Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei circa 15 bis 20 Prozent der Patienten bereits Lebermetastasen vorhanden sind, wird vor allem der Leberultraschall eine besondere Rolle zugesprochen. Bei Rektumkarzinomen gehört wegen der Möglichkeit der direkten Lungenmetastasierung das Röntgenthorax zu den Standardmethoden (Gandon, 2014; Javarsiani et al., 2019; Mainenti et al., 2019). Die Tumormarker CEA und CA 19-9 spielen beim CRC-Screening auf Grund mangelnder Spezifität eine untergeordnete Rolle und werden nicht für diagnostische Zwecke eingesetzt, sondern lediglich zur postoperativen Verlaufskontrolle verwendet (Primrose et al., 2014; Lalosevic et al., 2017; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021).

Differenzialdiagnostisch müssen unter anderem die Möglichkeiten gutartiger Polypen, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) und proktologischer Krankheitsbilder wie Hämorrhoiden, Analfissuren und Proktitis in Betracht gezogen werden. Eingeteilt werden die CRCs über die TNM- und die UICC-Klassifikation. Die Einteilung erfolgt hierbei jeweils nach Tumordinfiltration, Lymphknotenbefall und Metastasierungsausmaß. Beide Systeme haben heute im klinischen Alltag Relevanz (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021). In Abbildung 4 und 5 werden das TNM- und das UICC-Klassifikationssystem dargestellt.

T	Tumor = Primärtumor
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muskularis propria
T3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nicht-peritonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe
N	Nodus = regionale Lymphknoten
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 parakolischen/pararektalen Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als 4 parakolischen/pararektalen Lymphknoten
M	Metastasen
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Nachweis von Fernmetastasen an einem oder mehreren Orten

Abbildung 4: TNM-Klassifikation bei kolorektalen Karzinomen. Darstellung der einzelnen Kategorien der TNM-Klassifikation zur Einteilung maligner Tumore. Aufgeteilt in die Tumorausbreitung (T), den Lymphknotenbefall (N) und die Ausbildung von Fernmetastasen (M). Abbildung übernommen von Deckers, 1991.

Stadium Ia	Beschränkung der Tumordinfiltration auf die Mukosa und Submukosa
Stadium Ib	Beschränkung der Tumordinfiltration bis in die Muskularis propria
Stadium II	T3 und T4 ohne Lymphknotenmetastasierung
Stadium III	Lymphknotenmetastasierung
Stadium IV	Fernmetastasen

Abbildung 5: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms. Darstellung der Stadieneinteilung der UICC-Klassifikation, welche die Grundlage für die Entscheidung der weiteren Behandlung bei Tumorerkrankungen bildet. Abbildung übernommen von Deckers, 1991.

1.1.4 Therapie, Prognose und Nachsorge

Die Therapie des CRCs richtet sich neben der Gradeinteilung der TNM- bzw. der UICC-Klassifikation auch nach dem Therapieziel. Zu unterscheiden ist hierbei, ob eine kurative, adjuvante oder palliative Intention verfolgt wird (Li et al., 2015; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021).

Bei der Therapie des CRCs werden neben chirurgischen auch strahlentherapeutische und medikamentöse Maßnahmen angewendet. Dabei werden Chemotherapeutika, wie die Kombination aus 5-Fluoruracil mit Folsäure und Oxaliplatin eingesetzt (Schirripa und Lenz, 2016; Skarkova et al., 2019; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021). Der Einsatz von monoklonalen Antikörper wie Cetuximab, Panitumumab und Bevacizumab konnte dagegen keinen positiven Effekt im Rahmen der Therapie des CRCs aufweisen und wird daher nicht in der adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms empfohlen (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021). Bei einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im Stadium 2 kann eine adjuvante Chemotherapie bei vorhandenem Risikoprofil (T4, Tumorperforation- und einriss, Notfalloperation oder geringe Anzahl der untersuchten Lymphknoten) durchgeführt werden. Liegt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) vor, ist eine adjuvante Chemotherapie nicht indiziert. Postoperativ wird ab dem UICC-Stadium 3 die Anwendung von 5-Fluoruracil (5-FU) mit Folsäure und eine Oxaliplatin-haltige Therapie über einen Zeitraum von 3 bis 6 Monaten je nach Risikoprofil angewendet, was nachweislich zu einer Reduktion der Rezidivrate und zu einem längeren Überleben führt (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021). Beim Rektumkarzinom wird im UICC-Stadium 1 eine präoperative Therapie nicht empfohlen. In den fortgeschrittenen UICC-Stadien wird dagegen beim Rektumkarzinom des unteren und mittleren Drittels präoperativ zusätzlich zum Einsatz von 5-Fluoruracil auch strahlentherapeutisch interveniert. In Ausnahmefällen kann eine primäre Resektion erfolgen. Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen des oberen Drittels ohne Risikoprofil soll primär operativ und dazu analog zu den Kolonkarzinomen adjuvant behandelt werden. Bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen des oberen Drittels mit Risikoprofil (ausgedehnter Lymphknotenbefall oder T4-Konstellation) kann eine präoperative Radio- oder Radiochemotherapie erfolgen. Bei primärer RO-Resektion wird in den UICC-Stadien 2 und 3 eine adjuvante Radiochemotherapie oder eine adjuvante Chemotherapie für Rektumkarzinome empfohlen. Im UICC-Stadium 4 soll bei kolorektalen Karzinomen eine zusätzliche molekularbiologische Diagnostik vor Therapiebeginn durchgeführt

werden. Vor Beginn einer Erstlinientherapie soll eine Bestimmung der (ALL) RAS- und BRAF-Mutationen erfolgen. Neben der chirurgischen Therapie mit oder ohne Chemotherapieeinsatz wird bei primärer Irresektabilität zunächst eine systemische Therapie empfohlen. Besonders wichtig für die Therapieempfehlung sind hierbei vor allem die Prognose und der Allgemeinzustand des Patienten (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021).

Die Prognose kolorektaler Karzinome wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu den Faktoren zählen das Stadium der Erkrankung, der Differenzierungsgrad bzw. der histologische Typ des Karzinoms und die Höhenlokalisation des Tumors beim Rektumkarzinom. Bei radikaler R0-Resektion konnte in den letzten Jahren die 5-Jahres-Überlebensrate auf 70 Prozent gesteigert werden, wobei auf das T1-Stadium eine Rate von 80 bis 98 Prozent, auf das T2-Stadium eine Rate von 60 bis 85 Prozent und auf das T3-Stadium eine Rate von 40 bis 70 Prozent entfallen. Die größte Rezidiv-Wahrscheinlichkeit besteht innerhalb der ersten 18 Monate und wird hauptsächlich durch Lebermetastasen gebildet. Bilden familiäre Prädispositionen wie beispielsweise das FAP-Syndrom die Grundlage der Tumorentstehung erhöht sich dementsprechend auch das Rezidiv-Risiko (Lee et al., 2009; Binefa et al., 2014; Lung et al., 2015; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021).

CRCs verlangen trotz erfolgreicher Therapie eine regelmäßige Nachkontrolle. Obwohl die aktuellen Richtlinien im UICC-Stadium 1 keine allgemeine Tumornachsorge vorsehen, sollte in jedem Stadium nach spätestens 3 Jahren zumindest eine koloskopische Nachkontrolle erfolgen. Für die fortgeschrittenen UICC-Stadien empfehlen die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten dagegen eine feste regelmäßige Nachsorge. Die regelmäßige Nachsorge soll dabei unter anderem Koloskopien, digital-rektale Untersuchungen, Abdomensonographien, Laborkontrollen (CEA-Wert alle 6 Monate für mindestens 2 Jahre) und röntgenologische Untersuchungen beinhalten, wodurch Lokalrezidive, Zweitkarzinome und Metastasen in einem möglichst frühen Stadium erfasst werden sollen (Hall et al., 2015; Wolf et al., 2018; Kaalby et al., 2019; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2021).

1.2 Heterogenität und Plastizität von Tumorzellen

Seit vielen Jahren hat sich die wissenschaftliche Meinung etabliert, dass intratumorale Heterogenität einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, die therapeutische Effizienz und das Patientenüberleben besitzt (Hanahan and Weinberg, 2011). Diese Heterogenität von Tumorzellen innerhalb des gleichen Tumors äußert sich unter anderem in dem Erlangen von unterschiedlichen Merkmalen in der Größe, der Morphologie und der Antigenexpression, aber auch in Verhaltensänderungen, wie beispielsweise beim Zell-Turnover, der Zell-Zell-Interaktion, der Invasions- und Metastasierungsfähigkeit und der Sensitivitätsreaktion auf Medikamente (Michor und Polyak, 2010). Dabei wird die Tumorzellheterogenität fortlaufend durch extrazelluläre Einflüsse verändert und kann dadurch die Tumorentwicklung und die Tumorprogression modulieren. Zu diesen extrazellulären Einflussfaktoren werden hauptsächlich inflammatorische Reize, Signale aus der direkten Zellumgebung und Immunzellinteraktionen zusammengefasst (Cabrera et al., 2015).

Verantwortlich für die Heterogenität werden genetische Diversitäten und epigenetische Modifikationen gemacht (Kreso und Dick, 2014; Plaks et al., 2015). Um die Tumorprogression und die Heterogenität der einzelnen Tumorzellen genauer zu verstehen, wurden zwei Modelle, nämlich die klonale Evolutionstheorie (Stochastisches Modell) und das Krebsstammzell-Modell (Hierarchisches Modell) verwendet (Plaks et al., 2015). Die klonale Evolutionstheorie besagt, dass sich Krebs durch eine Art Selektionsprozess von genetischen Drifts in Anlehnung an die Darwin'sche Lehre entwickelt. Innerhalb einzelner Zellen führt die genetische Instabilität zu einer Akkumulation von zusätzlichen Mutationen, welche zu genetisch unterschiedlichen Subpopulationen führt. Die klonale Subpopulation mit der größten Aggressivität sorgt für die Tumorprogression. Der Evolutionsprozess liefert durch den Einfluss von intrinsischen und extrinsischen Faktoren unterschiedliche Arten von Zellen, von denen nur eine bestimmte Zellart Tumorprogression initiieren kann. Auf der anderen Seite besagt die Krebsstammzell-Hypothese, dass nur eine einzelne Gruppe von Krebszellen, welche die sogenannten Krebsstammzellen beinhaltet, an der „klonalen Evolution“ teilnimmt, während die anderen Zellen aussortiert werden und den Zelltod erleiden. Die entstehende hierarchische Organisation beinhaltet anschließend Stammzellen, intermediate Nachkommen und terminal differenzierte Nachkommen. Nur die Krebsstammzellen haben aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften die Möglichkeit Tumorwachstum zu initiieren

und können von Tumorzellpopulationen, die nicht die Tumorprogression initiieren können, unterschieden werden (Dick et al., 2009; Meacham und Morrison, 2013; Gerdes et al., 2014). Abbildung 6 stellt die beiden Modelle der Tumorheterogenität schematisch dar.

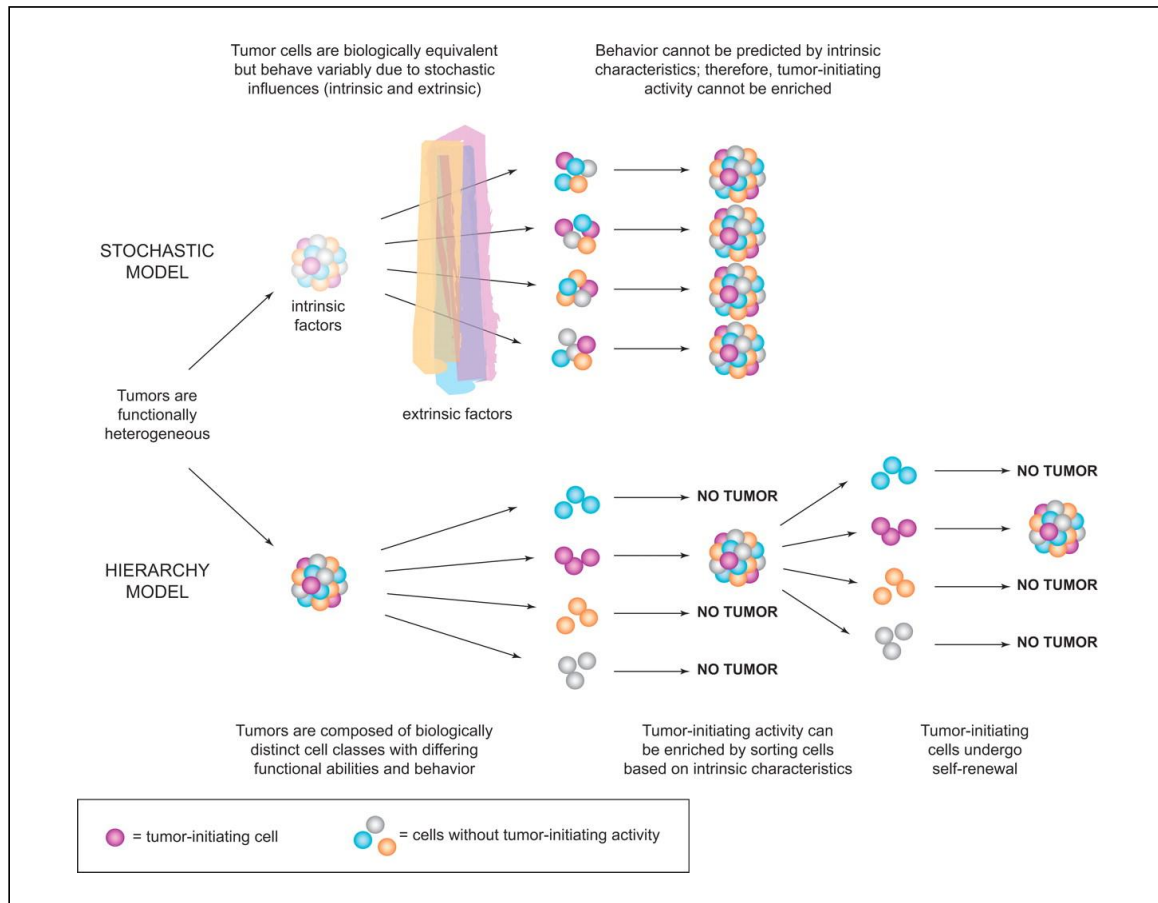


Abbildung 6: Modell der Tumorheterogenität. Schematische Gegenüberstellung des stochastischen und hierarchischen Modells zum besseren Verständnis der Tumorheterogenität. Das stochastische Modell zeigt, dass durch den Einfluss von intrinsischen und extrinsischen Faktoren genetisch unterschiedliche Subpopulationen gebildet werden, von denen nur eine bestimmte Zelllinie Tumorprogression initiiert. Das hierarchische Modell besagt, dass nur eine einzelne Art von Krebszellen, sogenannte Krebsstammzellen, an der „klonalen Evolution“ teilnehmen, während alle anderen Zellarten aussortiert werden und den Zelltod erleiden. Wichtig für das Tumorwachstum sind dabei die intrinsischen Eigenschaften. Abbildung übernommen von Dick, 2008.

In den letzten Jahren wurde aufgrund weiterer wissenschaftlicher Erkenntnisse ein neues Modell, das Elemente der Evolutions- und Stammzelltheorie verbindet, entwickelt. Es wird unter der Bezeichnung Plastizitätsmodell geführt und beinhaltet zusätzlich die Hypothese der bidirektionalen Konversion zwischen Stammzellen und Nicht-Stammzellen. Eine ausgewählte Gruppe von Zellen scheint die Möglichkeit zu besitzen, zwischen dem Tumorzellstatus und dem Nicht-Tumorzellstatus als Antwort auf geeignete Reize wechseln zu können (Cabrera et al., 2015).

Nach diesem Modell haben alle oder zumindest die meisten Tumorzellen stammzellartige Eigenschaften, welche von den Einflüssen der Mikroumwelt und von der intrinsischen Zell-Stochastizität abhängen (Michor und Polyak, 2010). Die Plastizität berücksichtigt die morphologische und funktionelle Heterogenität, welche durch komplementäre Mechanismen, wie die genomische Instabilität, die Epigenetik, die Signalübertragung und die funktionelle Anpassung an sich verändernde Umwelteinflüsse, gesteuert wird. Außerdem steht die Plastizität in besonderer Verbindung mit Tumorinvasion und der Metastasierung, welche beide gleichsam als Ursache und Folge der Plastizität gewertet werden (Friedl und Alexander, 2011). Die Vielfalt der einzelnen Modelle verdeutlicht, dass das Verständnis über die Zusammenhänge der zellulären Tumorerheterogenität noch nicht abschließend geklärt ist und in Zukunft weiterer Forschung bedarf. Auch bei kolorektalen Karzinomen konnte aufgezeigt werden, dass molekulare Subtypen, die sich klinisch unterscheiden, vorhanden sind. Die genaue Anzahl an Subtypen ist zwar aktuell noch unklar, jedoch konnten bisher sechs klinisch relevante Subtypen bestimmt werden, die eine große Ähnlichkeit zu normalen Kolonschleimhaut-Kryptenzellen aufweisen, sich aber in ihrer Stammzellefähigkeit und ihrer WNT-Aktivität unterscheiden (Gerdes et al., 2014). In ihrer Funktion werden Stammzellen entscheidend durch Signalwege wie WNT, Tgf- β /Bmp, Hedgehog, Notch und Rezeptor-Tyrosinkinasen beeinflusst (Dreesen und Brivanlou, 2007). Die besondere Rolle der WNT-Signalkaskade, vor allem auch im Zusammenhang mit Darmkrebs, ist bereits seit vielen Jahren zentraler Bestandteil der Forschung. Im folgenden Kapitel werden nun der WNT-Signalweg und sein Zusammenhang zu kolorektalen Karzinomen vorgestellt.

1.3 WNT-Signalweg

1.3.1 Grundlagen des WNT-Signalwegs

Dem WNT-Signalweg wird eine wichtige Rolle in der Bildung und in der Regeneration von Organanlagen, sowie in der Embryonalentwicklung zugeordnet. Über eine Signalkaskade von sekretorischen Glykoproteinen werden unter anderem die Zellproliferation, die Zellpolarität und die Bestimmung über das Zellschicksal während der embryonalen Entwicklung und während der Gewebshomeostase direkt beeinflusst (Logan und Nusse, 2004). Die Grundlage der WNT-Signaltransduktionsforschung wurde bereits in den späten 1980ern bzw. den frühen 1990ern gelegt, als bestimmte Genprodukte, die zu einer großen evolutionären Familie extrazellulärer Signalmoleküle gezählt werden, bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und Mäusen entdeckt wurden (Rijsewijk et al., 1987; van Amerongen und Nusse, 2009). Die Bezeichnung WNT entstand aus der Zusammensetzung der Gene „wg“ und „Int1“. Das „wg“ Gen steht für „wingless“ (flügellos) und war der erste Wachstumsfaktor, der von der WNT-Familie entdeckt wurde. Bei Mutation dieses Gens konnte eine flügellose Variante der Fliegenart *Drosophila melanogaster* beobachtet werden. Grundsätzlich kontrolliert das Gen die Segment-Polarität während der Larvenentwicklung (Clevers und Nusse, 2012). Das „Int1“ Gen wurde dagegen kurze Zeit später in Mäusen detektiert. Es sorgt dafür, dass bei Aktivierung die Entwicklung von malignen Krankheiten, wie beispielsweise bei der Brustkrebsentstehung, getriggert wird. Das „Int1“ Gen wird häufig auch unter der Bezeichnung „Wnt1“ geführt, stellt ein Protoonkogen dar und wurde im Jahr 1982 entdeckt (Nusse und Varmus, 1982; van Amerongen und Nusse, 2009; Niehrs, 2012). Wenig später konnte der homologe Zusammenhang zwischen dem „wg“ Gen und dem „Int1“ Gen gezeigt werden (Rijsewijk et al., 1987).

Die WNT-Signalkaskade kann als biochemisches Netzwerk der Zelle angesehen werden, das auf gewisse Signale und Reize reagieren kann. Die WNT-Proteine, die an der Signaldetektion, -verarbeitung und -weiterleitung beteiligt sind, werden von insgesamt 19 bekannten Genen kodiert und weisen eine besonders Cystein-reiche Beschaffenheit auf (Niehrs, 2012). Die Proteine binden an verschiedene Rezeptoren und aktivieren dadurch unterschiedliche Signalwege. Generell können die Signalwege in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden.

Es werden β -Catenin-abhängige (kanonische Kaskade) Signalwege von β -Catenin-unabhängigen (nicht-kanonische Kaskade) Signalwegen unterschieden, wobei auch weitere Subklassen bestehen. In Abbildung 7 werden zur besseren Übersicht die Haupt-WNT-Signalwege schematisch dargestellt.

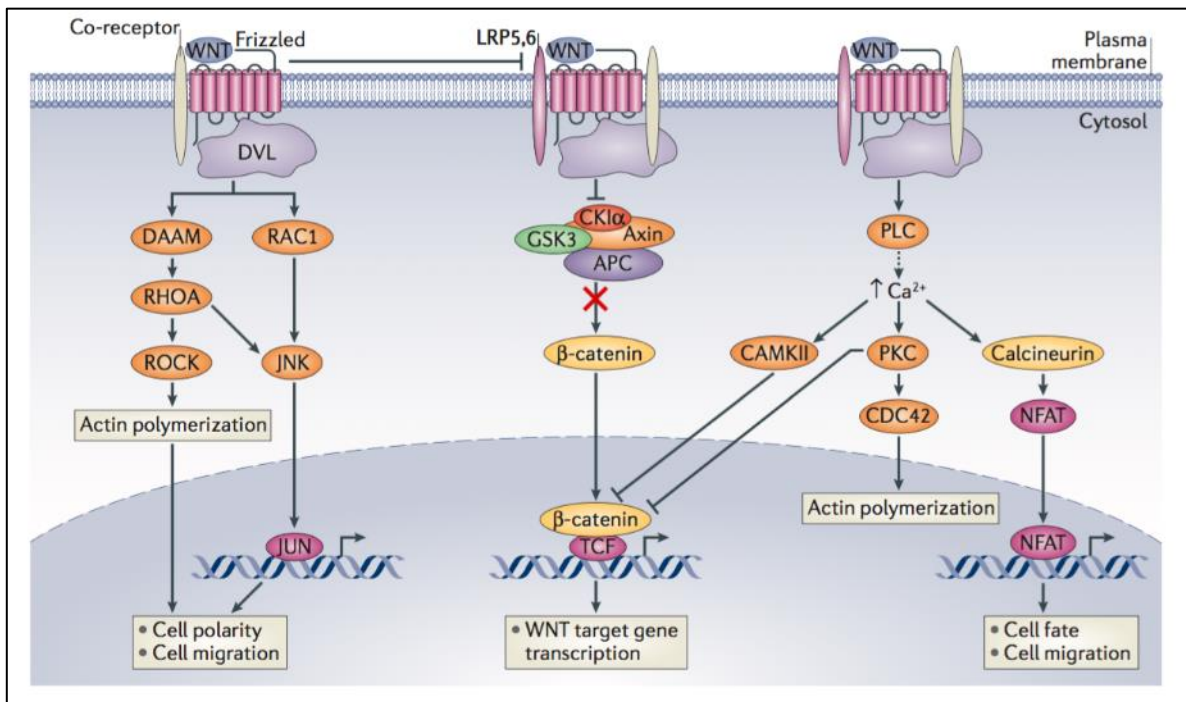


Abbildung 7: Abbildung der Haupt-WNT-Signalwege. Vereinfachte schematische Darstellung der Hauptwege der WNT-Signalkaskade. Im ersten Signalweg wird nach Bindung des WNT-Signalproteins am Frizzled-Rezeptor eine Signalkaskade ausgelöst, welche hauptsächlich mit der Zellpolarität und der Zellmigration in Verbindung gebracht wird (Links). Zudem wird der β -Catenin-abhängige Signalweg abgebildet (Mitte). In Anwesenheit von WNT kann sich β -Catenin vom Destruktionskomplex (GSK3, Axin, APC und $CK1\alpha$) lösen, akkumulieren und in den Zellkern wandern. Dort aktiviert β -Catenin unter Kontrolle vom T cell factor (TCF) die Transkription der Zielgene. Der dritte abgebildete Signalweg zeigt die WNT-Calcium-Signalkaskade (Rechts). Dieser Signalweg führt zur Transkriptionsregulation von Genen, die für das Zellschicksal und die Zellmigration verantwortlich sind. Der hemmende Einfluss der β -Catenin-unabhängigen WNT-Signalwege auf den β -Catenin-abhängigen Signalweg wird zudem verdeutlicht. Abbildung übernommen von Niehrs, 2012.

Insgesamt werden mehr als 15 verschiedene Rezeptoren und Co-Rezeptoren der WNT-Signalwege beschrieben, was die große Vielfalt dieses Signalwegs verdeutlicht. Die einzelnen Rezeptoren und die Kombination aus den einzelnen Rezeptoren bestimmen in diesem Zusammenhang die Art der Signalkaskade. Dabei weisen einzelne Rezeptorkomplexe eine Selektivität zur Aktivierung entweder von β -Catenin-abhängigen,

oder von β -Catenin-unabhängigen Signalwegen auf. Außerdem kann die Aussage getroffen werden, dass Frizzled-Proteine als gemeinsame Rezeptoren für β -Catenin-abhängige und auch β -Catenin-unabhängige Signalwege fungieren können. Auch der Einsatz der Co-Rezeptoren LRP5/6 und ROR1/2 kann sowohl β -Catenin-abhängige, als auch β -Catenin-unabhängige Signalkaskaden definieren. Die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten untermauert nochmals, dass der WNT-Signalweg eine hohe Komplexität aufweist und von mehreren Faktoren abhängig ist (Miller, 2002; Niehrs, 2012). Der β -Catenin-unabhängige Signalweg reguliert dabei die Zellmigration und die Zellpolarität und hat somit Einfluss auf die Zellmorphologie (van Amerongen, 2012). Dem β -Catenin-abhängigen Signalweg wird die Regulation von Zellproliferation, Zellschicksal und Stammzell-Erneuerung zugeordnet. Gleichzeitig ist er der am besten beschriebene WNT-Signalweg. Seine Triggerung findet über das Zusammenspiel von WNT mit den Frizzled-Rezeptorproteinen und den LRP5/6 Co-Rezeptorproteinen (low density lipoprotein receptor related protein) statt (Angers und Moon, 2009; Niehrs, 2012). Das Adhäsionsprotein β -Catenin stellt dabei das Schlüsselziel des kanonischen WNT-Signalwegs dar und besitzt die Möglichkeit, die Genexpression von WNT-Zielgenen auszulösen und zu verstärken. In Abwesenheit von WNT liegt β -Catenin fest gebunden im sogenannten Destruktionskomplex vor. Dieser Destruktionskomplex wird aus dem Protein Axin, der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), dem Tumorsuppressor-Protein Adenomatous Polyposis Coli (APC) und der Casein Kinase1 alpha (CK1 alpha) gebildet. Die Kinasen GSK3 und CK1 alpha phosphorylieren das gebundene β -Catenin, welches anschließend durch das β Transducin Repeat Containing Protein (β -Trcp), eine Ubiquitin Ligasen Untereinheit, ubiquitiniert wird und daraufhin im 26S Proteasom abgebaut werden kann. Dies führt dazu, dass β -Catenin nicht mehr in den Zellkern wandert, was schließlich eine Unterdrückung der WNT-Zielgene bewirkt, da keine Interaktion von β -Catenin mit den DNA-gebundenen T Cell Factor (TCF) und Lymphoid Enhancer-binding Factor (LEF) Proteinfamilien stattfindet (Aberle et al., 1997; He et al., 2004; Angers und Moon, 2009; MacDonald et al., 2009; Clevers und Nusse, 2012; Niehrs, 2012). Der WNT/ β -Catenin-Signalweg ist aktiviert, wenn ein WNT-Ligand an den Frizzled-Rezeptor und seine Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 bindet. Der Komplex aus WNT, Frizzled und LRP6 lockt das Gerüstprotein Dishevelled (Dvl) an, was dazu führt, dass LRP phosphoryliert und aktiviert wird. Im folgenden Schritt wandert der Axin-Komplex zu den Rezeptoren, was wiederum zur Folge hat,

dass die Axin-induzierte β -Catenin-Phosphorylierung gehemmt wird. Das Effektormolekül β -Catenin ist somit im Zytoplasma stabilisiert, kann sich nun anreichern und löst sich daraufhin vom Destruktionskomplex ab. Anschließend wandert nun β -Catenin in den Zellkern, um mit den Transkriptionsfaktoren TCF und LEF einen Komplex zu bilden. Dieser Komplex sorgt im nächsten Schritt dafür, dass es zu einer Aktivierung der Expression der WNT-Zielgene kommt (Staal und Clevers, 2005; Angers und Moon, 2009; MacDonald et al., 2009). Abbildung 8 liefert zur besseren Übersicht der Abläufe eine Gegenüberstellung des inaktivierten und aktivierten WNT/ β -Catenin-abhängigen Signalwegs.

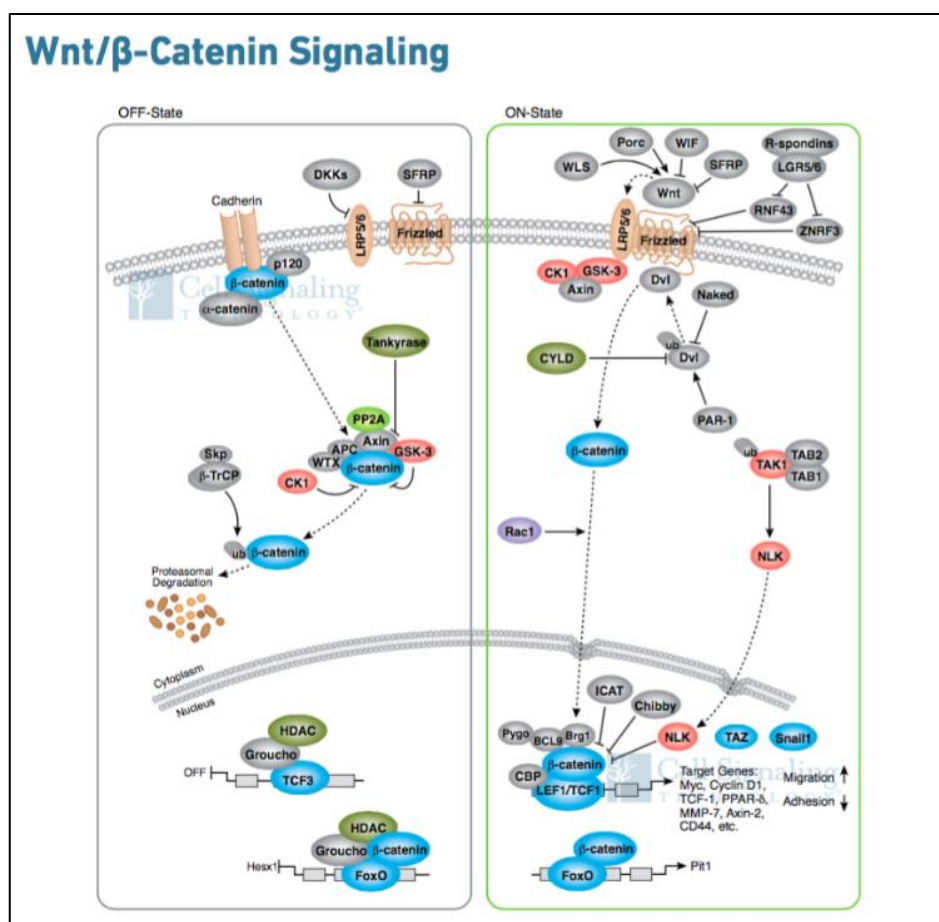


Abbildung 8: Gegenüberstellung des inaktivierten und aktivierten WNT/ β -Catenin-abhängigen Signalwegs. Schematische Gegenüberstellung des inaktivierten β -Catenin-Signalwegs bei Abwesenheit des WNT-Signalproteins (Links) und des aktivierten β -Catenin-Signalwegs bei Anwesenheit des WNT-Signalproteins (Rechts). Bei Abwesenheit des WNT-Liganden verbleibt β -Catenin im Destruktionskomplex und wird abgebaut. Bei Anwesenheit des WNT-Liganden kann sich β -Catenin vom Destruktionskomplex lösen und im Zellkern die Transkription der Zielgene bewirken. Übernommen von CellSignal, 2020.

1.3.2 Unterschiedliche WNT-Aktivität in kolorektalen Karzinomen

Eine Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs kann in nahezu allen kolorektalen Karzinomen beobachtet werden (Buchert et al., 2015). Bei CRCs sind unterschiedliche Mutationen, die in unmittelbarer Verbindung mit dem WNT-Signalweg stehen und eine Aktivierung dieser Kaskade auslösen, bekannt. In diesem Zusammenhang muss zum einen die APC-Mutation im Rahmen des erblichen FAP-Syndroms erwähnt werden, welche zu einer Inaktivierung des Destruktionskomplexes innerhalb des Signalwegs führt. APC ist ein großes Protein, das innerhalb dieses Komplexes mit β -Catenin und Axin interagiert. Bei Mutation des APC-Gens geht seine tumorsuppressive Eigenschaft verloren und β -Catenin wird, wie schon bereits in dieser Arbeit beschrieben, nicht mehr kontrolliert abgebaut, kann im Zellkern akkumulieren und nach Bindung mit TCF/LEF zu einer Steigerung der Genexpression der WNT-Zielgene führen (Clevers und Nusse, 2012; Buchert et al., 2015). Neben Mutationen, die zu einer Inaktivierung des β -Catenin-abbauenden Komplexes führen, müssen aber auch Mutationen beachtet werden, die eine Aktivierung von β -Catenin bewirken. Eine Mutationsvariante liegt hierbei im CTNNB1-Gen vor und führt zu einer verstärkten Wirkung von β -Catenin auf die Genexpression der WNT-Zielgene (Geyer et al., 2011).

Doch nicht nur Mutationen direkter Bestandteile des WNT-Signalwegs, sondern auch Mutationen in anderen Signalwegen wird ein Einfluss auf das WNT-Aktivitätslevel zugeschrieben. Von besonderer Bedeutung erscheint hier die K-RAS-Mutation zu sein, die in circa 40 Prozent der CRCs vorliegt. Die K-RAS-Mutation steht in direkter Verbindung mit der Aktivierung des MAPK-Signalwegs. Studien haben gezeigt, dass ein konstitutiv hohes Level an K-RAS zu einer verstärkten Aktivierung vom MAPK-Signalweg führt, was wiederum eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin und eine Steigerung der WNT-Aktivität in kolorektalen Karzinomen bewirkt (Horst et al., 2012).

Die meisten CRCs zeigen eine Heterogenität in der β -Catenin-Verteilung innerhalb des Tumors auf, was darauf schließen lässt, dass nicht nur Veränderungen des WNT-Signalwegs, sondern eine weitere komplexe Regulation der WNT-Signalkaskade durch äußere Faktoren Einfluss auf den Signalweg nimmt (Vermeulen et al., 2010). Die Heterogenität in der β -Catenin-Verteilung, die auch als β -Catenin-Paradoxon bekannt ist, ist Folge unterschiedlicher Zellpopulationen mit hoher und niedriger WNT-Aktivität. Zellen mit hoher WNT-Aktivität werden dabei besonders mit Tumorstammzeleigenschaften und einem hohen Invasionspotential in Verbindung gebracht (Brabletz et al.,

2005; Vermeulen et al., 2010). Trotzdem ist die WNT/ β -Catenin-Aktivität nicht direkt mit der Tumorstammzelleigenschaft gleichzusetzen, da sowohl Zellen mit hoher, als auch mit niedriger WNT/ β -Catenin-Aktivität neue Tumore ausbilden können. Dies deutet darauf hin, dass auch die Aktivität des WNT-Signalwegs bei kolorektalen Karzinomen plastisch zu sein scheint (Horst, 2013). Zellen mit hoher WNT-Aktivität sind vor allem im Tumorrandbereich zu finden, was sich auch mit den Ergebnissen der vermehrten Expression des WNT-Effektorproteins β -Catenin im Tumorrandbereich deckt. Es wird angenommen, dass eine hohe WNT-Aktivität mit einem hohen Progressions- und Invasionspotential bei Darmkrebs korreliert (Kahn, 2014). Dagegen bilden Zellen mit niedriger WNT-Aktivität hauptsächlich die Basis des Tumorzentrums. Allgemein wird eine Steigerung der WNT-Aktivität vom Zellinneren zum Zellrandbereich beobachtet (Cernat et al., 2014). Neben den beschriebenen Einflüssen anderer Signalwege auf die WNT-Kaskade, muss auch der Einfluss der direkten zellulären Umgebung des Tumors beachtet werden. Zu den äußeren Einflüssen werden beispielsweise einzelne Faktoren von Myofibroblasten gezählt, die ebenfalls Einfluss auf die WNT-Aktivität in Stammzellen zeigen. Versuche haben ergeben, dass differenzierte Tumorzellen, die ihre Fähigkeit, Tumorgewebe zu bilden verloren hatten, durch die Stimulation mit Myofibroblast-Faktoren ihre Fähigkeit wiedergewinnen konnten (Vermeulen et al., 2010). Dies zeigt auf, dass nicht nur direkte Veränderungen des WNT-Signalwegs, sondern auch Einflüsse anderer Signalwege und der Mikroumwelt eine besondere Bedeutung für die WNT-Aktivität haben und zur Plastizität der WNT-Signalwege in kolorektalen Karzinomen beitragen können. Die beschriebene Heterogenität der WNT-Aktivität könnte sich nicht nur als potentiell Ziel weiterer Therapieforschung eignen, sondern auch im Zusammenhang mit Prognoseanalysen genutzt werden. Im folgenden Kapitel wird das Glykoprotein A33 (GPA33) näher vorgestellt. Dabei soll vor allem der Zusammenhang von GPA33 zur WNT-Aktivität geprüft und die Eignung von GPA33 als Prognosemarker bei kolorektalen Karzinomen untersucht werden.

1.4 Glykoprotein A33

Das Glykoprotein A33, das vom GPA33 Gen kodiert wird, ist ein spezifisches Zelloberflächenprotein des Gastrointestinaltrakts und kann in 95 Prozent aller kolorektalen Karzinome nachgewiesen werden. Es gehört zur Gruppe der CTX-Transmembranproteine vom Typ 1 und wird aus 298 Aminosäuren aufgebaut. Von seinem strukturellen Aufbau ist das Protein hydrophil und besitzt eine extrazelluläre Domäne mit zwei extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Strukturen, eine hydrophobe, transmembrane Domäne und einen stark sauren, intrazellulären Schwanz mit vier Cystein-Bausteinen (Heath et al., 1997; Johnstone et al., 2000; Frey et al., 2008; Williams et al., 2015;). Es wird an der basolateralen Oberfläche von physiologisch normalen, aber auch entarteten Zellen des Gastrointestinaltraktes exprimiert. Dabei weist es eine hohe Spezifität und Sensitivität für Zellen des Magen-Darm-Traktes auf (Abud et al., 2000). Nachdem bereits nachgewiesen werden konnte, dass GPA33 ein wichtiger, sensitiver und spezifischer Marker für die Barrett-Metaplasie ist, konnte auch sein potenzieller Nutzen als Immunomarker für kolorektale Karzinome bestätigt werden. Da GPA33 eine ähnliche Sensitivität und sogar eine größere Spezifität für CRCs als der Marker CDX2, einem der am häufigsten genutzten Immunomarker bei Karzinomen unbekanntes Ursprungs (CUPs), zeigen konnte, könnte GPA33 in Zukunft eine potentielle Alternative für CDX2 in der CRC-Diagnostik darstellen (Wong et al., 2006 und 2017). Studien konnten zeigen, dass der GPA33-spezifische Antikörper nach Bindung an das GPA33-Oberflächenantigen zunächst internalisiert wird. Anschließend wird er in zytoplasmatischen Vesikeln in den Zellkern transportiert und zirkuliert daraufhin wieder molekular unverändert zur Zelloberfläche (Daghighian et al., 1996).

Die besondere Bedeutung von GPA33 wurde bereits Ende der 1990er bzw. Anfang der 2000er Jahre erkannt, als seine Zielstruktureignung für die Radioimmuntherapie untersucht wurde. Die Versuche konnten eine Reduktion des Tumorwachstums durch die Radioimmuntherapie zeigen. Weitere Testreihen in diesem Bereich zeigten in den folgenden Jahren eine relative, therapeutische Effizienz beispielsweise mit ¹²⁵I und ¹³¹I auf (Barendsward et al., 2001). Neben der Kopplungsfähigkeit des Antikörpers, wurde unter anderem auch die Wirkung in der T-Zell-Immunotherapie getestet. Als Beispiel für die Eignung als mögliche, effektive Zielstruktur kann MGD007 erwähnt werden. Dabei handelt es sich um ein bispezifisches Protein, das eine Affinität zu GPA33 und CD3 zeigt und im Bereich der Immuntherapie bei CRCs eingesetzt werden

soll. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass MGD007 in der Lage zu sein scheint, einen Anti-Tumor-Effekt bei CRCs auszulösen und als potentielle neue Therapieoption für CRCs in Frage kommen könnte (Infante et al., 2013; Moore et al., 2018). Seit der Entdeckung von GPA33 wurde in mehreren Studien versucht, GPA33 als Zielstruktur für Antikörpertherapien beim CRC zu verwenden. Hierbei konnten jedoch jeweils keine guten Effekte erzielt werden, weshalb GPA33 in der aktuellen klinischen Therapie des CRCs nicht verwendet wird (Baptistella et al., 2016; Wu et al., 2018).

In den letzten Jahren wurde zudem mit Hilfe des GPA33-Proteins versucht, ein besseres Verständnis über die Barrierefunktion des Darms zu erlangen. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass trotz des Ausschaltens des GPA33-Gens keine erhöhte Neigung zur Entwicklung von akuter und chronischer Colitis besteht. Dennoch kann weiterhin von einer Beteiligung von GPA33 an der Barrierefunktion des Darmtrakts ausgegangen werden (Williams et al., 2015).

In Bezug auf seine Genexpression weist GPA33 ein für den GI-Trakt spezifisches Profil auf. Dennoch sind auch in seiner Genexpression nicht alle Vorgänge abschließend geklärt und verstanden (Johnstone et al., 2002). GPA33 scheint unter anderem ein direktes Zielgen von CDX1 und KLF4 zu sein, da beide Faktoren nach Bindung an die Promotorregion eine verstärkte Expression von GPA33 auslösen. Zudem konnte gezeigt werden, dass PPAR γ , welches einen nachgewiesenen Anti-Tumor-Effekt in kolorektalen Karzinomen aufweist, indirekt die GPA33-Bildung über die Kopplung mit KLF4 in CRCs steigern kann (Rageul et al., 2009).

Obwohl GPA33 seit vielen Jahren Bestandteil der Forschung ist, konnte seine komplette Funktion bis heute noch nicht abschließend geklärt werden. Vermutet wird eine Aufgabe als Adhäsionsmolekül und beim Zell-Zell-Kontakt, aber auch eine Wirkungsweise im Bereich der Antigen-Präsentation erscheint möglich (Van Niel et al., 2001). Es wurde bereits beschrieben, dass die WNT-Aktivität, aber auch die β -Catenin-Verteilung bei CRC-Patienten einer heterogenen Verteilung unterliegt. Auch die GPA33-Proteinexpression bei CRC-Patienten zeigt je nach Differenzierungsgrad des Tumors eine heterogene Verteilung, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der WNT-Aktivität, der β -Catenin-Verteilung und der GPA33-Genexpression deuten lassen könnte. Baptistella zeigte auf, dass gut differenzierte CRCs im Vergleich zu schlecht differenzierten CRCs eine deutlich höhere GPA33-Expression nachweisen (Baptistella et al., 2016). Da der Grad der Differenzierung bei Tumoren ein wichtiges Merkmal für die Malignität des Tumors darstellt, könnte die GPA33-Expression aus

diesem Grund mit einer guten Prognose für das Outcome bei CRCs in Zusammenhang stehen. Die aktuelle Forschung setzt einen großen Schwerpunkt auf die Beurteilung von Biomarkern, die mit einer schlechten Prognose für das Outcome bei kolorektalen Karzinomen in Verbindung gesetzt werden. Aus diesem Grund erscheint es interessant, GPA33 als Marker, der mit einer guten Prognose in Zusammenhang stehen könnte, weiter zu untersuchen, den Zusammenhang zur WNT-Aktivität und zur β -Catenin-Verteilung innerhalb des Tumors darzustellen und damit gegebenenfalls weitere Aufschlüsse über mögliche, inadäquate Therapieansprechraten im Rahmen der GPA33-Antigennutzung bei CRCs zu liefern (Frey et al., 2008; Priolli et al., 2010; Baptistella et al., 2016). Für die GPA33-Proteinexpressionsmessung soll hierbei im weiteren Verlauf dieser Arbeit neben der am häufigsten verwendeten semiquantitativen mikroskopischen Bewertungsmethode von Antikörperfärbungen bei histologischen Präparaten eine neue, objektivierte und softwareunterstützte Quantifizierungsmethode für den Proteinexpressionsnachweis entwickelt, angewendet und validiert werden.

2. Ziele der Arbeit

Mit dieser Arbeit soll die Eignung von GPA33 als möglicher prognostischer Marker, der mit einer guten Überlebensprognose bei kolorektalen Karzinomen potentiell in Verbindung stehen könnte, durch den Einsatz einer neu entwickelten, objektivierten Protein-expressions-Messmethode untersucht werden. Dabei soll nach Validierung der Messmethode der Einfluss der Expression von GPA33 auf das tumorspezifische und progressionsfreie Überleben am Beispiel eines UICCII-Patientenkollektivs hervorgehoben werden. Die Arbeit verfolgt in diesem Zusammenhang folgende Kernziele:

1. Darstellung der Expression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen.
2. Beurteilung des Zusammenhangs von GPA33 mit der WNT-Aktivität.
3. Entwicklung, Anwendung und Validierung einer objektivierten Quantifizierungsmethode für die GPA33-Expression im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront.
4. Bewertung der Eignung von GPA33 als Prognose-Biomarker.

3. Materialien, Datensätze und Software

3.1 Tissue Microarrays

In dieser Arbeit wird ein bisher noch nicht angefärbtes TMA-Kollektiv aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München, das Gewebeproben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen enthält, verwendet. Das Kollektiv enthält die Proben von 209 CRC-Patienten, die zwischen 1995 und 2007 am Klinikum der LMU München operiert wurden (UICCII-Kollektiv, ungefärbt).

Des Weiteren wird ein zusätzliches TMA-Kollektiv, welches aus dem gleichen TMA-Block gewonnen wurde und zu dem gerade erwähnten UICCII-Kollektiv korrespondierend ist, genutzt. Dieses Kollektiv wurde bereits mit einem β -Catenin-Antikörper angefärbt, enthält wie das erste TMA-Kollektiv die Proben von 209 CRC-Patienten und wird ebenfalls aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München bezogen (UICCII-Kollektiv, β -Catenin-Färbung).

Neben den beiden UICCII-TMA-Kollektiven werden für Vergleichsarbeiten zudem auch einzelne TMA-Objektträger mit Proben von Patienten mit Kolon-Normalschleimhaut, ebenfalls aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München bereitgestellt, verwendet (TMA-Objektträger mit Kolon-Normalschleimhaut).

3.2 GPA33-Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der monoklonale GPA33-Antikörper A33 clon e-8 der Firma St. Cruz Biotechnology (Produktnummer: SC-398702) eingesetzt.

3.3 VENTANA BenchMark XT Färbesystem

Durch ein immer höheres Probenaufkommen und durch Steigerung der Komplexität in der Diagnostik des pathologischen Laboralltags ist es notwendig, die Abläufe in der Analytik effizient zu gestalten. Für die Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit das VENTANA BenchMark XT Gerät des Unternehmens Ventana Medical Systems, Inc.

verwendet (Abbildung 9). Das Gerät wurde vom Pathologischen Institut der LMU München bereitgestellt und bietet die Möglichkeit, alle Schritte der Immunhistochemie flexibel automatisiert durchführen zu können. Zur Durchführung der Arbeitsschritte wurde zudem das ultraView Universal DAB Detektionskit, ebenfalls von der Firma Ventana Medical Systems, Inc., benutzt. Mit Hilfe von Detektionskits können unter anderem Molekülzielstrukturen in Gewebsschnitten identifiziert werden (Roche, 2020).



Abbildung 9: VENTANA BenchMark XT Färbesystem. Darstellung eines VENTANA BenchMark XT Färbesystemgeräts des Unternehmens Ventana Medical Systems, Inc., das zur Immunhistochemie verwendet wurde. Übernommen von Roche, 2020.

3.4 Gewebescanner Nanozommer SQ

In Zeiten der Digitalisierung nimmt der Einsatz von neuer Technik und Software eine immer bedeutendere Rolle ein. Seit vielen Jahren wird auch im Rahmen der histologi-

schen Analyse von Gewebeproben diese Möglichkeit genutzt. Verschiedene Protokollsysteme können je nach Intention des Scanvorgangs hochauflösende Images erzeugen, welche anschließend zur weiteren digitalen Bearbeitung verwendet werden können. Vor allem Tissue Microarrays werden häufig nach dem Fixationsvorgang auf ihren Objektträgern mittels Scanvorgang digitalisiert. Um einen breiten Zugang zu digitalisierten Proben zu ermöglichen, wurde im Jahr 2003 der Human Protein Atlas, eine frei zugängliche Datenbank mit mehr als fünf Millionen hochauflösenden Bilder von Geweben, Tumoren und Zellen, entwickelt. Dabei wird standardmäßig eine 20-fache Vergrößerung für Gewebe und eine 40-fache Vergrößerung für Zellen verwendet (Kampf et al., 2012; Human Protein Atlas, 2020).



Abbildung 10: Darstellung des Nanozoomers SQ der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH. Abbildung des Nanozoomers SQ der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, der zur Digitalisierung der angefärbten TMAs verwendet wurde. Übernommen von Nanozoomer, 2020.

In dieser Arbeit wurde der histologische Gewebescanner Nanozoomer SQ der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH (Abbildung 10) für die Digitalisierung der

Tissue Microarrays des Patientenkollektivs, nachdem diese mit dem GPA33-Antikörper angefärbt wurden, eingesetzt. Das Scangerät ist mit einer speziellen Software ausgerüstet, die es ermöglicht, bestimmte Scaneinstellungen vor dem Digitalisierungsvorgang vorzunehmen und nachdem die TMAs eingelesen wurden, diese unter anderem direkt zu beurteilen oder als Bilddatei abzuspeichern.

3.5 Mikroskope

Für die histologischen Untersuchungen und Nachkontrollen wurden die standardisierten Mikroskope der Laboreinrichtungen des Pathologischen Instituts der LMU München verwendet. Mit Hilfe einer Mikroskop-Kamera wurden Bilder von den relevanten Gewebebereichen für die Nutzung in dieser Arbeit erstellt.

3.6 Datensätze

In dieser Arbeit wurden mehrere Datensätze verwendet. Für das bereits im TMA-Abschnitt erwähnte UICCII-Kollektiv wurden die tumorspezifischen Daten und die Follow-up-Daten aus dem Tumorregister München (TRM) bezogen. Der Datensatz enthält die Informationen von insgesamt 209 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und liefert Aussagen zum Alter, dem Geschlecht, dem Tumorgrad, dem Tumorstadium, der Tumorprogression und den Überlebensdaten (UICCII-Datensatz).

Des Weiteren wurden die Genexpressionsdaten und die korrespondierenden, klinischen Daten eines zusätzlichen Kollektivs von Patienten mit kolorektalen Karzinomen von der Homepage „The Cancer Genome Atlas“ des US-amerikanischen Nationalen Krebsinstituts (NCI) heruntergeladen (Cancer Genome Atlas, 2020). Dieser Datensatz enthält die Informationen von insgesamt 457 CRC-Patienten (TCGA-Datensatz).

Von der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank des US-amerikanischen Nationalen Zentrum für Biotechnologieinformation (NCBI) wurden zudem drei Genexpressionsdatensätze GSE14333, GSE17536, GSE39582 heruntergeladen (GEO, 2020).

3.7 Softwareprogramme

Neben verschiedenen Datensätzen wurden auch verschiedene Softwareprogramme zur weiteren Bearbeitung der Daten angewendet. In dieser Arbeit kam die Visualisierungs- und Analysesoftware der GENE-E-Plattform des Broad Instituts (Cambridge, Massachusetts, USA) zum Einsatz, mit der unter anderem die Erstellung von Heatmaps, Clustern und Diagrammen aus Genexpressionsdatensätzen möglich ist. Die Plattform GENE-E wurde von Joshua Gould entwickelt und ist frei zugänglich (Broad Institut, 2020). Des Weiteren wurde zur Bewertung der digitalisierten TMAs und zur Entwicklung der objektivierten Quantifizierungsmethode die Analysesoftware Fiji verwendet. Fiji ist ein Open-Source-Programm, das auf Grundlage der ebenfalls frei zugänglichen Software ImageJ basiert und zusätzlich zahlreiche, weitere Plug-Ins beinhaltet. Entwickelt wurde die Software von Wyane Rasband am US-amerikanischen Nationalen Gesundheitsinstitut (NIH, Bethesda, Maryland, USA) als Folgeprojekt der älteren Software NIH-Image. Wegen seines kostenlosen Zugangs bietet Fiji eine sehr gute Basis zur Ausbildung in der digitalen Bildverarbeitung. Daneben wird die Software vor allem in der Labortätigkeit der Biologie und der Medizin eingesetzt. Mit der Hilfe von Fiji können Gewebeproben und Zellen direkt bearbeitet und analysiert werden. Die Bearbeitung erfolgt in manueller Anwendung mittels eines einfach zu bedienenden „Werkzeug-Tools“ (Burger und Burge, 2015; Fiji, 2020). Der Digitalisierungsschritt der TMAs über den Nanozommer SQ wurde mit Einsatz der Nanozommer-Digitalisierungssoftware der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH durchgeführt. Der Zugang für die Genexpressionsprofile wurde über die Statistiksoftware R (Version 3.5.1), entwickelt vom R Core Team, erhalten. Für die weiterführenden statistischen Analysen dieser Arbeit wurde die SPSS-Software (Version 26) der Softwarefirma IBM benutzt. Die Bearbeitung der Grafiken erfolgte mit der Software Prism (Version 8) der Graphpad Software Inc. und mit der Software Corel Draw 2019 des kanadischen Technologiekonzerns und Softwareherstellers Corel Corporation.

4. Methodik

4.1 Arbeitsschritte zur Beurteilung der Expression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen

Für eine erste Einordnung wurde versucht, über eine mikroskopische Untersuchung die Expression von GPA33 in TMAs von Patienten mit kolorektalen Karzinomen darzustellen. Um die Expression des GPA33-Proteins aufzuzeigen, wurde eine Immunhistochemie (Antikörperfärbung) an einem TMA-Kollektiv mit Gewebeproben von CRC-Patienten (UICCII-Kollektiv), welches aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München bereitgestellt wurde, durchgeführt. Zunächst wurde ein passender GPA33-Antikörper für die Kollektivfärbung ausgewählt. Hierbei wurde der GPA33-Antikörper A33 clon e-8 der Firma St. Cruz Biotechnology (Produktnummer: SC-398702) bestimmt. Daraufhin erfolgte der Antikörperanfärbungsprozess (Bubendorf et al., 2001; Moch et al., 2001). Zunächst wurden 5 µm dicke TMA-Schnitte aus dem Formalin-fixierten Paraffinblock mit den Gewebeproben der CRC-Patienten (UICCII-Kollektiv) hergestellt, welche anschließend deparaffiniert und daraufhin mit dem GPA33-Antikörper A33 clon e-8 der Firma St. Cruz Biotechnology angefärbt wurden. Für den Färbeprozess wurde das VENTANA BenchMark XT Gerät und das ultraView Universal DAB Detektionskit der Firma Ventana Medical Systems verwendet. Die Anfärbung der TMAs erfolgte in dieser Arbeit mittels indirekter Immunhistochemie. Verwendet wurde der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin. Nachdem das Kollektiv angefärbt wurde, wurden einzelne TMAs des CRC-Patientenkollektivs zur weiteren mikroskopischen Untersuchung ausgewählt. Zur besseren Einordnung wurden zusätzlich TMA-Schnitte mit GPA33-angefärbter physiologisch normaler Darmschleimhaut, ebenfalls bereitgestellt vom Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München, hinzugezogen. Dadurch konnte zunächst ein direkter Vergleich zwischen physiologisch normaler Darmschleimhaut und Darmschleimhaut von CRC-Patienten durchgeführt werden. Unter Nutzung der Mikroskopkamera wurden jeweils exemplarisch Ausschnitte der angefärbten Darmschleimhaut zur besseren Gegenüberstellung festgehalten. Anschließend erfolgte nun noch eine spezifische mikroskopische Betrachtung der intratumoralen GPA33-Expression anhand einzelner, ausgewählter TMAs des CRC-Patientenkollektivs zur Detektion von GPA33-Verteilungsmustern. Auch hier wurden Ausschnitte der Expressionsverteilungsmuster durch Einsatz der Mikroskopkamera erstellt.

4.2 Vergleich der Expression von GPA33 mit der WNT-Aktivität und der β -Catenin-Expression

Im nächsten Schritt wurde nun der Zusammenhang zwischen der GPA33-Expression, der WNT-Aktivität und der β -Catenin-Expression genauer untersucht. Zur Darstellung der Assoziation der GPA33-Expression mit der WNT-Aktivität wurden zunächst drei Genexpressionsdatensätze GSE14333, GSE17536, GSE39582 von der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank heruntergeladen (Vermeulen et al., 2010; Horst et al., 2012; GEO, 2020). Zunächst wurden die Genexpressionsdatensätze mit dem Robust Multiarray Average (RMA) Algorithmus über die Custom Brainarray CDF Datei (Version 19) in der Software R zugänglich gemacht (Grunewald et al., 2015; Sahay et al., 2015). Die Genexpressionsdatensätze enthalten Informationen von Kolonkarzinomzellen mit niedriger und hoher WNT-Aktivität. Anschließend wurde eine Pearson-Korrelationsanalyse der GPA33-Expression und der Expression der anderen Gene in Bezug auf die WNT-Aktivität durchgeführt. Die Gene wurden daraufhin nach ihren Korrelationswerten geordnet. Unter Nutzung der Visualisierungs- und Analysesoftware der GENE-E-Plattform des Broad Instituts wurden anschließend die Ergebnisse der GPA33-Expression und die Expressionsergebnisse ausgewählter Gene der Caco-2-Zelllinie zur besseren Übersicht in einer Heatmap dargestellt. (Sambuy et al., 2005; Verhoeckx et al., 2015; Broad Institut, 2020).

Daraufhin wurde nun der Zusammenhang der GPA33-Expression mit der β -Catenin-Expression weiterführend untersucht. Hierbei wurde ein Vergleich der GPA33- und der β -Catenin-Expression bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden einzelne, mit β -Catenin-Antikörpern angefärbte TMAs des UICCII-Kollektivs, bereitgestellt vom Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München, ausgewählt und mit ihren korrespondierenden TMAs, die bereits in dieser Arbeit mit den GPA33-Antikörpern angefärbt wurden, mikroskopisch auf einen Expressionszusammenhang verglichen. Mittels Mikroskopkamera-Nutzung wurden erneut Ausschnitte zur grafischen Gegenüberstellung festgehalten.

4.3 Entwicklung, Anwendung und Validierung einer objektivierten Quantifizierungsmethode für GPA33

Im nächsten Schritt konnten die TMAs des UICCII-Kollektivs, die mit den GPA33-Antikörpern angefärbt wurden, durch den Einsatz des Gewebescanners Nanozoomer SQ der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH digitalisiert werden. Dazu wurde das Objektiv mit der 40-fachen Vergrößerung verwendet (Human Protein Atlas, 2020). Nach Einlegen der TMAs in das Scangerät wurde zunächst eine automatische Fokusausswahl durch die Software durchgeführt und angeboten. Daraufhin konnte der Scanbereich durch eine manuelle Nacharbeitung noch vor dem eigentlichen Scanvorgang individuell angepasst werden. Der Scanvorgang benötigte für jedes TMA circa 12 Minuten und wurde an insgesamt 12 TMAs für insgesamt 209 Patienten durchgeführt. Anschließend wurden die eingescannten TMAs auf ihre Qualität überprüft. Bei nicht ausreichender Schärfequalität erfolgte eine Wiederholung des Scanvorgangs. Im nächsten Schritt wurden nun manuell Regions of Interest (ROIs) für jede Patientenprobe ausgewählt. Ziel war es, repräsentative Bereiche zu detektieren, die das Tumorzentrum und die Tumordinvasionsfront darstellen. Anschließend wurden zu jedem Patientengewebe über das integrierte Bildbearbeitungsprogramm der Scansoftware mehrere Screenshots angefertigt. Mit Hilfe der Screenshots wurde daraufhin eine Bilddatenbank für das verwendete TMA-Kollektiv erstellt, die in den nächsten Arbeitsschritten zur weiteren Genexpressionsanalyse benutzt werden konnte. Zur Überprüfung der Qualität der Bilder wurde die Datenbank des Human Protein Atlas verwendet (Human Protein Atlas, 2020).

Die erstellte TMA-Bilddatenbank wurde im darauffolgenden Schritt mit Hilfe der Software Fiji weiter analysiert. Dazu wurden die erstellten Bilddateien der angefärbten TMAs zunächst in das Fiji-Bearbeitungstool via Drag-and-Drop geladen. Im nächsten Schritt wurde nun das manuelle Tool der Software verwendet. Über die Befehle „Image“ -> „Color“ -> „Color Deconvolution“ -> „HE DB“ wurde die implementierte Bilddatei in die Grundfarbstoffe aufgespalten. Dabei wurden von der Software drei zusätzliche Bilddateien angeboten (Abbildung 11).

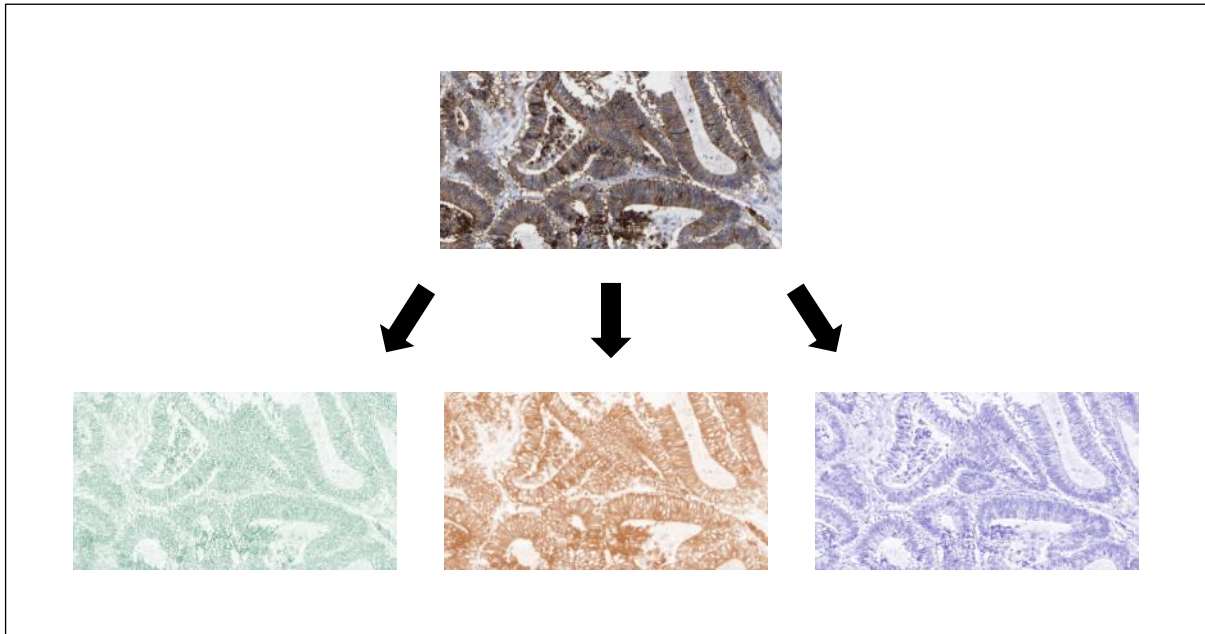


Abbildung 11: Übersicht des Dekonvolutionsschritts. Schematische Darstellung des Dekonvolutionsschritts, bei dem die in das Softwareprogramm Fiji implementierte Bilddatei in seine drei Grundfarbstoffe aufgespalten wird.

Von den drei zusätzlich angebotenen Bilddateien wurde die Datei mit der braunen Farbausplitterung ausgewählt. Anschließend wurde ausschließlich diese Bilddatei weiter mit der Software Fiji bearbeitet. Im nächsten Schritt konnte die Datei über die Funktion „Image“ -> „Adjust“ -> „Threshold“ in eine rot-weiße Bilddatei mit unterschiedlichen Intensitätsbereichen des roten Farbstoffs für die weitere Bearbeitung umgewandelt werden (Abbildung 12).

Daraufhin wurden unter Nutzung des Fiji-Bearbeitungstools manuell Bereiche im Tumorzentrum und an der Tumordinvasionsfront eingezeichnet und von diesen Bereichen eine Farbintensitätsmessung durchgeführt. Die Grundüberlegung für diesen Schritt war, dass die Intensitätsmessung direkt mit der Bindung des zur Anfärbung verwendeten Antikörpers an die GPA33-Antigenstruktur korreliert und somit eine Aussage über das Ausmaß der Genexpression liefert. Die Intensitätsmessung konnte anschließend über die Funktion „Analyze“ -> „Measure“ durchgeführt werden. Die Ergebnisse wurden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Für jeden Patienten wurden dabei, um Fehlmessungen zu vermeiden, mehrere Messungen durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der Messmethode wird im Kapitel 5.3.1 „Grundlagen und Messvorgang“ noch einmal als Ergebnis dieser Arbeit vorgestellt.

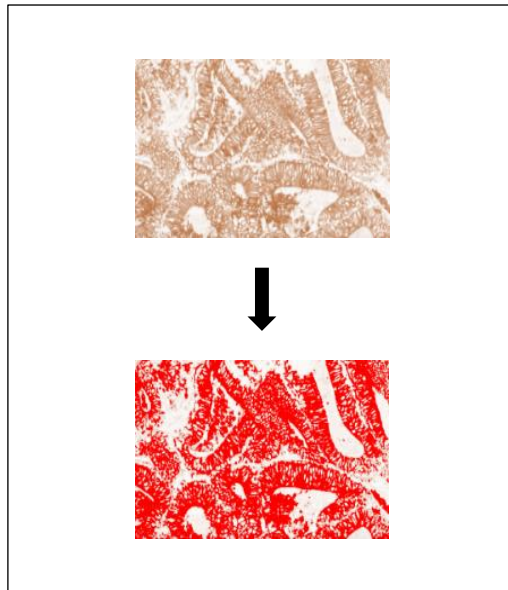


Abbildung 12: Abbildung der Threshold-Umwandlung. Schematische Darstellung der Threshold-Umwandlung der Software Fiji, bei der die ausgewählte braune Bilddatei in eine „rot-weiße“ Bilddatei mit unterschiedlichen Intensitätsbereichen des roten Farbstoffs umgewandelt wird.

Für die Validierung der Messmethode erfolgte eine mikroskopische, semiquantitative Nachkontrolle der Messwertergebnisse. Hierbei wurden zunächst mehrere TMAs mit der GPA33-Anfärbung herausgesucht und unter Mikroskop-Nutzung semiquantitativ bewertet. Insgesamt wurden jeweils 40 TMAs mit hohen und niedrigen GPA33-Expressionswerten in der semiquantitativen Bewertung exemplarisch ausgewählt und die Ergebnisse der semiquantitativen Analyse der TMAs mit den Messwertergebnissen der automatisierten Methode im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront verglichen und auf eine Übereinstimmung überprüft. Die Ergebnisse der Vergleichsanalyse wurden anschließend in Textform unter Angabe der prozentualen Verteilung dargestellt. Im nächsten Schritt erfolgten dann Mittelwert- und Regressionsanalysen der mit der automatisierten Methode ermittelten GPA33-Expressionswerte im Haupttumor und an der Invasionsfront des Tumors unter Nutzung der Software SPSS der Firma IBM. Die Ergebnisse der Mittelwert- und Regressionsanalysen wurden daraufhin grafisch mit Hilfe der Software Corel Draw abgebildet.

4.4 Vergleich der GPA33-Expressionsdaten mit den Outcome-Daten der CRC-Patienten

Zur abschließenden Überprüfung der Eignung von GPA33 als prognostischer Marker bei kolorektalen Karzinomen sollte zunächst eine einführende Testung an einem großen CRC-Patientenkollektiv erfolgen, welche anschließend mit dem UICCII-Kollektiv, welches bereits in dieser Arbeit verwendet wurde, validiert werden sollte. Daher wurden zunächst die Überlebens- und Genexpressionsdaten eines größeren CRC-Patientenkollektivs (TCGA-Kollektiv) von der Homepage des „Cancer Genome Atlas“ heruntergeladen (Cancer Genome Atlas, 2020). Mit diesen Datensätzen wurde anschließend der Zusammenhang zwischen der GPA33-Expression und den Überlebensdaten untersucht. Für die Überlebensanalyse wurden die Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Tests verwendet. Die optimalen Cut-Off-Werte konnten über die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) und den Youden-Index erhalten werden. Die Statistik wurde mit der Software SPSS durchgeführt. Für die Erstellung der Grafiken kamen die Softwareprogramme Prism und Corel Draw zum Einsatz.

Anschließend wurden die ermittelten Expressionsdaten des UICCII-Kollektivs aus dem vorherigen Kapitel nun mit den Outcome-Daten des Patientenkollektivs, bezogen aus dem Tumorregister München, statistisch bewertet. Dabei wurde besonders auf den Zusammenhang der Expression des GPA33-Gens im Tumorzentrum und an der Tumordinvasionsfront und den Überlebens- und Progressionsdaten der einzelnen Patienten eingegangen, um die Eignung von GPA33 als Marker, der potentiell mit einer guten Prognose in Zusammenhang stehen könnte, zu überprüfen. Für die Überlebensanalyse wurden erneut die Kaplan-Meier-Methode und Log-Rank-Tests benutzt. Die optimalen Cut-Off-Werte konnten ebenfalls wieder über die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) und den Youden-Index erhalten werden. Für die univariaten und multivariaten Analysen wurde das Cox-Regressionsmodell verwendet. Für die Analysen kamen wiederum die Softwareprogramme SPSS, Prism und Corel Draw zum Einsatz. Im nächsten Kapitel dieser Arbeit werden nun die Ergebnisse der Analyse dargestellt und beschrieben.

5. Ergebnisse

5.1 Darstellung der Expression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen

GPA33 ist ein Zelloberflächenantigen, das mit einer hohen Spezifität und Sensitivität in Zellen des Gastrointestinaltrakts und in über 95 Prozent der Fälle bei CRCs exprimiert wird. Zur Verdeutlichung der Unterscheide zwischen Kolon-Normalschleimhaut und Tumorgewebe des CRCs wurden in Abbildung 13 eine GPA33-Färbung von normaler Kolonschleimhaut und CRC-Gewebe gegenübergestellt. In beiden Darstellungen wird die GPA33-Expression durch den brauen Farbstoff 3,3-Diaminobenzidin sichtbar gemacht. Zur primären Einordnung der GPA33-Expressionsverteilung bei kolorektalen Karzinomen wurden einzelne TMAs von CRC-Patienten, die mit einem farbgekoppelten GPA33-Antikörper angefärbt wurden, mikroskopisch in Bezug auf ihre Verteilung untersucht. Im Vergleich zur normalen Schleimhaut wird beim CRC die geordnete Struktur aufgegeben. Die Zellkerne sind mit großen Nucleoli gefüllt, die auch eine atypische Form annehmen können. Da die Tumorzellen nicht mehr der Kontakthinderung unterliegen, können Sie ihren Zellverband verlassen und in das umliegende Stroma infiltrieren (Siegenthaler und Blum, 2006).

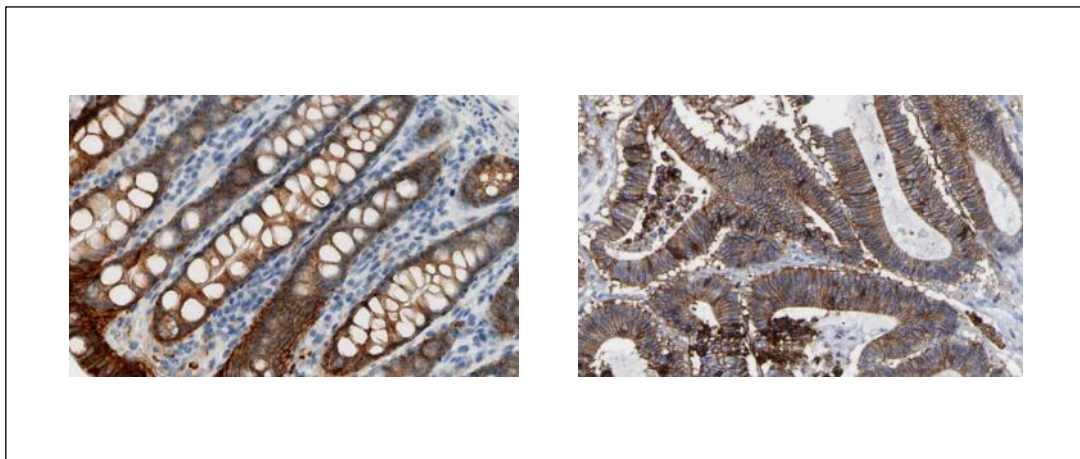


Abbildung 13: Gegenüberstellung der GPA33-Färbung bei normaler Darmschleimhaut (Links) und CRC-Schleimhaut (Rechts). Darstellung zweier histologischer Präparate mit GPA33-Färbung. Im linken Bild wird das Färbeverhalten bei physiologisch normaler Darmschleimhaut dargestellt. Im rechten Bild wird dagegen das Färbeverhalten der Schleimhaut bei einem Patienten mit kolorektalem Karzinom abgebildet. Beim CRC-Patienten zeigen sich Zellen, deren Zellkerne eine atypische Form aufweisen und mit großen Nucleoli gefüllt sind. Zudem wird bei der CRC-Schleimhaut die physiologisch normale, geordnete Struktur aufgegeben.

Im nächsten Schritt wurden die TMAs von Patienten mit kolorektalen Karzinomen mikroskopisch noch genauer betrachtet. In der Beurteilung der einzelnen TMAs konnte festgestellt werden, dass die Expression von GPA33 innerhalb des Tumorgewebes einer heterogenen Verteilung unterliegt. Im Zentrum des Tumors wurde eine starke Färbung und somit eine hohe Expression von GPA33 verzeichnet, wohingegen zum Tumorrand bzw. zur Tumordinvasionsfront hin eine geringere Färbung vorlag. In Abbildung 14 wird die heterogene Verteilung anhand eines Tumorbeispiels zur Verdeutlichung schematisch aufgezeigt. Unter besonderer Betrachtung der einzelnen Zellen wurde in diesem Zusammenhang eine spezifische GPA33-Färbung an den Zellmembranen festgestellt, während das Zytoplasma und das umliegende Stroma keine Färbung aufweisen konnten. Damit konnte zudem die Eigenschaft von GPA33 als Epithel- und Adhäsionsprotein bestärkt werden (Johnstone et al., 2000; Frey et al., 2008; Williams et al., 2015). Da auch die WNT-Aktivität einer heterogenen Verteilung im Tumorgewebe folgt, erschien es sinnvoll den Zusammenhang der WNT-Aktivität und der GPA33-Expression im weiteren Verlauf genauer zu untersuchen.

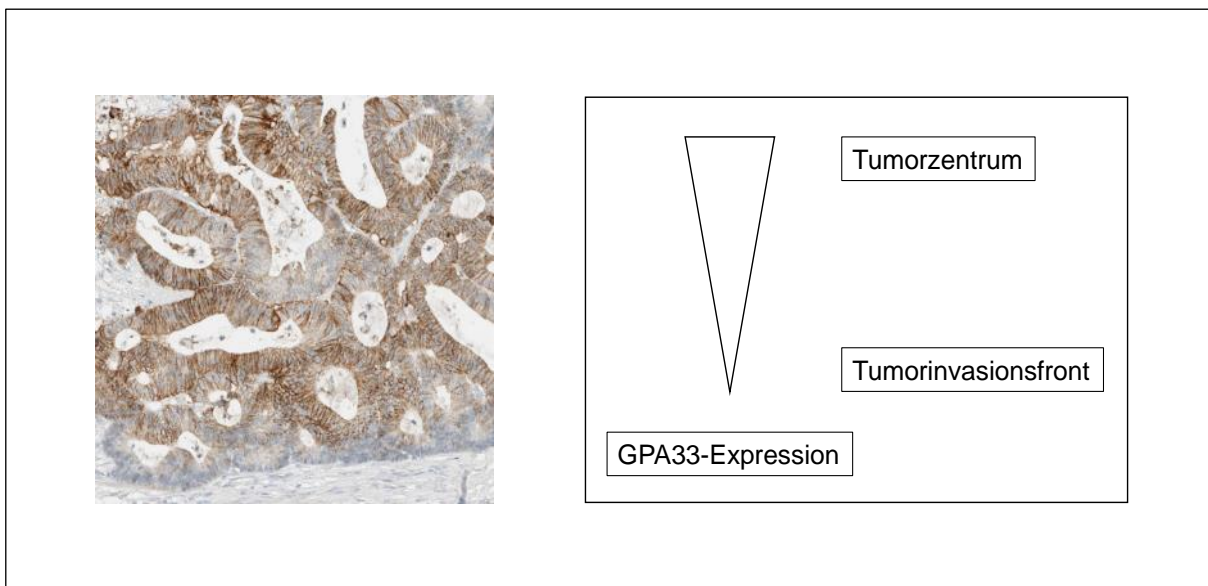


Abbildung 14: Abbildung der heterogenen Verteilung von GPA33 innerhalb des Tumors. Schematische Darstellung der intratumoralen GPA33-Expressionsverteilung anhand eines beispielhaften histologischen Präparats der angefärbten Schleimhaut eines Patienten mit kolorektalem Karzinom (Links). Abbildung des GPA33-Expressionsgefälles vom Tumorzentrum zur Tumordinvasionsfront (Rechts).

5.2 Beurteilung des Zusammenhangs von GPA33 mit der WNT-Aktivität und der β -Catenin-Expression bei kolorektalen Karzinomen

5.2.1 Darstellung der GPA33-Genexpression bei niedriger und hoher WNT-Aktivität

Wie bereits in dieser Arbeit vorgestellt wurde stellt die WNT-Aktivität nicht nur eine besondere Bedeutung für die Tumorentstehung, sondern auch für die Tumorprogression dar (Vermeulen et al., 2010; Horst et al., 2012; Kahn, 2014). Auch wenn sowohl Zellen mit hoher, als auch mit niedriger WNT-Aktivität neue Tumore ausbilden können, kann in nahezu allen kolorektalen Karzinomen eine Aktivierung des WNT-Signalwegs beobachtet werden (Horst, 2013; Buchert et al., 2015).

Zur Identifizierung von Genen, die mit der WNT-Aktivität in Verbindung stehen können, wurden zunächst drei Genexpressionsprofile von Subpopulationen kolorektaler Karzinomzellen mit niedriger und hoher WNT-Aktivität verglichen (Vermeulen et al., 2010; Horst et al., 2012). Hierbei zeigte sich, dass eine hohe WNT-Aktivität mit einer niedrigen GPA33-Expression und eine niedrige WNT-Aktivität mit einer hohen GPA33-Expression korreliert. Die Ergebnisse der Vergleichsanalyse wurden zur besseren Übersicht in einer Heatmap dargestellt (Abbildung 15). Zur Erstellung der Heatmap wurden neben GPA33 noch weitere Gene der Caco-2-Tumorzelllinie ausgewählt. Die Heatmap verdeutlicht, dass die GPA33-Expression eine inverse Korrelation zur WNT-Signalaktivität aufzeigt.

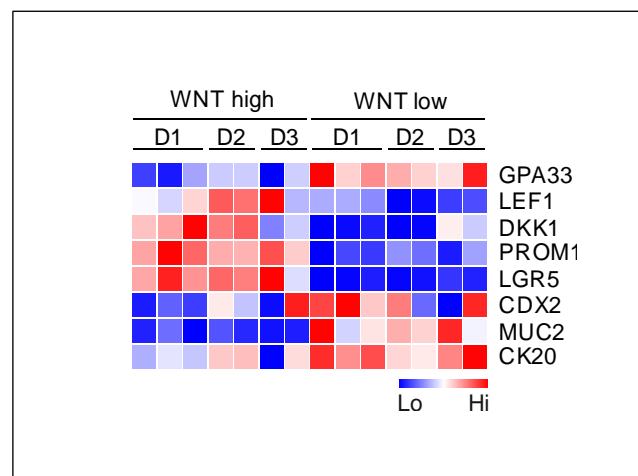


Abbildung 15: Heatmap der Genexpressionsverteilung bei hoher und niedriger WNT-Aktivität.

Heatmap zur Darstellung der inversen Korrelation der GPA33-Expression mit der WNT-Aktivität. Abbildung des Zusammenhangs weiterer ausgewählter Gene der Caco-2-Tumorzelllinie mit der WNT-Aktivität zur besseren Vergleichbarkeit.

5.2.2 Vergleich der Expression von β -Catenin und GPA33

Der WNT-Signalweg wurde im Einleitungsteil dieser Arbeit bereits ausführlich vorgestellt. Dabei wurde auch die besondere Bedeutung von β -Catenin innerhalb dieses Signalwegs verdeutlicht. Da β -Catenin als Effektormolekül des WNT-Signalwegs direkt mit der WNT-Aktivität zu korrelieren scheint, wurde die Vermutung aufgestellt, dass der Zusammenhang zwischen β -Catenin und GPA33 weitere Auskünfte über die inverse Verbindung zwischen der GPA33-Expression und dem Aktivitätsgrad des WNT-Signalwegs liefern könnte. Daher wurden einzelne TMAs mit β -Catenin-Färbung und die jeweils dazu korrespondierenden TMAs mit GPA33-Färbung mikroskopisch verglichen und bewertet. Eine hohe Farbintensität wurde mit einer hohen Gen-Expression in Verbindung gesetzt. Mehrere mikroskopische Vergleichskontrollen führten dabei zu dem Ergebnis, dass eine hohe β -Catenin-Expression mit einer niedrigen GPA33-Expression im Bereich der Tumordinvasionsfront in Zusammenhang steht. Bei Betrachtung des Tumorzentrums war dagegen die GPA33-Expression leicht höher als die β -Catenin-Expression einzuordnen. Der Farbintensitätsunterschied konnte hierbei aber nicht so deutlich wie an der Invasionsfront nachgewiesen werden. Es wurde insgesamt festgestellt, dass die GPA33-Expression im Tumorzentrum höher als an der Tumordinvasionsfront zu bewerten ist. Gleichzeitig zeigte sich an der Tumordinvasionsfront eine höhere β -Catenin-Expression als im Tumorzentrum. In Gesamtschau dieser Ergebnisse konnte somit mikroskopisch sowohl im Tumorzentrum, als auch in der Tumordinvasionsfront eine inverse Korrelation zwischen der GPA33- und β -Catenin-Expression aufgezeigt werden, was die Grundüberlegung zur inversen Korrelation zwischen der GPA33-Expression und der WNT-Aktivität innerhalb kolorektaler Karzinome bestätigen konnte. Abbildung 16 liefert zur Verdeutlichung der inversen Korrelation eine Gegenüberstellung zweier korrespondierender Vergleichspräparate eines CRC-Patienten mit immunhistochemischer GPA33- und β -Catenin-Färbung. In Abbildung 17 werden die Ergebnisse dieser Vergleichsanalyse zur besseren Übersicht schematisch dargestellt und der Bezug zur WNT-Aktivität verdeutlicht.

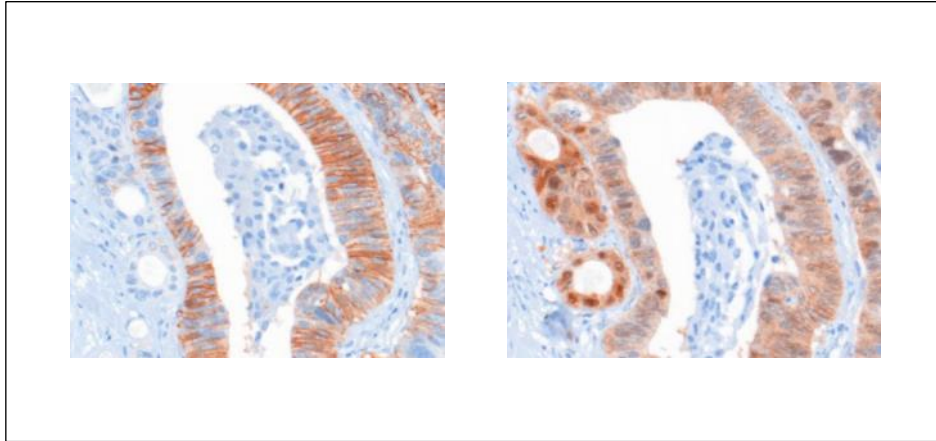


Abbildung 16: Gegenüberstellung der intratumoralen GPA33-Färbung (Links) mit der intratumoralen β -Catenin-Färbung (Rechts). Immunhistochemische Färbung zweier histologischer Vergleichspräparate eines Patienten mit kolorektalem Karzinom. In der linken Abbildung wird eine GPA33-Färbung dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die korrespondierende β -Catenin-Färbung. Darstellung der inversen Expression von GPA33 (Links) im Vergleich zur Expression von β -Catenin (Rechts) vom Tumorzentrum zur Tumordinvasionsfront.

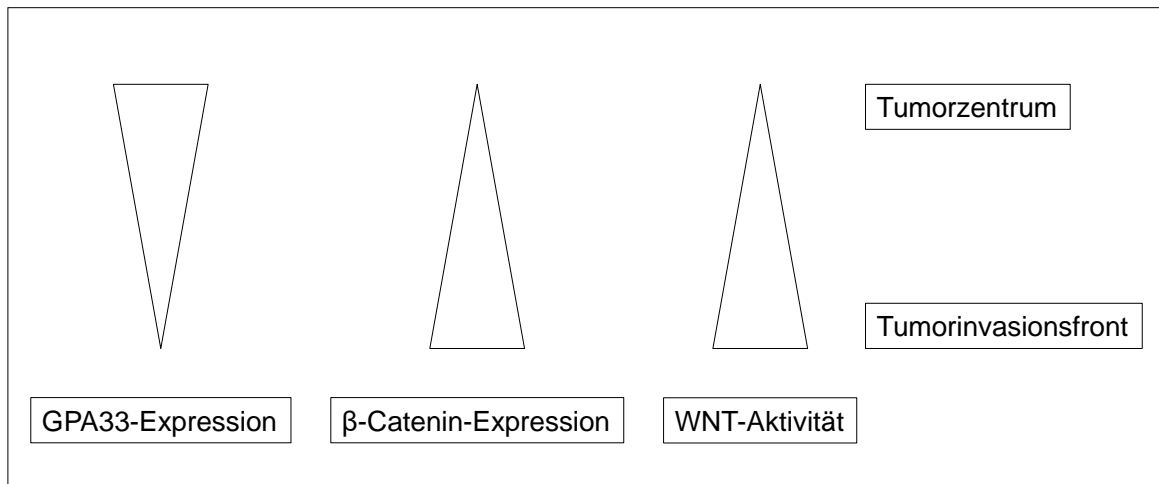


Abbildung 17: Vergleich der intratumoralen Verteilung der GPA33- und β -Catenin-Expression mit der WNT-Aktivität. Schematische Darstellung der intratumoralen Expressionsverteilungen von GPA33, β -Catenin und der WNT-Aktivität. Aufzeigen der inversen intratumoralen Expression von GPA33 im Vergleich zur intratumoralen Expression von β -Catenin und der WNT-Aktivität.

5.3 Darstellung und Validierung der objektivierten Quantifizierungsmethode für GPA33

5.3.1 Grundlagen und Messvorgang

Auch in der heutigen Zeit werden Genexpressionsmessungen in der Pathologie weiterhin meist sehr subjektiv mit Hilfe des Mikroskops analysiert und beurteilt. Die Einteilung der Bewertung erfolgt in diesem Zusammenhang semiquantitativ und schließt meist nur die Bewertungskategorien „wenig“, „mittel“ und „viel“ ein, ohne aber eine genaue Prozentzahl anzugeben. Ziel dieser Arbeit war es, neben der Beurteilung von GPA33 als prognostischen Marker, auch eine neue eigene Methode zu entwickeln, mit der die Genexpression objektiviert werden kann und bei der die einzelnen Analyseschritte leicht und schnell umzusetzen sind. Nach den bereits beschriebenen, standardisierten Arbeitsschritten der TMA-Erstellung, der Antikörperfärbung und der softwareunterstützten Digitalisierung der TMAs wurde für jede Patientenprobe mehrmals eine objektive Intensitätsmessung durchgeführt. Zur Analyse wurde die Software Fiji verwendet. Nach der Digitalisierung wurden zunächst mehrere geeignete Ausschnitte, sogenannte Regions of Interest (ROIs), vom Haupttumor und der Tumordinvasionsfront ausgewählt und hochauflösende Screenshots dieser Bereiche erstellt. Diese Screenshots konnten anschließend in die Software Fiji importiert und dort bearbeitet und analysiert werden. In Schritt 1 wurde die Bilddatei via Drag and Drop in die Software Fiji importiert. Daraufhin wurde in Schritt 2 eine Farb-Dekonvolution durchgeführt. Dabei wurden drei zusätzliche farbaufgesplitterte Bilddateien erhalten. Im nächsten Schritt wurde nur die Bilddatei mit dem braunen Farbstoff weiterverwendet, da für den GPA33-Färbeprozess 3,3'-Diaminobenzidin, ein brauner Farbstoff, benutzt wurde. Die ausgewählte Bilddatei wurde über einen Thresholdbefehl (Schwellenmessungs-Befehl) in eine Bilddatei mit rot-weißem Filter umgewandelt, mit der eine bessere Intensitätsmessung möglich war (Schritt 3). Nun konnte manuell Tumorgewebe im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront durch Nutzung der angebotenen Werkzeuge von Fiji markiert und daraufhin eine Farbintensitätsmessung durchgeführt werden (Schritt 4). Abbildung 18 und 19 stellen die einzelnen Arbeitsschritte der Software Fiji für eine Haupttumor- und eine Tumordinvasionsfrontmessung der GPA33-Expression zur besseren Veranschaulichung grafisch dar.

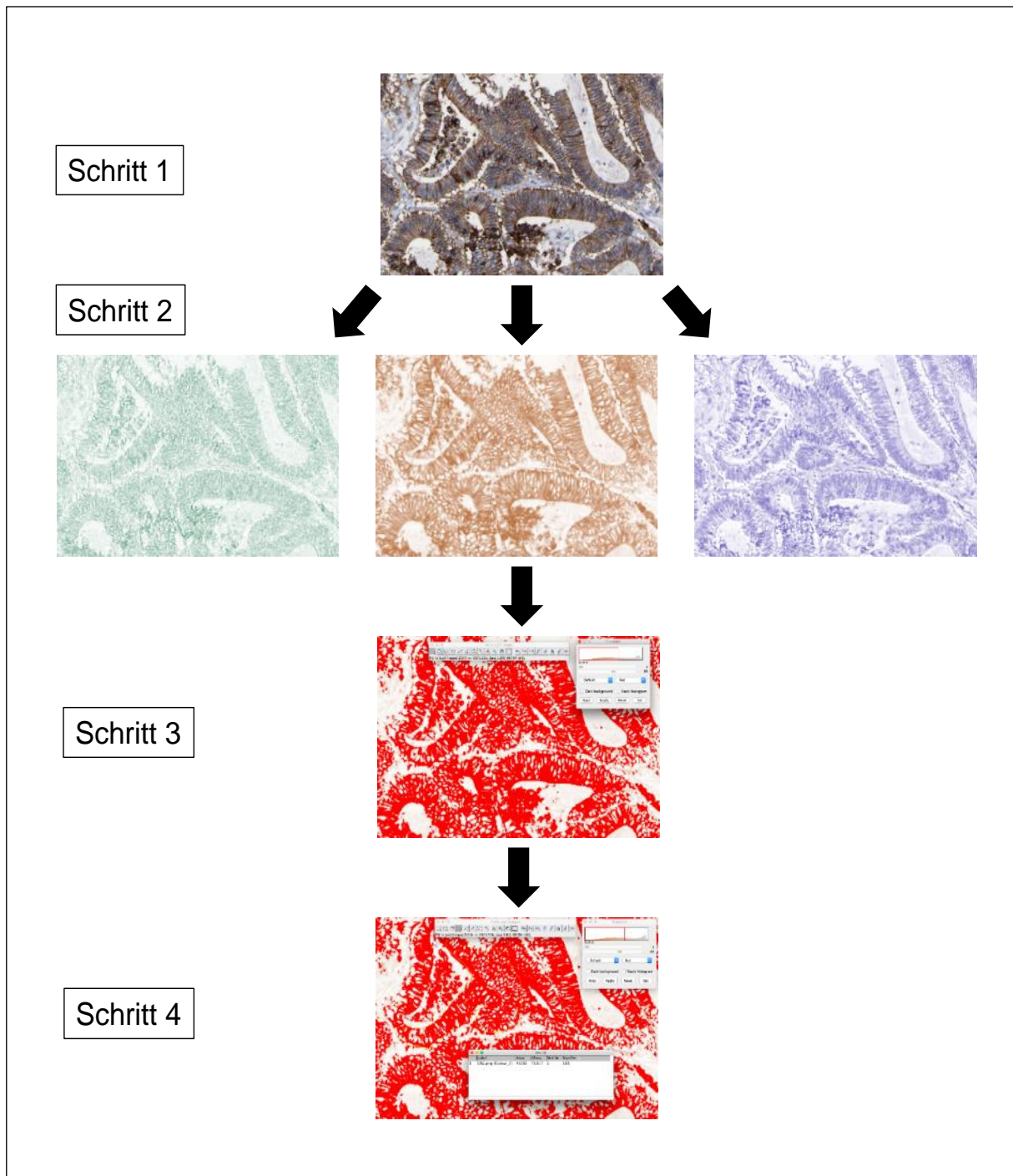


Abbildung 18: Darstellung der Analyseschritte der Software Fiji im Haupttumorbereich des CRCs. Schematische Darstellung der einzelnen Analyseschritte zur Bewertung der GPA33-Expression in kolorektalen Karzinomen anhand von digitalisierten, immunhistochemisch angefärbten, histologischen Präparaten mit Hilfe der Software Fiji. Nach dem Import der Bilddatei (Schritt 1), erfolgte die Dekonvolution (Schritt 2) und die Thresholdbearbeitung (Schritt 3). Anschließend wurde die Intensitätsmessung eines vorher festgelegten Haupttumorbereichs der Bilddatei durchgeführt (Schritt 4).

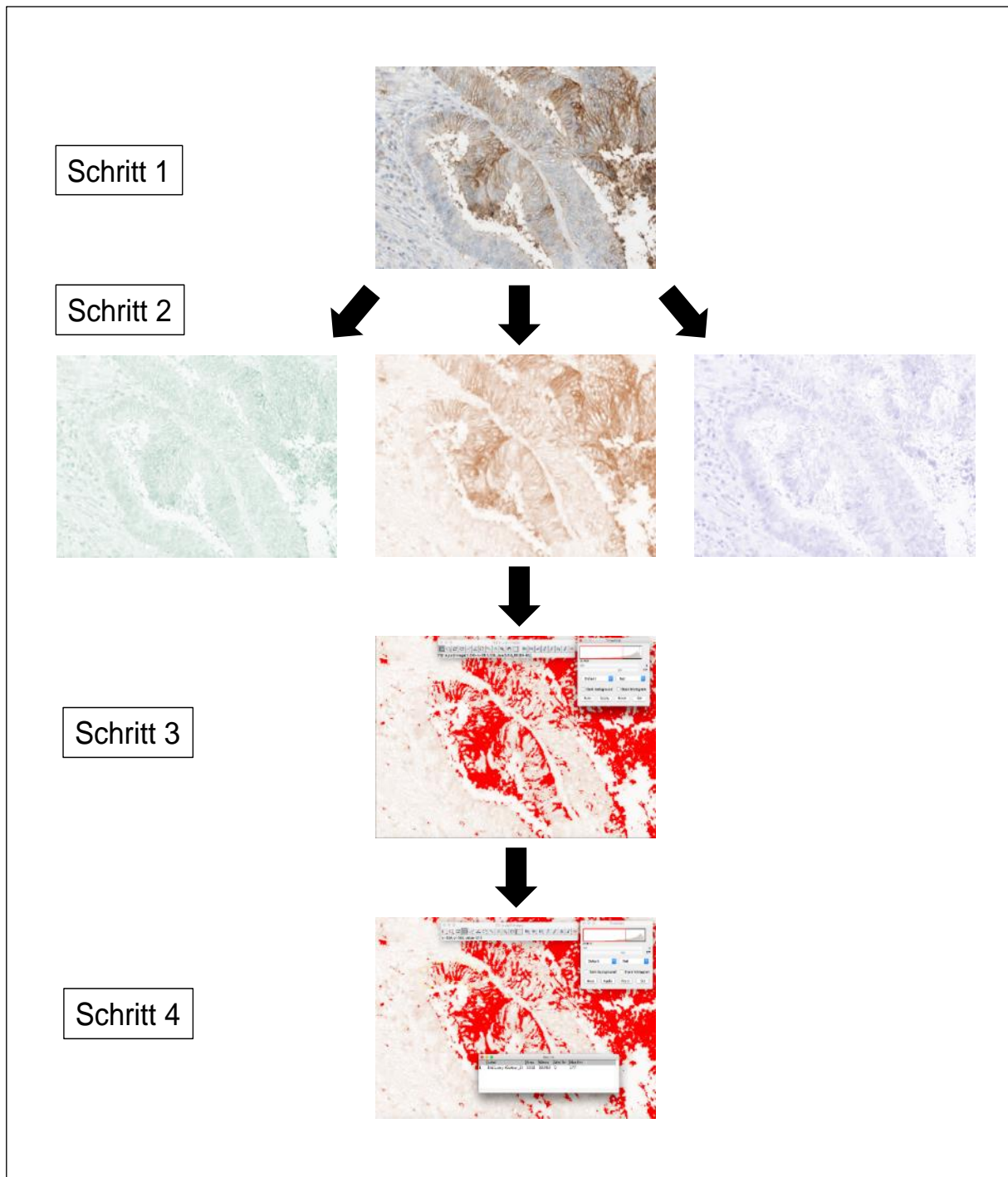


Abbildung 19: Darstellung der Analyseschritte der Software Fiji im Tumorinvasionsfrontbereich des CRCs. Schematische Darstellung der einzelnen Analyseschritte zur Bewertung der GPA33-Expression in kolorektalen Karzinomen anhand von digitalisierten, immunhistochemisch angefärbten, histologischen Präparaten mit Hilfe der Software Fiji. Nach dem Import der Bilddatei (Schritt 1), erfolgte die Dekonvolution (Schritt 2) und die Thresholdbearbeitung (Schritt 3). Anschließend wurde die Intensitätsmessung eines vorher festgelegten Tumorinvasionsfrontbereichs der Bilddatei durchgeführt (Schritt 4).

Hierbei wurden jeweils Messungen bei einem Thresholdabsolutwert von 160 und 200 durchgeführt, um die Möglichkeit zu nutzen, auch nur schwach angefärbte TMAs nochmal weiter zu unterteilen. Die Messungen wurden mehrmals wiederholt, um eine hohe Validität zu gewährleisten. Die Ergebnisse der Messungen wurden anschließend in eine Excel-Tabelle eingetragen. Für jede Patientenprobe wurden mehrere Haupttumor- und Tumorinvasionsfrontwerte mit einer Genauigkeit von vier Nachkommastellen in die Tabelle aufgenommen.

5.3.2 Validierung der Messmethode

Nachdem die Bewertungstabelle fertig gestellt wurde, wurde eine Validierung der Messmethode durchgeführt, um nachzuweisen, ob die Methode auch geeignet ist, die Genexpression von GPA33 im Tumor zu messen und, um zu überprüfen, ob die Methode eventuell auch für weitere Proteinmessungen in Tumoren anwendbar ist.

Im ersten Schritt der Validierung wurde hierbei eine semiquantitative, mikroskopische Bewertung mehrerer ausgewählter TMAs mit GPA33-Färbung aus dem UICCII-Kollektiv durchgeführt. Für den Vergleich der semiquantitativen mit der automatisierten Bewertung wurden hierfür exemplarisch 40 TMAs mit semiquantitativ hoher GPA33-Expressionsbewertung mit den Ergebnissen aus der automatisierten GPA33-Expressionsbewertung im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront verglichen. Insgesamt wurden 20 Messwerte des Haupttumors und 20 Messwerte an der Tumorinvasionsfront eingeschlossen. Es zeigte sich in 39 von 40 Fällen (97,5%) eine Übereinstimmung. Hohe GPA33-Expressionswerte im Haupttumor und hohe GPA33-Expressionswerte an der Tumorinvasionsfront aus der semiquantitativen Bewertung korrelierten mit hohen GPA33-Expressionswerten aus der automatisierten Bewertung. Bei einem Thresholdwert von 200 wies der Mittelwert der prozentualen GPA33-Expressionsausprägung dabei einen Wert von 87,21% im Haupttumor und einen Wert von 40,10% an der Tumorinvasionsfront auf. Die Standardabweichung der Haupttumormessung betrug $\pm 6,50$. Die Tumorinvasionsfrontmessung lieferte eine Standardabweichung von $\pm 8,83$.

Des Weiteren wurden für die Validierung der Messmethode 40 TMAs mit semiquantitativ niedriger GPA33-Expressionsbewertung mit den Ergebnissen aus der automatisierten GPA33-Expressionsbewertung im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront

verglichen. Es wurden wiederum 20 Messwerte des Haupttumors und 20 Messwerte an der Tumorinvasionsfront für den Vergleich hinzugezogen. Es zeigte sich in 38 von 40 Fällen (95,0%) eine Übereinstimmung. Niedrige GPA33-Expressionswerte im Haupttumor und niedrige GPA33-Expressionswerte an der Tumorinvasionsfront aus der semiquantitativen Bewertung korrelierten mit niedrigen GPA33-Expressionswerten aus der automatisierten Bewertung. Bei einem Thresholdwert von 200 wies der Mittelwert der prozentualen GPA33-Expressionsausprägung dabei einen Wert von 34,14% im Haupttumor und einen Wert von 11,70% an der Tumorinvasionsfront auf. Die Standardabweichung der Haupttumormessung betrug $\pm 22,61$. Die Tumorinvasionsfrontmessung lieferte eine Standardabweichung von $\pm 9,41$.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte eine grundsätzliche Übereinstimmung der semiquantitativen, mikroskopischen Bewertung mit den Ergebnissen der automatisierten Bewertung gezeigt und damit ein Validitätsnachweis der neuen objektivierten Messmethode erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Mittelwerte der Messungen der einzelnen Patienten auch die in dieser Arbeit bereits vorgestellte heterogene Verteilung der GPA33-Expression im Tumor nachweisen können. Hierzu wurde für die Thresholdwerte 160 und 200 jeweils ein Vergleich der Expressionsverteilung von GPA33 im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront durchgeführt. Die Ergebnisse der Mittelwertvergleiche werden in Abbildung 20 in Form eines Punktwolkendiagramms dargestellt. Den Punktwolkendiagrammen wurden dabei zusätzlich immer noch das Bestimmtheitsmaß r^2 und der p-Wert der Messung hinzugefügt. Das Bestimmtheitsmaß ist ein Gütemaß zur Beschreibung des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Werten. Der r^2 -Wert liegt dabei zwischen 0 und 1. Je näher der Wert an der 1 liegt, desto besser ist die unabhängige Variable in der Lage, die abhängige Variable vorherzusagen. Folglich kann bei einem Wert von 1 gesagt werden, dass die unabhängige Variable die abhängige Variable vollständig erklärt. Der p-Wert beschreibt dagegen die Wahrscheinlichkeit, bei gezogener Stichprobe, ein solches Stichprobenergebnis zu erhalten, wenn die Nullhypothese wahr ist. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Unterschreitet der p-Wert das Signifikanzniveau, dann wird die Nullhypothese abgelehnt (Statista, 2020).

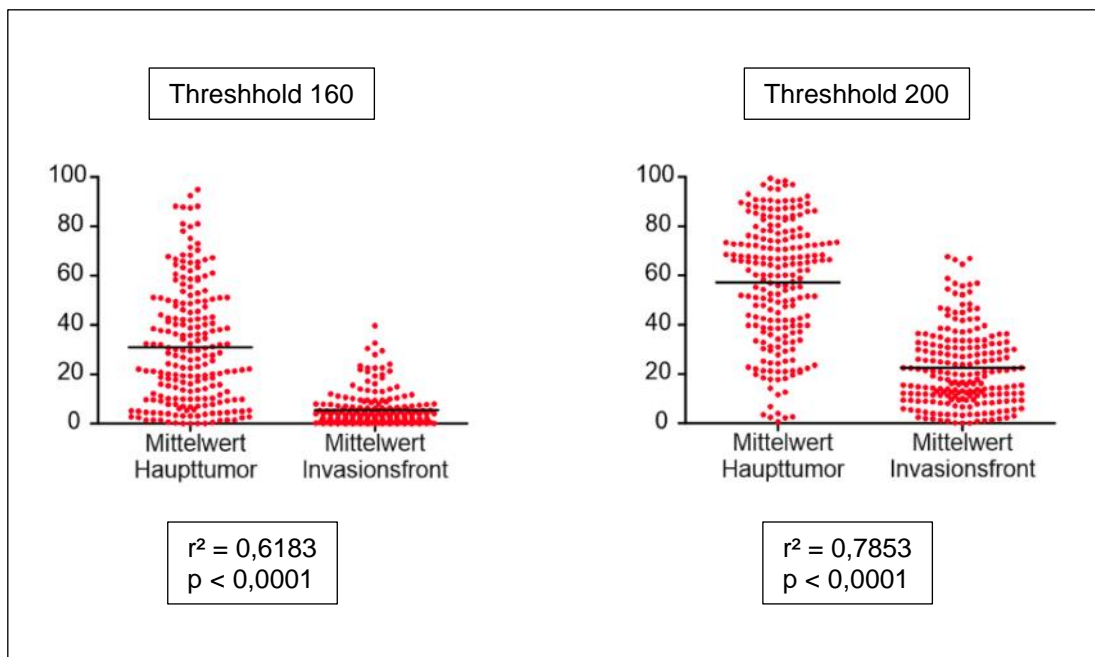


Abbildung 20: Mittelwertvergleich des Haupttumors und der Tumorinvasionsfront bei Thresholdwerten 160 und 200. Schematische Darstellung der Mittelwertvergleiche der GPA33-Expression im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200. Die r^2 -Werte geben das Bestimmtheitsmaß, die p-Werte die Signifikanz wieder (Signifikanzniveau 0,05).

Abbildung 20 verdeutlicht, dass der Median der Farbintensitätsmittelwerte sowohl bei der Schwellenmessung mit Thresholdwert 160, als auch bei der Messung mit Thresholdwert 200 im Haupttumor deutlich höher ist als an der Invasionsfront. Aufgrund der Vorüberlegung, dass die Farbintensität mit der Expression des betrachteten GPA33-Gens in direktem Zusammenhang steht, zeigt dies, dass im Haupttumor eine höhere GPA33-Expression als an der Invasionsfront vorliegt, was die Ergebnisse der vorherigen Kapitel bestätigt. Die r^2 -Werte von 0,6183 und 0,7853 bedeuten einen mittleren bis mittel-hohen linearen Zusammenhang der beiden Mittelwerte der Intensitätsmessung. Außerdem zeigte sich jeweils statistische Signifikanz mit p-Werten kleiner 0,0001 bei vorgegebenem Signifikanzniveau von 0,05. Somit konnte auch durch den Mittelwertvergleich gezeigt werden, dass die Messmethode mit den subjektiven, semi-quantitativen Bewertungen übereinstimmt.

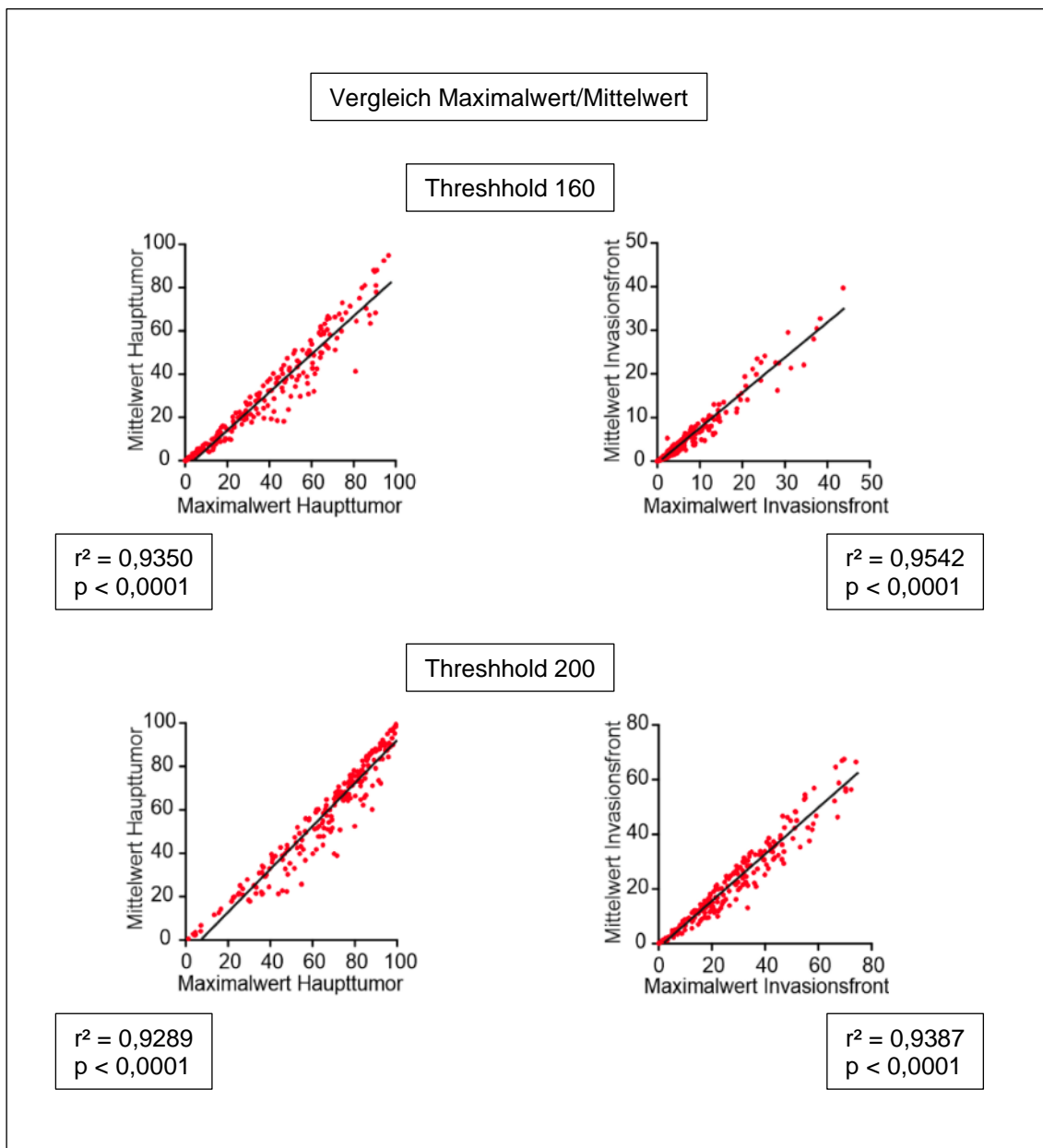


Abbildung 21: Regressionsanalyse zur Validierung der neuen Messmethode. Darstellung der Regressionsanalyse der Mittelwerte der GPA33-Expression mit den gemessenen maximalen GPA33-Expressionswerten im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200. Die r^2 -Werte geben das Bestimmtheitsmaß, die p-Werte die Signifikanz wieder (Signifikanzniveau 0,05).

Anschließend wurden noch die Mittelwerte auf ihren Zusammenhang mit den einzelnen detektierten Messwerten überprüft. Dazu wurden die Mittelwerte mit den jeweils größten Werten einer jeden Patientenmessung bei Thresholdwert 160 und Thresholdwert 200 im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront mit Hilfe einer Regressionsanalyse verglichen. In Abbildung 21 konnte die direkte Verbindung der jeweiligen

Mittelwerte mit den Maximalwerten gezeigt werden. Dabei wurde ein hoher linearer Zusammenhang zwischen den Maximalwerten und den Mittelwerten nachgewiesen, da das Bestimmtheitsmaß jeweils einen Wert von 0,9 übersteigt. Zudem konnte jeweils auch wieder statistische Signifikanz mit einem p-Wert kleiner 0,0001 bei vorgegebenem Signifikanzniveau von 0,05 erzielt werden. Mit dieser Analyse wurde gezeigt, dass bei den Patienteneinzelmessungen die jeweiligen Werte nicht stark verstreut liegen und der Mittelwert somit eine gute Aussagekraft über die Einzelmessungen liefert. Durch den Einsatz der semiquantitativen Nachkontrolle, den direkten Mittelwertvergleich und der anschließenden Mittelwertüberprüfung durch die Gegenüberstellung der Mittelwerte mit den jeweiligen Maximalwerten konnte die neue, objektivierte und softwareunterstützte Messmethode validiert und ihre Eignung für die Genexpressionsmessung von GPA33 nachgewiesen werden. Mit Hilfe der neuen Expressionsmessmethode konnte dabei jedem Patienten ein exakter Wert von 0 bis 100 Prozent für die Expression im Haupttumor und in der Tumordinvasionsfront unter Berücksichtigung unterschiedlicher Intensitätsschwellen (Threshold bei 160 und bei 200) zugeordnet werden. Damit wurde eine Alternative zur klassischen semiquantitativen Bewertungsmethode unter Nutzung des Mikroskops entwickelt, die in ihren Arbeitsschritten auch für die Expressionsmessung von anderen Proteinen innerhalb von Tumoren grundsätzlich angewendet werden kann.

5.4 Überprüfung der Eignung von GPA33 als prognostischer Marker

5.4.1 Nachweis am TCGA-Kollektiv

In diesem abschließenden Kapitel wird nun noch die Eignung von GPA33 als prognostischer Marker überprüft. Bevor eine weitere Analyse der bereits validierten Messergebnisse des UICCI-Kollektivs durchgeführt wurde, wurde GPA33 zunächst einführend als Bioprognosemarker am Beispiel eines großen TCGA-Patientenkollektivs untersucht. Dabei wurden zunächst Überlebens- und Genexpressionsdaten von der Homepage des „Cancer Genome Atlas“ heruntergeladen (Cancer Genome Atlas, 2020) und mit diesen Daten der Zusammenhang zwischen der GPA33-Expression und den Überlebenszahlen ermittelt. Insgesamt stellte das TCGA-Kollektiv die Genexpressionsdaten von 457 Patienten, von denen insgesamt 379 Patienten zusätzlich Follow-Up-Daten besaßen. Die Kaplan-Meier-Analyse und die Log-Rank-Testung des TCGA-

Kollektivs ergaben unter statistischer Signifikanz (p-Wert von 0,018 bei vorgegebenem Signifikanzniveau von 0,05), dass eine hohe GPA33-Expression mit einem längeren tumorspezifischen Überleben in Verbindung steht. Eine niedrige GPA33-Expression weist dagegen ein niedrigeres tumorspezifisches Überleben auf. Diese Ergebnisse deuten an, dass die GPA33-Proteinexpression als Prognosemarker für das Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen potentiell eingesetzt werden könnte (Abbildung 22).

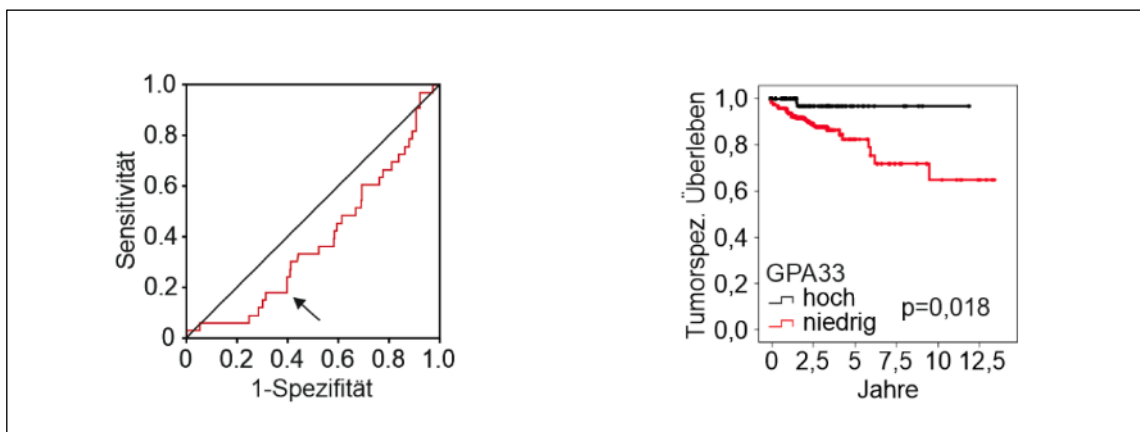


Abbildung 22: ROC-Kurven- und Kaplan-Meier-Analyse des TCGA-Patientenkollektivs. Darstellung der ROC-Kurvenanalyse des TCGA-Patientenkollektivs (Links) mit Abbildung des optimalen Cut-Off-Werts (Pfeil). Zudem Darstellung der Kaplan-Meier-Analyse des tumorspezifischen Überlebens für hohe und niedrige GPA33-Expression unter Nutzung des optimalen Cut-Off-Werts (Rechts). Der p-Wert gibt die Signifikanz der Analyse wieder (Signifikanzniveau 0,05).

5.4.2 Validierung am UICCII-Patientenkollektiv

Im folgenden Schritt wurde versucht, die Ergebnisse aus der TCGA-Kollektivanalyse mit Hilfe eines kleineren Patientenkollektivs zu bestätigen. Dabei wurde das UICCII-Patientenkollektiv, das bereits in dieser Arbeit für die Bewertung bei der neuen, objektivierte und softwareunterstützten Messmethode verwendet wurde, hinzugezogen. Des Weiteren wurden die Messwerte der GPA33-Expression im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront bei unterschiedlichen Thresholdwerten aus dieser Arbeit wieder aufgegriffen.

5.4.2.1 Klinische Daten des UICCII-Patientenkollektivs

Tabelle 1: Klinische Daten und GPA33-Expression im UICCII-Patientenkollektiv
(Tumorinvasionsfrontmessung bei den Thresholdwerten 160 und 200)

Eigenschaften	Total	GPA33-Expression IF160		p	GPA33-Expression IF200		p
		niedrig	hoch		niedrig	hoch	
Alle Patienten	209 (100)	138 (66)	71 (34)		114 (54,5)	95 (45,5)	
Alter:							
< 68 Jahre	102 (48,8)	69 (67,6)	33 (32,4)	0,630	58 (56,9)	44 (43,1)	0,511
≥ 69 Jahre	107 (51,2)	69 (64,5)	38 (35,5)		56 (52,3)	51 (47,7)	
Geschlecht:							
Männlich	114 (54,5)	77 (67,5)	37 (32,5)	0,612	62 (54,4)	52 (45,6)	0,960
Weiblich	95 (45,5)	61 (64,2)	34 (35,8)		52 (54,7)	43 (45,3)	
Tumorgrad:							
niedrig	198 (94,7)	132 (66,7)	66 (33,3)	0,409	107 (54)	91 (46)	0,534
hoch	11 (5,3)	6 (54,5)	5 (45,5)		7 (63,6)	4 (36,4)	
Tumorstadium:							
T3	171 (81,8)	108 (63,2)	63 (36,8)	0,063	89 (52)	82 (48)	0,124
T4	38 (18,2)	30 (78,9)	8 (21,1)		25 (65,8)	13 (34,2)	

Tabelle 2: Klinische Daten und GPA33-Expression im UICCII-Patientenkollektiv
(Haupttumormessung bei den Thresholdwerten 160 und 200)

Eigenschaften	Total	GPA33-Expression HT160		p	GPA33-Expression HT200		p
		niedrig	hoch		niedrig	hoch	
Alle Patienten	209 (100)	87 (41,6)	122 (58,4)		55 (26,3)	154 (73,7)	
Alter:							
< 68 Jahre	102 (48,8)	45 (44,1)	57 (55,9)	0,476	31 (30,4)	71 (69,6)	0,191
≥ 69 Jahre	107 (51,2)	42 (39,3)	65 (60,7)		24 (22,4)	83 (77,6)	
Geschlecht:							
Männlich	114 (54,5)	47 (41,2)	67 (58,8)	0,898	29 (25,4)	85 (74,6)	0,752
Weiblich	95 (45,5)	40 (42,1)	55 (57,9)		26 (27,4)	69 (72,6)	
Tumorgrad:							
niedrig	198 (94,7)	82 (41,4)	116 (58,6)	0,791	51 (25,8)	147 (74,2)	0,437
hoch	11 (5,3)	5 (45,5)	6 (54,5)		4 (36,4)	7 (63,6)	
Tumorstadium:							
T3	171 (81,8)	68 (39,8)	103 (60,2)	0,247	44 (25,7)	127 (74,3)	0,684
T4	38 (18,2)	19 (50)	19 (50)		11 (28,9)	27 (71,1)	

Die Expressionsergebnisse der neuen Messmethode wurden nun im nächsten Schritt mit den klinischen Daten des UICCII-Patientenkollektivs, bezogen aus dem Tumorerregister München, zusammengeführt und zur besseren Übersicht in tabellarischer Form dargestellt. Es wurden die Faktoren Alter, Geschlecht, Tumorgrad und Tumorstadium eingebunden. Die Alterseinordnung erfolgte über den Median des Alters als Grenze. Für die Gruppeneinteilung zwischen hoher und niedriger GPA33-Expression wurde die

Cut-Off-Werte des tumorspezifischen Überlebens aus dem nächsten Kapitel dieser Arbeit verwendet. Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Verknüpfung der Datensätze unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Thresholdwerte und der Expressionslokalisierung im Haupttumor und an der Tumorinvasionsfront auf. Signifikante Einflüsse des Alters, des Geschlechts, des Tumorgades und des Tumorstadiums auf die GPA33-Expression konnten hierbei, beim vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05, in univariater Betrachtung nicht nachgewiesen werden.

5.4.2.2 Analyse des tumorspezifischen Überlebens

Mittels einer ROC-Kurvenanalyse und unter Nutzung des Youden-Indexes wurden die Cut-Off-Werte zur Einteilung der Messgruppen ermittelt. Zunächst wurden mit der Analysesoftware SPSS die einzelnen ROC-Kurven erstellt. Durch Verwendung der Sensitivitäts- und „1 - Spezifitäts“-Werte konnte daraufhin der Youden-Index zur Detektion des jeweils besten Cut-Off-Wertes verwendet werden.

Der Youden-Index ist definiert als die Summe aus der Sensitivität und der „Spezifität – 1“. Theoretisch sind Werte zwischen -1 und 1 möglich, jedoch werden nur Werte zwischen 0 und 1 als sinnvoll erachtet. Der beste Cut-Off-Wert wird über den maximalen Youden-Index bestimmt. Der Youden-Index dient als Maß, mit dessen Hilfe durch Nutzung von ROC-Kurven entschieden werden kann, welcher Schwellenwert die beste Eignung besitzt, um bei einem Messvorgang zwei Gruppen auseinander zu halten (Vexler et al., 2008). Im Folgenden wird zunächst der Zusammenhang von der GPA33-Expression und den Überlebensdaten der Patienten dargestellt (Abbildung 23). Der beste Cut-Off-Wert wurde in den Grafiken mit einem Pfeil abgebildet. Die Darstellung der einzelnen ROC-Kurven zeigte nicht den erwarteten klassischen ROC-Kurvenverlauf. Stattdessen verliefen die ROC-Kurven relativ symmetrisch um die Diagonale, was auf einen Zufallsprozess der Expressionsverteilung hindeutet.

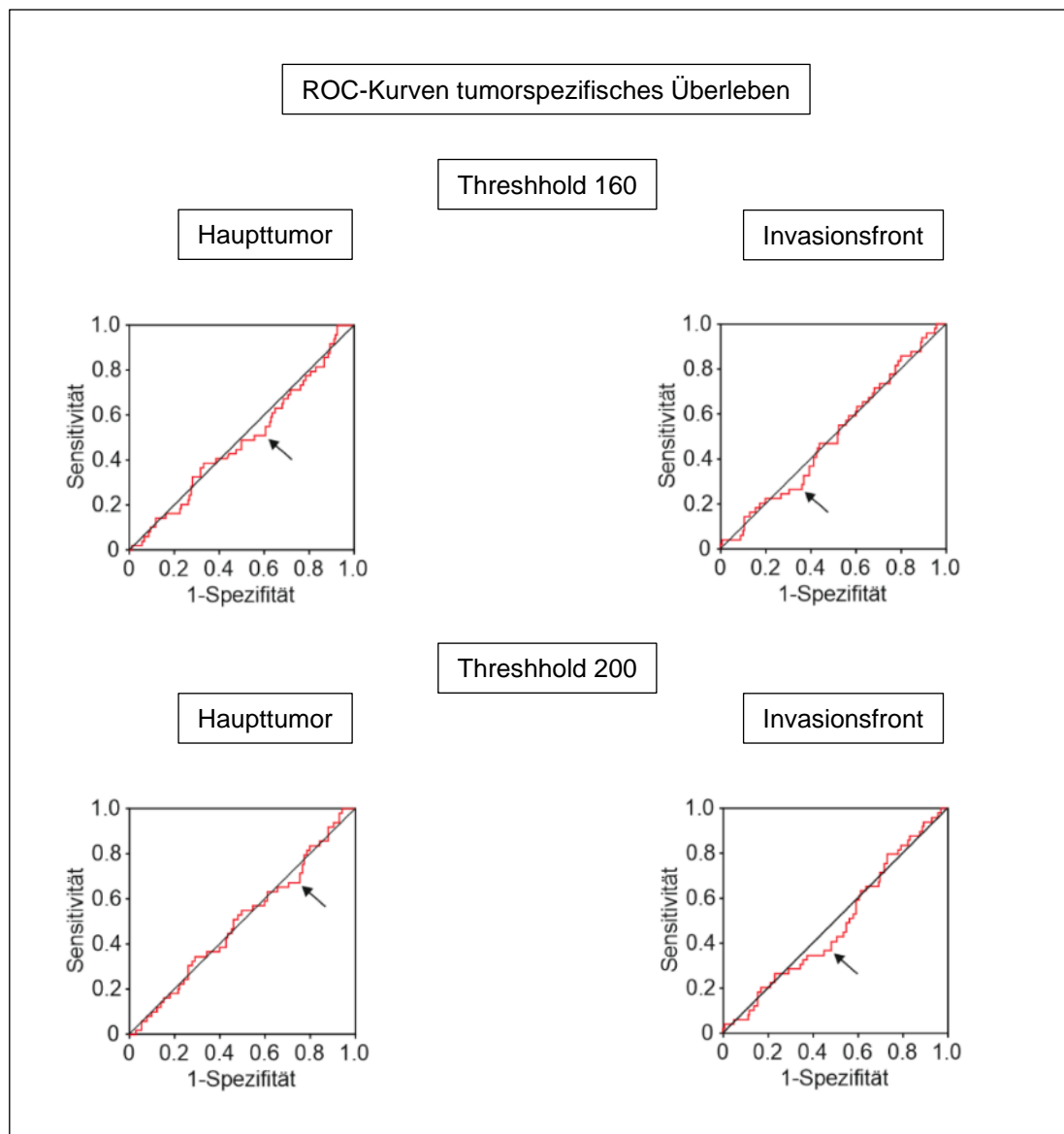


Abbildung 23: ROC-Kurvenanalyse für das tumorspezifische Überleben. Schematische Darstellung der ROC-Kurvenanalysen des tumorspezifischen Überlebens im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200. Zudem Abbildung der optimalen Cut-Off-Werte (Pfeile).

Mit Hilfe der ermittelten Cut-Off-Werte wurde im nächsten Schritt eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Der Kaplan-Meier-Schätzer ist ein Element der Ereigniszeitanalyse. Geprüft wird die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls ein bestimmtes Ereignis nicht eintritt. In der Medizin wird die Kaplan-Meier-Methode für Überlebenszeitanalysen eingesetzt (Goel et al., 2010; Zwiener et al., 2011). Zusätzlich zu den Kaplan-Meier-Kurven wurden auch der Hazard Ratio (HR) Wert und der p-Wert in den Grafiken angegeben. Der Hazard Ratio Wert gibt das Risikoverhältnis für den Eintritt eines bestimmten Ereignisses in einem

vorgegebenen Zeitraum zwischen zwei betrachteten Gruppen an. Das Risiko der beiden Gruppen wird dabei ins Verhältnis gesetzt (Spruance et al., 2004). Der p-Wert wurde wiederum für die Einschätzung der Bewertung zu einem vordefinierten Signifikanzniveau von 0,05 verwendet. Die Kaplan-Meier-Kurven für das tumorspezifische Überleben wurden mit den jeweils ermittelten optimalen Cut-Off-Werten erstellt (Abbildung 24).

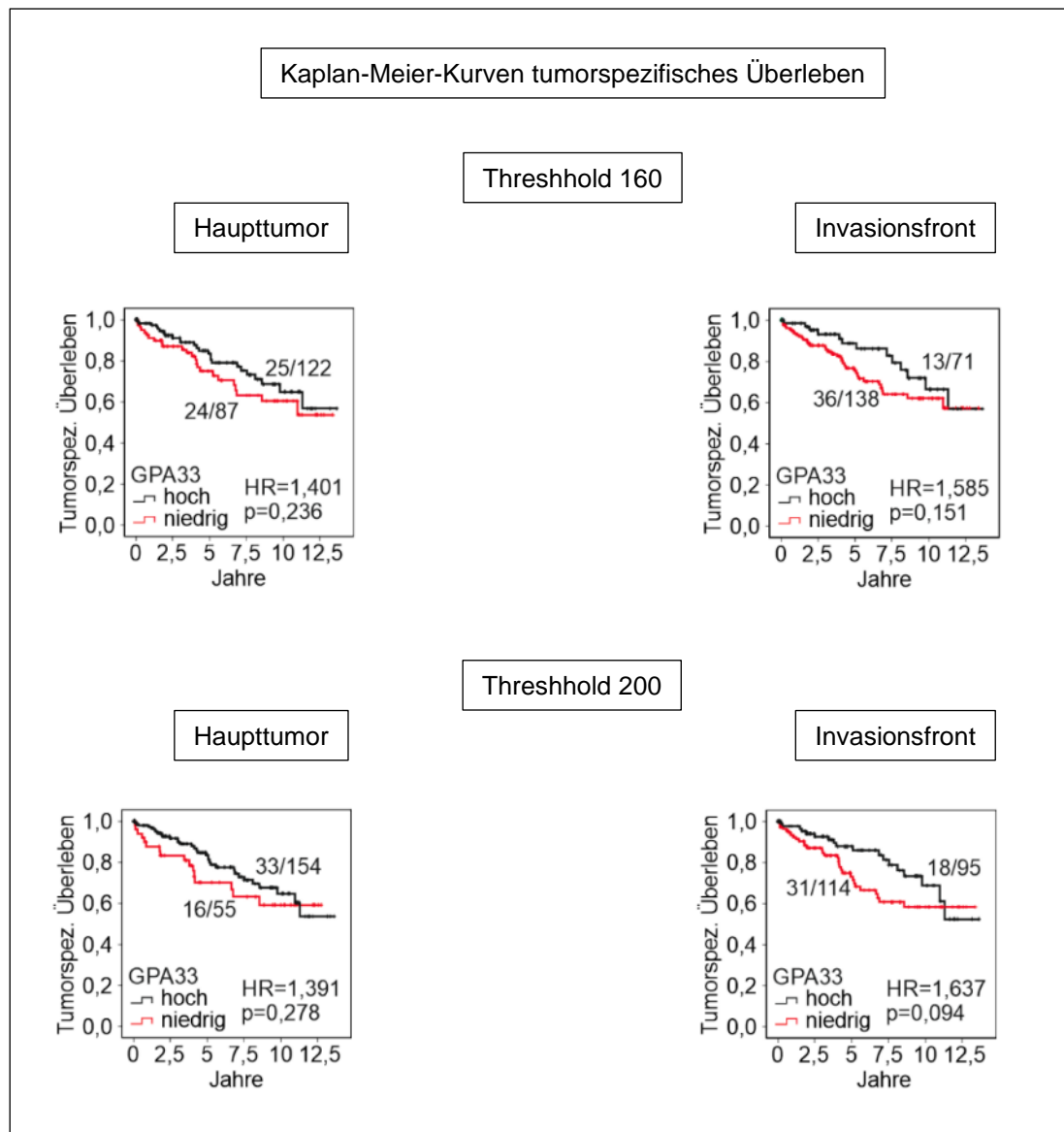


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Analyse für das tumorspezifische Überleben. Schematische Darstellung der Kaplan-Meier-Analysen des tumorspezifischen Überlebens für hohe und niedrige GPA33-Expression im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200 unter Nutzung der optimalen Cut-Off-Werte. Zudem Angabe der jeweiligen Hazard Ratio Werte und der p-Werte der Analysen (Signifikanzniveau 0,05).

Die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse zeigten nicht den erwarteten klassischen Kurvenverlauf mit einer klaren Trennung der Kurven zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen. Dies könnte auf eine Unabhängigkeit der GPA33-Expression zum tumorspezifischen Überleben schließen lassen. Die Hazard Ratio Werte deuteten darauf hin, dass die Patienten mit einem hohen GPA33-Expressionswert im Haupttumor und in der Tumorinvasionsfront eine leicht höhere Wahrscheinlichkeit für ein längeres tumorspezifisches Überleben haben. Die p-Werte konnten dagegen mit Werten größer 0,05 beim vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05 keine statistische Signifikanz zeigen. Jedoch zeigten zumindest einzelne p-Werte, wie beispielsweise der p-Wert von 0,094 bei der Tumorinvasionsfrontmessung mit Thresholdwert 200, dass die Tendenz zur Signifikanz zu erkennen ist und deshalb grundsätzlich auch ein Zusammenhang zwischen der GPA33-Expression und dem tumorspezifischen Überleben bestehen könnte. Zur weiteren Untersuchung wurde die Messergebnisse der GPA33-Expression mit dem p-Wert, der am nächsten zur Signifikanz strebte, für eine multivariate Analyse herangezogen. Es wurden die GPA33-Expressionswerte der Invasionsfrontmessung bei Thresholdwert 200 (p-Wert von 0,094) hinzugezogen und mit weiteren Variablen des Kollektivs unter dem Gesichtspunkt des tumorspezifischen Überlebens untersucht. Unter Berücksichtigung eines möglichen Einflusses weiterer Variablen konnte erneut keine Signifikanz der GPA33-Messergebnisse in Assoziation mit dem tumorspezifischen Überleben gezeigt werden. Es zeigte sich dagegen erwartungsgemäß eine starke Assoziation des Tumorstadiums mit dem tumorspezifischen Überleben.

Tabelle 3: Multivariate Analyse des tumorspezifischen Überlebens für das UICCII-Patientenkollektiv (GPA33-Messwerte der Invasionsfront bei Thresholdwert 200)

Variablen	Tumorspezifisches Überleben		
	HR	(95% Konfidenzintervall)	P
Alter (< 68 / ≥ 69)	1,5	(0,87-2,73)	0,135
Geschlecht (F / M)	0,9	(0,50-1,55)	0,651
Tumorgrad (niedrig / hoch)	1,4	(0,52-4,03)	0,487
Tumorstadium (3 / 4)	2,1	(1,12-3,97)	0,021
GPA33 (niedrig / hoch)	0,7	(0,36-1,19)	0,168

5.4.2.3 Analyse des progressionsfreien Überlebens

Nach Testung der GPA33-Expression in Bezug auf das tumorspezifische Überleben wurde im nächsten Schritt noch der Zusammenhang der Expression des GPA33-Gens mit der Tumorprogression überprüft. Wiederum wurden mittels ROC-Kurvenanalyse und unter Verwendung des Youden-Indexes jeweils die optimalen Cut-Off-Werte bestimmt. Abbildung 25 zeigt die einzelnen ROC-Kurven unter den vorgegebenen Thresholdwerten für das progressionsfreie Überleben. Auch in diesem Fall zeigten die einzelnen Tumorprogressions-ROC-Kurven nicht den erwarteten klassischen ROC-Kurvenverlauf. Wiederum ordneten sich die Kurven sehr nahe und relativ symmetrisch um die Diagonale an, was unter reiner Betrachtung der ROC-Kurven auf einen Zufallsprozess der Expression von GPA33 in Bezug auf die Tumorprogression hindeutet. Die Pfeile weisen wiederum auf die jeweiligen optimalen Cut-Off-Werte hin. Mit Hilfe der über die ROC-Kurven und den Youden-Index ermittelten optimalen Cut-Off-Werte wurden im folgenden Schritt auch für das progressionsfreie Überleben Kaplan-Meier-Kurven ermittelt. In diesem Zusammenhang wurde die Tumorprogression als Endpunkt festgesetzt.

Die einzelnen Kaplan-Meier-Kurven zeigten auch für das progressionsfreie Überleben nicht den erwarteten Verlauf. Anhand der Graphen war keine eindeutige Trennung zwischen den Gruppen mit hoher GPA33-Expression und den Gruppen mit niedriger GPA33-Expression zu erkennen, was wiederum bedeuten könnte, dass die GPA33-Expression auch vom progressionsfreien Überleben unabhängig ist. Die Hazard Ratio Werte deuteten einen leichten Unterschied der beiden Gruppen an. Hierbei könnten Gruppen mit hohen GPA33-Expressionswerten tendenziell ein längeres progressionsfreies Überleben aufzeigen. Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass eine höhere GPA33-Expression sowohl im Haupttumorbereich, als auch in der Tumordinvasionsfront mit einem längeren progressionsfreien Überleben im Zusammenhang stehen könnte. Statistische Signifikanz konnte mit den einzelnen p-Werten beim vorgegebenen Signifikanzniveau von 0,05 wiederum nicht bestätigt werden. In Abbildung 26 werden die einzelnen Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben wieder unter Angabe der Hazard Ratio (HR) und des p-Wertes (Signifikanzniveau 0,05) für die jeweils berechneten Cut-Off-Werte dargestellt.

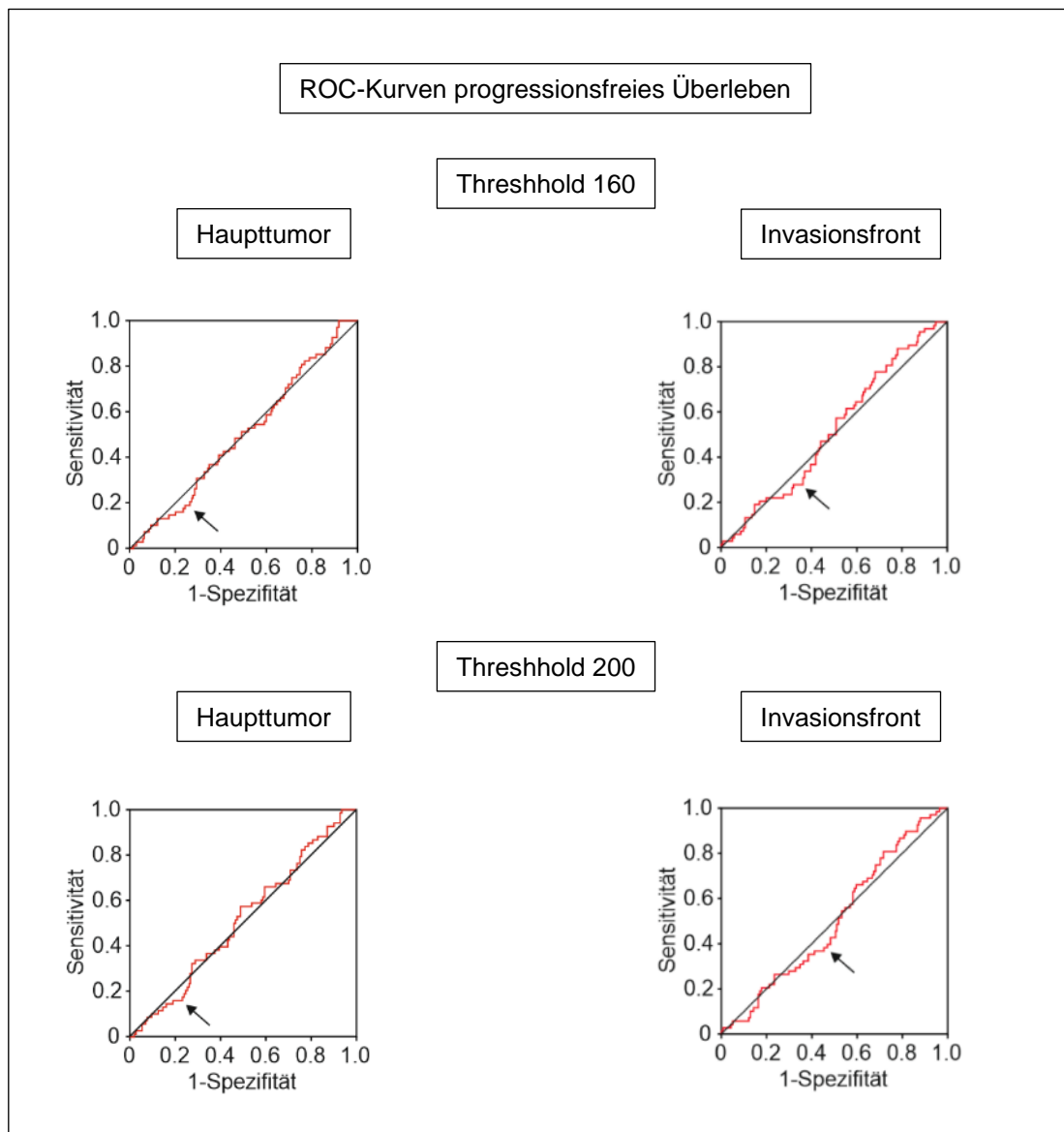


Abbildung 25: ROC-Kurvenanalyse für das progressionsfreie Überleben. Schematische Darstellung der ROC-Kurvenanalysen des progressionsfreien Überlebens im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200. Zudem Abbildung der optimalen Cut-Off-Werte (Pfeile).

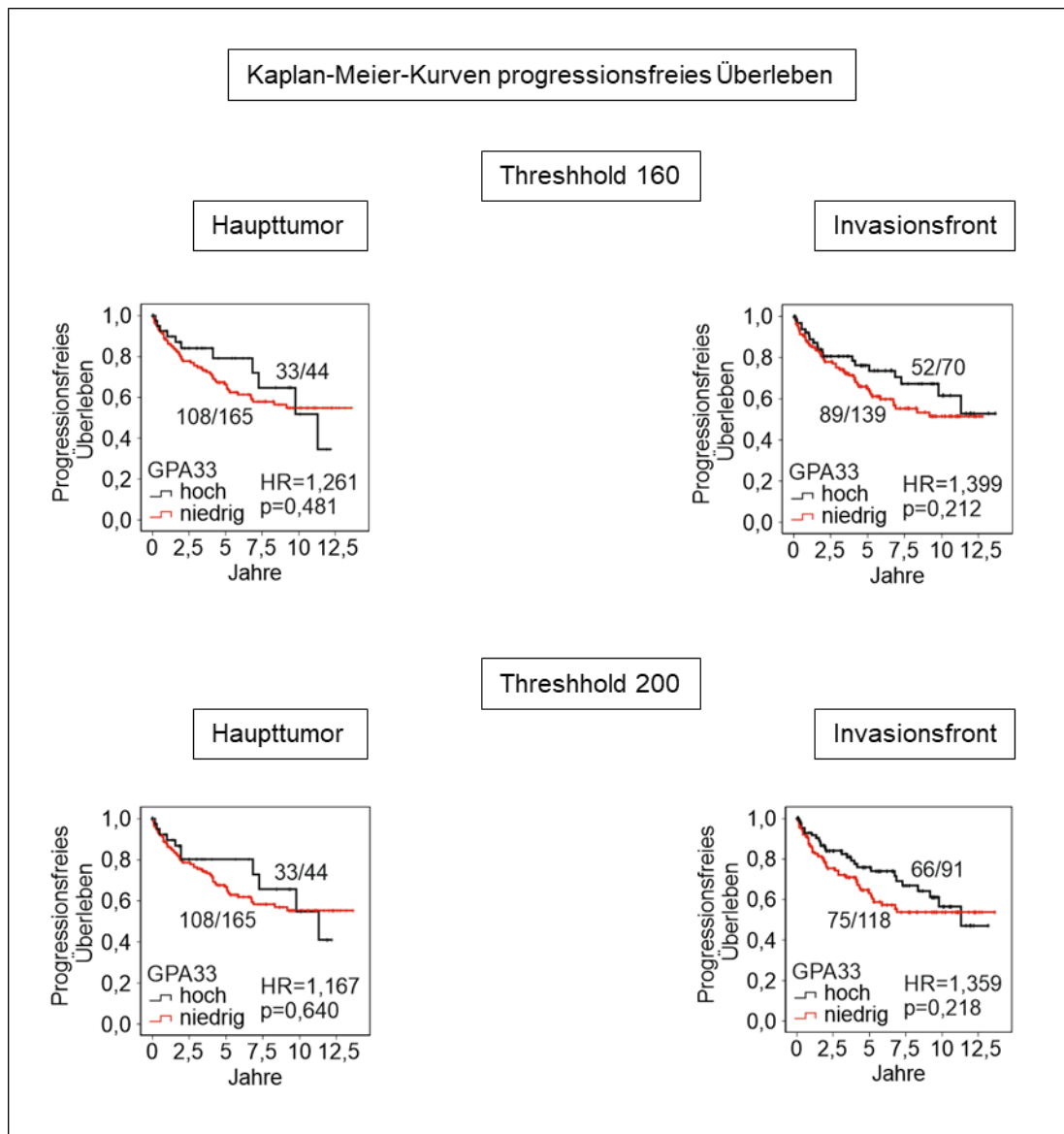


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Analyse für das progressionsfreie Überleben. Schematische Darstellung der Kaplan-Meier-Analysen des progressionsfreien Überlebens für hohe und niedrige GPA33-Expression im Haupttumor und an der Tumordinvasionsfront bei den Thresholdwerten 160 und 200 unter Nutzung der optimalen Cut-Off-Werte. Zudem Angabe der jeweiligen Hazard Ratio Werte und der p-Werte der Analysen (Signifikanzniveau 0,05).

Zur genaueren Beurteilung des Zusammenhangs der Expression von GPA33 mit dem progressionsfreien Überleben wurde im weiteren Verlauf nun noch eine multivariate Analyse zur Betrachtung des Einflusses von Drittvariablen (Alter, Geschlecht, Tumorgrad und Tumorstadium) durchgeführt. Wie auch schon beim tumorspezifischen Überleben wurden auch beim progressionsfreien Überleben die GPA33-Expressionsmesswerte mit dem p-Wert, der dem Signifikanzniveau am nächsten gekommen ist, für die multivariate Analyse hinzugezogen. Es wurden die GPA33-Expressionsmesswerte an

der Tumorinvasionsfront bei Thresholdwert 160 ausgewählt (p-Wert von 0,212). Unter Berücksichtigung eines möglichen Einflusses anderer Variablen konnte erneut keine Signifikanz der GPA33-Messergebnisse in Assoziation mit dem progressionsfreien Überleben gezeigt werden, wobei sich erwartungsgemäß eine starke Assoziation des Tumorstadiums mit dem progressionsfreien Überleben zeigte.

Tabelle 4: Multivariate Analyse des progressionsfreien Überlebens für das UICCII-Patientenkollektiv (GPA33-Messwerte der Invasionsfront bei Thresholdwert 160)

Variablen	Progressionsfreies Überleben		
	HR	(95% Konfidenzintervall)	P
Alter (< 68 / ≥ 69)	1,1	(0,65-1,72)	0,824
Geschlecht (F / M)	0,9	(0,53-1,41)	0,551
Tumorgrad (niedrig / hoch)	1,3	(0,53-3,35)	0,537
Tumorstadium (3 / 4)	2,4	(1,39-4,02)	0,002
GPA33 (niedrig / hoch)	0,8	(0,45-1,34)	0,369

6. Diskussion

6.1 Heterogene Verteilung von GPA33 in kolorektalen Karzinomen

Schon seit Mitte der 90er Jahre ist die Antigenstruktur GPA33 ein interessantes Ziel der klinischen Studien. Dennoch sind bis heute nicht seine ganzen physiologischen Funktionen und sein Einfluss auf die Entstehung und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen weitgehend geklärt und abschließend verstanden. In dieser Arbeit konnte gezeigt und bestätigt werden, dass das GPA33-Protein auch im Tumorgewebe von kolorektalen Karzinomen mit einer Antikörperfärbung sehr gut darstellbar ist. Zunächst wurde das gesamte Tumorgewebe betrachtet. Dabei konnte eine inhomogene GPA33-Anfärbung über das komplette Tumorgewebe beobachtet werden. Es wurde eine starke Färbung im Tumorzentrum wahrgenommen, die zum Tumorrand hin deutlich abnehmend erschien. Im nächsten Schritt wurden die Zellen daraufhin einzeln betrachtet. Hierbei konnte eine randständige GPA33-Anfärbung bei den Zellen mit Ausparung des Zytoplasmas und des Stromas detektiert werden, was seine Eigenschaft als Oberflächenantigen und Adhäsionsmolekül untermauert (Heath et al., 1997; Van Niel et al., 2001; Ackermann et al., 2008). Da unter Betrachtung des gesamten Tumorgewebes eine inhomogene GPA33-Anfärbung mit einer Abnahme der Färbeintensität vom Tumorzentrum zum Tumorrand besonders auffallend war, wurde weitere Aufmerksamkeit auf diese heterogene Verteilung gelegt. Aufgrund seiner hohen Spezifität und seiner hohen Sensitivität für Gewebe des Gastrointestinaltraktes aber auch für Tumore des kolorektalen Karzinoms erweckt das GPA33-Protein schon seit vielen Jahren das Interesse der wissenschaftlichen Forschung (Abud et al., 2000; Wong et al., 2006). In diesem Zusammenhang hat sich das GPA33-Antigen in der Vergangenheit als sehr zuverlässige Antikörperzielstruktur erwiesen (Infante et al., 2013). Besonders *in vitro* konnten dabei sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Aber auch *in vivo* konnte die Antigenstruktur bereits einige Erfolge im Bereich der diagnostischen und therapeutischen Verfahren erzielen. So konnte beispielsweise die gute Eignung von GPA33-Antikörpern für das PET bei kolorektalen Karzinomen, aber auch eine relative therapeutische Effizienz bei Radiochemotherapie mit radioaktivem Iod aufgezeigt werden (Barendswaard et al., 2001; Frey, 2008; Carrasquillo et al., 2011). In den meisten Arbeiten wurde dabei das GPA33-Antigen jedoch nur isoliert als sehr gute Antikörperzielstruktur mit einer hohen Spezifität und Sensitivität für kolorektale Karzinome betrachtet und kein besonderer Schwerpunkt auf die intratumorale Verteilung von GPA33

gelegt. Mit Hilfe der neuen Erkenntnisse der heterogenen Verteilung von GPA33 innerhalb des Tumors, die in dieser Arbeit gewonnen werden konnten, können neue Ansätze für die Betrachtung der GPA33-Zielstruktur entwickelt werden. Vor allem die Abnahme der GPA33-Genexpression im Bereich der Tumordinvasionsfront, verglichen mit dem Tumorzentrum, liefert Potential für die Bildung neuer Hypothesen. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Verteilung des GPA33-Proteins innerhalb des Tumors Auswirkungen auf das Wirksamkeitslevel von Antikörpern, die für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt werden, besitzt. Es wurde bereits beschrieben, dass GPA33-Antikörpertherapien nur eine relative Effizienz gezeigt haben (Barendswaard et al., 2001). Der Aspekt der heterogenen intratumoralen Verteilung von GPA33 kann hierbei als möglicher Ansatz hinzugezogen werden, weshalb Therapien unter GPA33-Nutzung teilweise nicht den Erfolg zeigen, der von ihnen erwartet wird. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die im Rahmen der Chemotherapie eingesetzten Antikörper das Tumorzentrum aufgrund der Abschirmung der äußeren Tumorzellen, die eine geringere GPA33-Expression als die Zellen im Tumorzentrum zeigen, nicht ausreichend erreichen. Auf der anderen Seite kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die Zellen, die den Tumorrandbereich besetzen und mit dem größten Tumorstammzellpotential in Verbindung gebracht werden, nicht genügend durch den Antikörper gebunden werden, wodurch nicht der volle Chemotherapie-Effekt erzielt wird und nicht alle Tumorzellen als Ziel detektiert werden können.

6.2 Bedeutung der inversen Korrelation der GPA33-Expression mit der WNT-Aktivität

Durch die heterogene Verteilung von GPA33 innerhalb des Tumors erschien es sinnvoll den Zusammenhang von GPA33 mit der WNT-Aktivität, welche innerhalb des Tumors auch einer heterogenen Verteilung unterliegt, genauer zu untersuchen. Dabei wurde unter Verwendung von Genexpressions- und WNT-Signalaktivitätsdaten eine inverse Korrelation zwischen der GPA33-Expression und der WNT-Aktivität festgestellt. Im direkten Vergleich konnte dieser Zusammenhang auch zwischen dem Genexpressionsausmaß von GPA33 und β -Catenin, dem Effektormolekül der WNT-Signalkaskade, detektiert werden, was die inverse Korrelation von GPA33 mit der WNT-Aktivität weiter festigte. Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, zeigen Tumorzellen,

die an der Tumorinvasionsfront angesiedelt sind, ein hohes Tumorstammzellpotential und gleichsam eine hohe WNT-Aktivität. Dagegen weisen Zellen im Tumorzentrum eher eine niedrige WNT-Signalaktivität auf, erscheinen dafür aber mit einem höheren Differenzierungsgrad als Zellen, die im Tumorrandbereich angesiedelt sind (Brabletz et al., 2005; Vermeulen et al., 2010; Horst et al., 2012; Cernat et al., 2014). Unter Berücksichtigung des aktuellen Wissenschaftsstandes und in Kombination mit den neuen Erkenntnissen der inversen Assoziation von GPA33 zur WNT-Aktivität kann die Vermutung auf einen Zusammenhang der GPA33-Expression mit dem Tumorstammzellpotential aufgestellt werden. Es kann die Hypothese gebildet werden, dass ein hoher GPA33-Proteinanteil mit einer niedrigen Tumorstammzelleigenschaft und einem hohen Differenzierungsgrad in Verbindung gebracht werden kann, was bei einem hohen Expressionsgrad von GPA33 für eine gute Prognose bei kolorektalen Karzinomen sprechen kann. Auf der anderen Seite kann eine niedrige GPA33-Expression mit einem niedrigen Differenzierungsgrad und dafür aber einem hohen Tumorstammzellpotential zusammenhängen, was dagegen für eine eher schlechte Prognose beim CRC sprechen kann (Kirchner und Brabletz, 2000; Cernat et al., 2014; Kahn, 2014). Die weiterführende Untersuchung der Assoziation von GPA33 mit dem Tumorstammzellpotential erscheint für die Zukunft sinnvoll zu sein, da dadurch ein noch besseres Verständnis für die Proteinwirkungsweise und den Einfluss von GPA33 auf die Malignität bei kolorektalen Tumoren gewonnen werden kann. Wie in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, konnten bisher noch nicht alle Funktionen und Eigenschaften von GPA33 trotz vieler Jahre intensiver Forschung abschließend geklärt werden (Johnstone et al., 2002; Williams et al., 2015). Auf Grund der hohen Spezifität und Sensitivität für CRCs erscheint es sinnvoll, dass das GPA33-Antigen auch in Zukunft weiterhin ein wichtiger Bestandteil der Forschung des CRCs bleibt.

6.3 Weitere Einsatzmöglichkeiten der neuen, objektivierten und softwareunterstützten Quantifizierungsmethode

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer neuen, objektivierten und softwareunterstützten Quantifizierungsmethode die Genexpression von GPA33 in kolorektalen Karzinomen gemessen. Die neue Bewertungs- und Messmethode, die in dieser Arbeit bereits aus-

föhrlich beschrieben wurde, wurde dabei im Anschluss auf ihre Genauigkeit und Gültigkeit überprüft und konnte dabei als valide und sinnvolle Methode für die Genexpressionsanalyse von GPA33 bestätigt werden. Die neue Methode wurde entwickelt, um eine Alternative zum üblicherweise eingesetzten Bewertungsverfahren, das auf einem semiquantitativen Bewertungsschema beruht, zu bieten. Das neue Quantifizierungsverfahren schafft die Möglichkeit, nach der Digitalisierung der TMAs, den interessanten Bereichen im Tumorzentrum und in der Tumorinvasionsfront im Rahmen der Farbinintensitätsmessung eine ziemlich genaue Prozentzahl der Expression bestimmter Gene zuzuordnen. Dadurch konnte eine Erweiterung des semiquantitativen Bewertungsverfahrens geboten werden. Die Messung wird in diesem Zusammenhang nicht nur objektiver gestaltet, sondern es wird auch ein genaueres Ergebnis angeboten, das die Option für weitere statistische Anwendungen wie beispielsweise eine exakte Cut-Off-Bestimmung für die Kohorteneinteilung ermöglicht. Dies führt dazu, dass die Patienten statistisch genauer in Gruppen eingeteilt werden können. Der Einsatz von Immunhistochemie bei TMAs mit anschließender Digitalisierung und Bewertung bietet seit einigen Jahren eine neue interessante Möglichkeit kostengünstig und schnell eine große Anzahl an Gewebeproben standardisiert zu analysieren. Rossing et al. führte 2012 unter Nutzung von TMAs eine Expressionsmarkeruntersuchung bei Lungentumoren durch. Dabei wurden ergänzend die Vorteile der TMA-Nutzung dargestellt. Es wurde neben dem wirtschaftlichen Nutzen, der Standardisierung von Tumorprofilen und der wachsenden Zuverlässigkeit bei der Interpretation, auch eine Dokumentationsoptimierung verzeichnet (Rossing et al., 2012). Szentkuti et al. untersuchte im Jahr 2015 mit Hilfe von TMAs und digitalisierten Schnitten den Zusammenhang von Biomarkern mit der Prognose bei Kopf- und Halstumoren (HNSCC). Dabei wurden vor allem die Marker Ki67 und p16(ink4) in Bezug auf das Überleben bei Hypopharynxkarzinomen, die mit einer eher ungünstigen Prognose assoziiert sind und Glottis-Tumoren, die mit einer eher günstigen Prognose in Verbindung gebracht werden, untersucht. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Ki67-Expression mit einem schlechten Outcome, hingegen eine niedrige Ki67-Expression mit einem guten Outcome assoziiert ist. Außerdem wurde eine hohe p16(ink4)-Proteinbildung mit einem längeren Überleben als eine niedrige p16(ink4)-Proteinbildung bewertet. Des Weiteren wurde in der Studie aufgezeigt, dass der Einsatz von digitalisierten TMAs mit Immunhistochemie für die Bewertung von Biomarkern in Verbindung mit einer Prognoseeinordnung durchaus geeignet ist. Allerdings wurde in diesem Fall die Bewertung der digitalisierten Bilder

nicht mit Unterstützung einer Software durchgeführt, sondern durch eine subjektive Beurteilung (Szentikuti et al., 2015). Die Einführung weiterer Softwarenutzung wird auch in Zukunft im medizinischen Bereich voranschreiten und ein wichtiges Thema bleiben. Die Vorteile der Nutzung von Digitalisierungsschritten und des technischen Fortschrittes ist nicht zu leugnen und wird die bestehende Skepsis, die durchaus noch in einigen Bereichen der Medizin zu spüren ist, in Zukunft weiter vermindern. Dabei wird es wichtig sein, dass auch im medizinischen Bereich die Zahl der Spezialisten für den Bereich der Digitalisierung weiter steigt und die Kompetenzen in diesem Bereich fortschreitend ausgebaut werden (Kontilla et al., 2018). Die neu entwickelte, objektivierte und softwareunterstützte Quantifizierungsmethode dieser Arbeit zeigt, wie der technische Fortschritt in Kombination mit den vorhandenen Techniken der Medizin zu einer Verbesserung führen kann und dadurch die Ergebnisse genauer, einheitlicher und objektiver dargestellt werden können. Die neue Methode ist nicht mehr so stark von der subjektiven Beurteilung der Intensität abhängig, sondern kann sogar relativ genau zwischen sehr ähnlichen Marker-Ausprägungen differenzieren. Die Übertragbarkeit der Kombination der einzelnen Verfahrensschritte dieser Methode auf die Messung von anderen Proteinen bzw. Biomarkern in Tumoren erscheint durchaus sinnvoll. Letztendlich besteht die Möglichkeit, jedes immunhistochemisch aufgearbeitete TMA-Kollektiv durch Anwendung des Grundkonzeptes der dargestellten Schrittreihenfolge zu analysieren und zu bewerten.

6.4 Bedingte Eignung von GPA33 als prognostischer Biomarker

Im abschließenden Kapitel dieses Diskussionsteils soll nun noch einmal auf GPA33 als prognostischen Biomarker eingegangen werden. In vielen Arbeiten wurde sich bisher hauptsächlich der Analyse von Biomarkern gewidmet, die mit einer negativen Prognose bei Tumorerkrankungen in Verbindung stehen. So wurde beispielsweise CD133 als Faktor, der mit einem schlechten Outcome bei Gallenblasen- und Gallengangstumoren assoziiert wird, genauer untersucht. Die immunhistochemische Analyse konnte CD133 als unabhängigen prognostischen Faktor bestätigen, der bei hoher Expression als Marker für eine schlechte Überlebensprognose gewertet werden kann und vor allem mit der histologischen Differenzierung und der Tumorprogression korreliert (Mizukami et al., 2018). Des Weiteren können die Marker CD44 und Lgr5 erwähnt

werden, die vor allem bei kolorektalen Karzinomen eine besondere Rolle spielen. Bei den Biomarkern konnte ebenfalls eine Assoziation mit der histologischen Differenzierung, dem Ausmaß der Tumordinfiltrationstiefe und der Lymphknoten- und Lebermetastasenbildung nachgewiesen werden. Eine hohe Expression von CD44 und Lgr5 steht dabei mit einer schlechten Prognose in Verbindung, da sie ein malignes biologisches Verhalten, wie die Förderung der Bildung von lokalen und distalen Lymphknoten- und Lebermetastasen bei kolorektalen Karzinomen, bewirkt (Wang et al., 2018). Biomarker, die potentiell mit einer schlechten Prognose in Verbindung stehen, scheinen sich grundsätzlich gut als Prognosemarker zu eignen (Mizukami et al., 2018; Wang et al., 2018). Da Markern, die mit einer guten Prognose möglicherweise in Verbindung stehen können, in der aktuellen Forschung bisher noch nicht so viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde, erscheint es sinnvoll, auch diese Proteine und ihre Gene zu untersuchen. GPA33 und sein gleichnamiges Expressionsprodukt stellt eines dieser Proteine dar, die potentiell mit einer guten Prognose bei Expression in Verbindung stehen können. Mit Hilfe der neu entwickelten Messmethode wurde die Expression von GPA33 in dieser Arbeit untersucht und statistisch mittels ROC-Kurvenanalyse, Youden-Index und Kaplan-Meier-Methode auf seine Eignung als Prognosemarker für das Outcome bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen beurteilt. Dabei konnte nur bedingt eine Eignung von GPA33 als Prognosemarker gezeigt werden. Einzelne p-Werte offenbarten Tendenzen in Richtung des Signifikanzniveaus, konnten dieses aber nicht unterschreiten. Grundsätzlich konnte eine Neigung der hohen GPA33-Expressionswerte zu einem längeren tumorspezifischen und progressionsfreien Überleben erkannt werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht abschließend statistisch untermauert werden. Mögliche Ursachen dafür sind, dass eine separate Betrachtung von GPA33 nicht ausreichend für die Outcome-Bewertung bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen ist und, dass gegebenenfalls weitere Einflussfaktoren, die auf die GPA33-Genexpression wirken, berücksichtigt werden müssen. Die heterogene Verteilung von GPA33 innerhalb des Tumors mit Abfall der Genexpression vom Tumorzentrum zur Tumordinvasionsfront wurde in dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt. GPA33 kann auch auf Grund seiner intratumoralen Verteilung als Differenzierungsmarker bewertet werden. Zellen mit einer hohen Differenzierung weisen ein niedriges Tumorstammzellpotential auf und sind hauptsächlich im Tumorzentrum zu finden. Wohingegen Zellen mit einem geringen Differenzierungsgrad und einer hohen Tumorstammzelleigenschaft im Tumorrandbereich zu finden sind (Kirchner und Brabletz, 2000; Cernat et al., 2014; Kahn,

2014). Im Vergleich zu den Biomarkern CD133, CD44 und Lgr5, konnte GPA33 nur eingeschränkt Eigenschaften eines Prognosemarkers zeigen. Der Unterschied zu den anderen Markern ist neben der Eigenschaft als Differenzierungsprotein auch das Tumorstammzellpotential und damit verbunden die Progressions- und Invasionsneigung. Auf Grund seines intratumoralen Verteilungsmusters wird der GPA33-Expression hierbei ein niedrigeres Tumorstammzellpotential zugeordnet (Vermeulen et al., 2010; Horst et al., 2012; Cernat et al., 2014). Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Biomarker, die vermehrt in randständigen Tumorzellen exprimiert werden und mit einem hohen Tumorstammzellpotential assoziiert sind, sich eher für den Einsatz als Prognosemarker bei Tumorerkrankungen eignen. Für ein abschließendes Urteil bedarf es weiterer Untersuchungen von Biomarkern, die ebenfalls ein niedriges Tumorstammzellpotential aufweisen.

7. Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome gehören nicht nur zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit, sondern stellen auch global gesehen eine der häufigsten Krebstodesursachen dar. Auch aus diesem Grund nehmen sie einen hohen Stellenwert in der Wissenschaft der Krebsdiagnostik und Krebstherapie ein. In der aktuellen Forschung wird ein großer Schwerpunkt häufig auf Gene mit einer schlechten Outcome-Prognose gelegt. In dieser Arbeit wurde die Expression von GPA33, einem Gen, das mit einer guten Prognose bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen potentiell in Verbindung stehen könnte, genauer untersucht.

Zunächst wurde durch den Einsatz von Immunhistochemie eine intratumorale Verteilungscharakterisierung von GPA33 bei kolorektalen Karzinomen durchgeführt. Dabei konnte ein heterogenes Verteilungsmuster von GPA33 festgestellt werden. Im Tumorzentrum wurde in diesem Zusammenhang eine höhere Genexpression als im Tumorrandbereich festgestellt. Insgesamt konnte entlang des Differenzierungsgradienten ein Gefälle vom Tumorzentrum zur Tumordinvasionsfront gezeigt werden.

Unter Berücksichtigung der neusten Erkenntnisse des Plastizitätsmodells der Tumorstammzellaktivität wurde anschließend der Zusammenhang von GPA33 mit der WNT-Aktivität, welche mit dem Tumorstammzellpotential in Verbindung gebracht wird, untersucht. Hierbei konnte unter Verwendung von Genexpressions- und WNT-Aktivitäts-Daten statistisch eine inverse Korrelation zwischen der GPA33-Expression und der WNT-Aktivität festgestellt werden. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde daraufhin ein Vergleich der Expression von GPA33 und β -Catenin, dem Effektormolekül der WNT-Signalkaskade, durchgeführt. Hierzu wurden korrespondierende TMA-Schnitte mit GPA33- und β -Catenin-Färbung direkt miteinander verglichen. Dabei konnte ebenfalls eine inverse Korrelation nachgewiesen werden, was die Ergebnisse des Zusammenhangs zwischen der GPA33-Expression und der WNT-Aktivität nochmals bestätigen konnte.

Im nächsten Schritt wurde die GPA33-Expression innerhalb des Tumors wieder intensiver betrachtet und bewertet. Dabei kam eine neue, objektivierte und softwareunterstützte Quantifizierungsmethode zum Einsatz, welche nach Abschluss der Messung validiert wurde. Zunächst wurde ein immunhistochemisch bearbeitetes TMA-Patientenkollektiv von UICCII-Patienten durch Nutzung eines Gewebescanners digitalisiert.

Im Anschluss daran konnten von den entstandenen Bildern hochauflösende Screenshots der Regions of Interest mit Hilfe der Scansoftware gemacht werden. Für jeden Patienten wurden in diesem Schritt mehrere Bilder aus Bereichen des Haupttumors und der Tumordinvasionsfront zur weiteren Beurteilung gesammelt. Daraufhin wurden die Bilder des Haupttumor- und Tumordinvasionsfrontbereichs unter Einsatz der Analysesoftware Fiji weiterführend bearbeitet und bewertet. Über Schwellenmessungen in den beiden unterschiedlichen Bereichen des Tumorgewebes konnten für jeden Patienten mehrere Werte des Haupttumors und der Tumordinvasionsfront gewonnen werden. Mit Hilfe dieser Werte konnte daraufhin die Messmethode auf ihre Genauigkeit und Gültigkeit untersucht werden. Unter Verwendung mehrerer Validierungsschritte wurde die Tauglichkeit dieser neuen, objektivierten und softwareunterstützten Quantifizierungsmethode bestätigt.

In der abschließenden Versuchsreihe wurde nun noch die Eignung von GPA33 als Prognosemarker bei kolorektalen Karzinomen überprüft. Dabei wurde zunächst eine statistische Analyse an dem öffentlich zugänglichen TCGA-Kollektiv mit 457 Patienten durchgeführt und eine Assoziation der GPA33-Expression mit der Überlebensprognose bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen detektiert, was auf eine Eignung von GPA33 als Prognosemarker schließen lässt. Im folgenden Schritt wurde mit Hilfe der gewonnenen Daten vom UICCII-Patientenkollektiv versucht, dieses Ergebnis zu validieren. Dazu wurde unter Nutzung der ROC-Kurvenanalyse, des Youden-Indexes und der Kaplan-Meier-Bewertung herausgefunden, dass GPA33 sich scheinbar nur bedingt als Prognosemarker für die Einschätzung des tumorspezifischen und progressionsfreien Überlebens nutzen lässt.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit das heterogene intratumorale Expressionsmuster von GPA33 mit einer hohen Genexpression im Tumorzentrum und einer abnehmenden Expression im Tumorrand gezeigt werden. Außerdem konnte nicht nur die inverse Korrelation von GPA33 mit der WNT-Aktivität dargestellt, sondern auch eine neue, objektivierte und softwareunterstützte Quantifizierungsmethode entwickelt, angewendet und validiert werden. Die Eignung der intratumoralen GPA33-Expression als Prognosemarker für das Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte dagegen nur bedingt bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO Journal*, 16(13), S. 3797-3804.
- Abud, H., Johnstone, C., Tebbutt, N., Heath, J. (2000). The murine A33 antigen is expressed at two distinct sites during development, the ICM of the blastocyst and the intestinal epithelium. *Mechanisms of Development*, 98, S. 111-114.
- Ackerman, ME., Chalouni, C., Schmidt, MM., Raman, VV., Ritter, G., Old, LJ., Mellman, I., Wittrup, KD. (2008). A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 57(7), S. 1017-1027.
- Angers, S., Moon, RT. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), S. 468-477.
- Balhareth, A., Aldossary MY., McNamara, D. (2019). Impact of physical activity and diet on colorectal cancer survivors quality of life: a systematic review. *World Journal of Surgical Oncology* 17, 153, S. 1-12.
- Ballester, V., Rashtak, S., Boardman, L. (2016). Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(5), S. 1736-1744.
- Baptistella, AR., Salles Dias, MV., Aguiar Junior, S., Begnami, MD., Martins, VR. (2016). Heterogeneous expression of A33 in colorectal cancer: Possible explanation for A33 antibody treatment failure. *European Journal of Cancer*, 51, S. 45.
- Barendswaard, EC., Humm, JL., O'Donoghue, JA., Sgouros, G., Finn, RD., Scott, AM., Larson, SM., Welt, S. (2001). Relative therapeutic efficacy of 125I- and 131I-labeled monoclonal antibody A33 in a human colon cancer xenograft. *Journal of Nuclear Medicine*, v42(8), S. 1251-1256.
- Berry, E., Miller, S., Koch, M., Balasubramanian, B., Argenbright, K., Gupta, S. (2019). Lower Abnormal Fecal Immunochemical Test Cut-Off Values Improve Detection of Colorectal Cancer in System-Level-Screens. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Epub 2019 May 11, S. 1-7.
- Binefa, G., Rodriguez-Moranta, F., Teule, A., Medina-Hayas, M. (2014). Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20(22), S. 6786-6808.

- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*, 179(1-2), S. 56-65.
- Broad Institut. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://software.broadinstitute.org/GENE-E/> abgerufen
- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H., Sauter, G. (2001). Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The Journal of Pathology*, 195(1), S. 72-79.
- Buchert, M., Rohde, F., Eissmann, M., Tebbutt, N., Williams, B., Tan, CW., Owen, A., Hirokawa, Y., Gnann, A., Orend, G., Orner, G., Dashwood, RH., Heath, JK., Ernst, M., Janssen, KP. (November 2015). A hypermorphic epithelial Beta-catenin mutation facilitates intestinal tumorigenesis in mice in response to compounding WNT-pathway mutations. *Disease Models and Mechanisms*, 8(11), S. 1361-1373.
- Burger, W., Burge, MJ. (2015). *Digitale Bildverarbeitung: Eine algorithmische Einführung mit Java (Bd. 3. Auflage)*. Wiesbaden: Springer Verlag, ISBN: 978-3-642-04604-9, S. 25-40.
- Cabrera, MC., Hollingsworth, RE., Hurt, EM. (2015). Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), S. 27-36.
- Cancer Genome Atlas. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://cancergenome.nih.gov/> abgerufen
- Carrasquillo, JA., Pandit-Taskar, N., O'Donoghue, JA., Jumm, JL., Zanzonico, P., Smith-Jones, PM., Divgi, CR. (2011). 123I-huA33 Antibody PET of Colorectal Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(8), S. 1173-1180.
- Cellsignal. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-stem-cell-markers/wnt-catenin-signaling-interactive-pathway/pathways-wnt> abgerufen
- Cernat, L., Blaj, C., Jackstadt, R., Brandl, L., Engel, J., Hermeking, H., Jung, A., Kirchner, T., Horst, D. (2014). Colorectal cancers mimic structural organization of normal colonic crypts. *PLoS One*, 9(8):e104284.
- Clevers, H., Nusse, R. (2012). Wnt/Beta-Catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), S. 1192-205.
- Corley, DA., Levin, TR. (2014). Adenoma Detection Rate and Risk of Colorectal Cancer and Death. *The New England Journal of Medicine*, 370(14), S. 1298-1306.

- Daghighian, F., Barendswaard, E., Welt, S., Humm, J., Scott, A., Willingham, MC., McGuffie, E., Old, LJ., Larson, SM. (1996). Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labeled A33 monoclonal antibody. *Journal of Nuclear Medicine*, 37(6), S. 1052-1057.
- Deckers, CO. (1991). The TNM classification adapted to palliative care. *Bulletin du Cancer*, 78(9), S. 769-773.
- Demeyer, D., Honikel, K., De Smet, S. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. *Meat Science*, 80(4), S. 953-959.
- Dick, GJ. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), S. 4793-4807.
- Dick, GJ., Andersson, AF., Baker, BJ., Simmons, SL., Thomas, BC., Yelton, AP., Banfield, JF. (2009). Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. *Genome Biology*, Epub 2009 Aug 21, S. 1-16.
- Dreesen, O., Brivanlou, AH. (2007). Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 3(1), S. 7-17.
- Fearon, ER., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), S. 759-767.
- Fiji. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://fiji.sc> abgerufen
- Frey, D., Coelho, V., Petrusch, U., Schaefer, M., Keilholz, U. Thiel, E., Deckert, PM. (2008). Surface expression of gpA33 is dependent on culture density and cell-cycle phase and is regulated by intracellular traffic rather than gene transcription. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 23(1), S. 65-73.
- Friedl, P., Alexander, S. (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 147(5), S. 992-1009.
- Gandon, Y. (2014). Screening for colorectal cancer: The role of CT colonography. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*, 95(5), S. 469-476.
- GEO. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> abgerufen
- Gerdes, MJ., Sood, A., Sevinsky, C., Pris, AD., Zavodszky, MI., Ginty, F. (2014). Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Frontiers in Oncology*, Epub 2014 Dec 18, S. 1-13.
- Geyer, FC., Lacroix-Triki, M., Savage, K., Arnedos, M., Lambros, MB., MacKay, A., Natrajan, R., Reis-Filho, JS. (2011). Beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern Pathology*, 24(2), S. 209-231.

- Giovannucci, E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(4), S. 925-943.
- Goel, MK., Khanna, P., Kishore, J. (2010). Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(4), S. 274-278.
- Grunewald, TG., Bernard, V., Gilardi-Hebenstreit, Raynal, V., Surdez, D., Aynaud, MM., Mirabeau, O., Cidre-Aranaz, F., Tirode, F., Zaidi, S., Perot, G., Jonker, AH., Lucchesi, C., Le Deley, MC., Oberlin, O., Marec-Berard, P., Veron, AS., et al. (2015). Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nature Genetics*, 47, S. 1073-1078.
- Hall, N., Birt, L., Banks, J., Emery, J., Mills, K., Johnson, M., Rubin, GP., Hamilton, W., Walter, FM. (2015). Symptom appraisal and healthcare-seeking for symptoms suggestive of colorectal cancer: a qualitative study. *BMJ Open*, Epub 2015 Oct 9, S. 1-10.
- Hanahan, D., Weinberg, RA. (2000). Hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), S. 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), S. 646-674.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/Beta-Catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8), S. 1663-1677.
- Heath, J., White, S., Johnstone, C. (1997). The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), S. 469-474.
- Hidalgo, B., Goodman, M. (2013). Multivariate or Multivariable Regression? *American Journal of Public Health*, 103(1), S. 39-40
- Horst, D. (2013). Plastizität der WNT-Signalwegaktivität im Kolonkarzinom. *Der Pathologe*, 33(2), S. 194-197
- Horst, D., Chen, J., Morikawa, T., Ogino, S., Kirchner, T., Shivdasani RA. (2012). Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Research*, 72(6), S. 1547-1556.
- Human Protein Atlas. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://www.proteinatlas.org/pathology> abgerufen
- Hurrelmann, K., Klotz, T., Haisch, J. (2014). *Prävention und Gesundheitsförderung* (Bde. 4., vollständig überarbeitete Auflage). *Göttingen: Verlag Hans Huber, ISBN: 978-3-456-84070-5*, S. 117.

- Infante, JR., Bendell, JC., Goff, LW., Jones, SF., Chan, E., Sudo, T., Burris, HA., Berlin, JD. (2013). Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-A33 fully-human monoclonal antibody, KRN330, in patients with advanced colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 49(6), S. 1169-1175.
- Javarsiani, MH., Javanmard, SH., Colonna, F. (2019). Metastatic components in colorectal cancer. *Journal of Research in Medical Sciences*, 24, S. 75-81.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, MJ. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 59(4), S. 225-249.
- Johnstone, C., Tebbutt, N., Abud, HE. (2000). Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(3), S. 500-510.
- Johnstone, C., White, SJ., Tebbutt, NC. (2002). Analysis of the Regulation of the A33 Antigen Gene Reveals Intestine-specific Mechanisms of Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), S. 34531-34539.
- Kaalby, L., Rasmussen, M., Zimmermann-Nielsen, E., Buijs, MM., Baatrup, G. (2019). Time to colonoscopy, cancer probability, and precursor lesions in the Danish colorectal cancer screening program. *Clinical Epidemiology*, 11, S. 659-667.
- Kahn, M. (2014). Can we safely target the WNT pathway? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), S. 513-532.
- Kampf, C., Olsson, I., Ryberg, U., Sjöstedt, E., Ponten, F. (2012). Production of Tissue Microarrays, Immunohistochemistry Staining and Digitalization Within the Human Protein Atlas. *Journal of Visualized Experiments*, Epub 2012 May 31, S. 1-8.
- Kanth, P., Grimmatt, J., Champine, M., Burt, Samadder, NJ. (2017). Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *The American Journal of Gastroenterology*, 112(10), S. 1509-1525.
- Kasper, D., Braunwald, E., Hauser, S., Longo, D., Jameson, JL., Fauci, AS. (2005). *Harrison's principles of internal medicine*. New York City: Verlag McGraw - Hill Professional, ISBN: 978-0071402354, S. 746-751.
- Kirchner, T., Brabletz, T. (2000). Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *The American Journal of Pathology*, 157(4), S. 1113-1121.

- Konttila, J., Siira, H., Kyngäs, H., Lahtinen, M., Elo, S., Kääräinen, M., Kaakinen, P., Oikarinen, A., Yamakawa, M., Fukui, S., Utsumi, M., Higami, Y., Higuchi, A., Mikkonen, K. (2018). Healthcare professionals' competence in digitalization: a systematic review. *Journal of Clinical Nursing*, 28(5-6), S. 745-761.
- Kreso, A., Dick, J.E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14(3), S. 275-291.
- Lalosevic, M.S., Stankovic, S., Stojkovic, M., Markovic, V., Dimitrijevic, I., Lalosevic, J., Petrovic, J., Brankovic, M., Markovic, A.P., Krivokapic, Z. (2017). Can preoperative CEA and CA19-9 serum concentrations suggest metastatic disease in colorectal cancer patients. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 20(1), S. 41-45.
- Lech, G., Slotwinski, R., Slodkowski, M., Krasnodebski, I.W. (2016). Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology*, 22(5), S. 1745-1755.
- Lee, J.I., Taek, S. (2009). Liver Metastases in Colorectal Cancer. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, 25(1), S. 63-72.
- Li, Y., Wang, S., Gao, S., Yang, C., Yang, W., Guo, S. (2015). Laparoscopic colorectal resection versus open colorectal resection in octogenarians: a systematic review and meta-analysis of safety and efficacy. *Techniques in Coloproctology*, 20(3), S. 153-162.
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, S. 781-810.
- Lung, M.S., Trainer, A.H., Campbell, I., Lipton, L. (2015). Familial colorectal cancer. *Internal Medicine Journal*, Epub 2015 May 8, S. 482-491.
- Ma, H., Brosens, L.A.A., Offerhaus, G.J.A., Giardiello, F.M., Leng, W.W.J., Montgomery, E.A. (2017). Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*, 50(1), S. 49-59.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. (2009). Wnt/Beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), S. 9-26.
- Mainenti, P.P., Stanzione, A., Guarino, S., Romeo, V., Uggas, L., Romano, F., Storto, G., Maurea, S., Brunetti, A. (2019). Colorectal cancer: Parametric evaluation of morphological, functional and molecular tomographic imaging. *World Journal of Gastroenterology*, 25(35), S. 5233-5256.
- Meacham, C.E., Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), S. 328-337.
- Michor, F., Polyak, K. (2010). The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 3(11), S. 1361-1364.

- Miller, J. (2002). The Wnts. *Genome Biology*, 3(1), Epub 2001 Dec 28, S. 1-15.
- Mizukami, T., Kamachi, H., Mitsunashi, T., Einama, T., Hatanaka, Y., Kamiyama, T., Taketomi, A. (2018). Cytoplasmic CD133 expression correlates with histologic differentiation and is a significant prognostic factor in extrahepatic bile duct cancer and gallbladder cancer. *Oncology Letters*, Epub 2018 Sep 25, S. 6423-6430.
- Moch, H., Kononen, J., Kallioniemi, O., Sauter, G. (2001). Tissue Microarrays: What Will They Bring to Molecular and Anatomic Pathology? *Advances in Anatomic Pathology*, 8(1), S. 14-20.
- Moore, PA., Shah, K., Yang, Y., Alderson, R., Roberts, P., Long, V., Liu, D., Li, JC., Burke, S., Ciccarone, V., Li, Hua, Fieger, CB., Hooley, J., Easton, A., Licea, M., Gorlatov, S., King, KL., Young, P., Adami, A., Loo, D., et al. (2018). Development of MGD007, a gpA33 x CD3 bispecific DART protein for T-cell immunotherapy of metastatic colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(8), S. 1762-1772.
- Nanozoomer. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://nanozoomer.hamamatsu.com/jp/en/product/search/C13140-01/index.html> abgerufen
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), S. 767-779.
- Nusse, R., Varmus, HE. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), S. 99-109.
- Plaks, V., Kong, N., Werb, Z. (2015). The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*, 16(3), S. 225-238.
- Primrose, JN., Perera, R., Gray, A., Rose, P., Fuller, A., Corkhill, A., George, S., Mant, D. (2014). Effect of 3 to 5 Years of Scheduled CEA and CT Follow-up to Detect Recurrence of Colorectal Cancer. *JAMA*, 311(3), S. 263-270.
- Priolli, DG., Martinez, CA., Piovesan, H., Cardinalli, IA., Margarido, NF., Waisberg, J. (2010). Morphofunctional malignancy grading is a valuable prognostic factor for colorectal cancer. *The Journal Arquivos de Gastroenterologia*, 47(3), S. 225-232.
- Rageul, J., Mottier, S., Jarry, A., Shah, Y., Theoleyre, S., Masson, D., Gonzalez, FJ., Laboisie, CL., Denis, MG. (2009). KLF4-dependent, PPAPy-induced expression of GPA33 in colon cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 125(12), S. 2802-2809.

- Rijsewijk, F., Schuemann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., Nusse, R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4), S. 649-57.
- Roche. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gewebediagnostik/ventana-benchmark-xt.html#Merkmale> abgerufen
- Rossing, HH., Talman, ML., Laenkholm, AV., Wielenga, VT. (2012). Implementation of TMA and digitalization in routine diagnostics of breast pathology. *APMIS*, 120(4), S. 341-347.
- S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. (Stand: 01.06.2021). Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Version 2.1, 2019, AWMF-Registernummer: 021/007OL, gültig bis 29.11.2022
- Sahay, D., Leblanc, R., Grunewald, TG., Ambatipudi, S., Ribeiro, J., Clezardin, P., Peyruchaud, O. (2015). The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer. *Oncotarget*, 6, S. 20604-20620.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, ML., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), S. 1-26.
- Schirripa, M., Lenz, HJ. (2016). Biomarker in Colorectal Cancer. *The Cancer Journal*, 22(3), S. 156-164.
- Siegenthaler, W., Blum, HE. (2006). *Klinische Pathophysiologie (Bde. 9., völlig neu bearbeitete Auflage). Wemding: Georg Thieme Verlag KG, ISBN: 978-3-13-449609-3*, S.1102-1103.
- Skarkova, V., Kralova, V., Vitovcova, B., Rudolf, E. (2019). Selected Aspects of Chemoresistance Mechanisms in Colorectal Carcinoma - A Focus on Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Auophagy and Apoptosis. *Cells*, 8(3), *Epub 2019 March 8*, S. 1-17.
- Sohal, A., Salh, B., Yoshida, EM. (2002). Digital rectal self-examination in the diagnosis of colorectal cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 35(3), S. 288-294.
- Song, M., Garrett, WS., Chan, AT. (2015). Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention. *Gastroenterology*, 148(6), S. 1244-1260.
- Spruance, SL., Reid, JE., Samore, M. (2004). Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8), S. 2787-2792.
- Staal, FJ., Clevers, HC. (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nature Reviews Immunology*, 5(1), S. 21-30.

- Statista. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <https://de.statista.com/statistik/lexikon/definition/122/signifikanz/> abgerufen
- Strul, H., Arber, N. (2002). Fecal occult blood test for colorectal cancer screening. *Annals of Oncology*, 13(1), S. 51-56.
- Szentikuti, G., Danos, K., Brauswetter, D., Kiszner, G., Krenacs, T., Csako, L., Repassy, G., Tamas, L. (2015). Correlations between prognosis and regional biomarker profile in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology and Oncology Research*, 21(3), S. 643-650.
- Torre, LA., Bray, F., Siegel, RL., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), S. 87-108.
- Van Amerongen, R., Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), S. 3205-3214.
- Van Amerongen, R. (2012). Alternative Wnt Pathways and Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012, 4, a007914, 1-18.
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, 121(2), S. 337-349.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., Lopez-Exposito, I., Kleiveland, C., Tor, L., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health - In Vitro and Ex Vivo Models*. Cham (CH): Springer Verlag, ISBN: 978-3-319-15791-7, S. 103-112.
- Vermeulen, L., De Sousa, EM., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, JH., Borovski, T., Tuynman, JB., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., Sprick, MR., Kemper, K., Richel, DJ., Stassi, G., Medema, JP. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, 12(5), S. 468-476.
- Vexler, A., Schistermann EF., Liu, A. (2008). Estimation of ROC curves based on stably distributed biomarkers subject to measurement error and pooling mixtures. *Statistics in Medicine*, 27(2), S. 280-296.
- Wang, XF., Zhang, XL., Xu, LP., Shi, GG., Zheng, HY., Sun, BC. (2018). Expression of stem cell markers CD44 and Lgr5 in colorectal cancer and its relationship with lymph node and liver metastasis. *Zhonghua Yixuehui Zazhishe*, 98(36), S. 2899-2904.

- Williams, BB., Tebbutt, NC., Buchert, M., Putoczki, TL., Doggett, K., Bao, S., Johnstone, CN., Masson, F., Hollande, F., Burgess, AW., Scott, AM., Ernst, M., Heath, JK. (2015). Glycoprotein A33 deficiency: a new model of impaired intestinal epithelial barrier function and inflammatory disease. *Disease Models and Mechanisms*, 8(8), S. 805-815.
- Wolf, AM., Fontham, ET., Church, TR., Flowers, CR., Guerra, CE., LaMonte, SJ., Etzioni, R., McKenna, MT., Oeffinger, KC. Shih, YT., Walter, LC., Andrews, KS., Brawley, OW., Brooks, D., Fedewa, SA., Manassaram-Baptiste, D., Siegel, RL., Smith, RA. (2018). Colorectal Cancer Screening for Average-Risk Adults: 2018 Guideline Update From the American Cancer Society. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 68(4), S. 250-281.
- Wong, NA., Adamczyk, LA., Evans, S., Cullen, J., Oniscu, A., Oien, KA. (2017). A33 shows similar sensitivity to but is more specific than CDX2 as an immunomarker of colorectal carcinoma. *Histopathology*, 71(1), S. 34-41.
- Wong, NA., Warren, BF., Piris, J., Maynard, N., Marshall, R., Bodmer, WF. (2006). EpCAM and gpA33 are markers of Barrett's metaplasia. *Journal of Clinical Pathology*, 59(3), S. 260-263.
- World Health Organisation. (Stand: 23.02.2020). Onlinedatenbank. Von <http://www.who.int/cancer/en/> abgerufen
- Wu, Z., Guo, HF., Xu, H., Cheung, NV. (2018). Development of a Tetravalent Anti-GPA33/Anti-CD3 Bispecific Antibody for Colorectal Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(10), S. 2164-2175.
- Yang, C., Wang, X., Huang, C., Yuan, W., Chen, Z. (2016). Passive Smoking and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of Observational Studies. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 28(5), S. 394-403.
- Zwiener, I., Blettner, M., Hommel, G. (2011). Survival Analysis. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(10), S. 163-169.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben, bedanken.

Ein besonderer Dank geht hierbei an Herr Prof. Dr. med. David Horst, der mir die Chance gegeben hat, an diesem interessanten Projekt zu arbeiten und mir während meiner gesamten Doktorarbeit nicht nur als Doktorvater, sondern auch als direkter Betreuer zur Seite gestanden hat. Ich danke Herr Prof. Dr. med. David Horst außerdem für die Bereitstellung der Datensätze und der TMA-Präparate, sowie die hilfreichen Ratschläge für die statistische Auswertung und die Diskussion meiner Ergebnisse.

Des Weiteren möchte ich Frau Annegret Schäfer und dem Team der Immunhistochemie Großhadern für die Durchführung der immunhistochemischen Anfärbung der TMAs mit dem GPA33-Antikörper danken.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Jutta Engel für die Bereitstellung der Tumorregisterdaten.

Zudem möchte ich Herr Prof. Dr. med. Thomas Kirchner als Direktor des Pathologischen Instituts der LMU München für die Möglichkeit der Nutzung der Einrichtung des Pathologischen Instituts der LMU München danken.

Ich möchte mich bei allen meinen Freunden bedanken, die die Abende und Nachtschichten in den Bibliotheken zu einer besonderen und unvergesslichen Zeit haben werden lassen, an die ich mich immer erinnern werde.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern und meiner Familie danken, die immer an mich geglaubt haben und auf die ich mich immer verlassen kann.