

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie der  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

**Metastasierungsverhalten des kolorektalen Karzinoms:  
Expression von CIB-1 korreliert mit Fernmetastasen in der  
Leber aber nicht mit Peritonealkarzinose**



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

vorgelegt von  
Sven-Niclas Carl Jacob  
aus Kiel  
2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Florian Bösch

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Johann Spatz  
PD Dr. med. Christian Schulz

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Martin K. Angele  
Prof. Dr. med. J. Neumann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2022

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Sven Jacob, an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Metastasierungsverhalten des Kolorektalen Karzinoms:  
Expression von CIB-1 korreliert mit Fernmetastasen in der Leber aber  
nicht mit Peritonealkarzinose**

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

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

München, den 15. Oktober 2022

Sven-Niclas Carl Jacob

.....

Sven Jacob

---

Meiner Familie und Alaleh

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitender Überblick des kolorektalen Karzinoms .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Äthilogie und Pathologie .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Endogene Faktoren .....	2
1.2.2 Exogene Faktoren .....	2
1.2.3 Pathologie .....	3
<b>1.3 Karzinogenese.....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz .....	7
1.3.2 Serratierte Karzinogenese: „CpG-Island-Methylation-Phänotyp (CIMP)“ <i>dependent pathway</i> .....	9
1.3.3 Das Konzept der entarteten Stammzelle .....	10
<b>1.4 Metastasierungsverhalten .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Grundlagen der Metastasierung .....	11
1.4.2 Mechanismen der Metastasierung .....	12
<b>1.5 Diagnostik und Therapie.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Chirurgisches Verfahren .....</b>	<b>21</b>
<b>1.7 Prävention und Überleben.....</b>	<b>22</b>
<b>1.8 Vorwissen des validierten Markers CIB1.....</b>	<b>23</b>
<b>1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Promotionsarbeit.....</b>	<b>26</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Vorarbeit der Forschungsgruppe .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Erarbeitung des Patientenkollektiv und der Gewebebank .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Material.....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	32
2.3.2 Geräte .....	32
<b>2.4 Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.4.1 Präparation und Durchführung der Immunhistochemie .....	33
2.4.2 Bewertung und "scoring" der Immunhistochemie .....	34

Inhaltsverzeichnis

<b>2.5 Statistische Analyse .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Die Kohorte .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Auswertung der NanoString nCounter Expressionsanalyse.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Beurteilung der Immunhistochemie .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Korrelation zu klinisch-pathologische Variablen .....</b>	<b>44</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>66</b>

## 1. Überblick des kolorektalen Karzinoms

### 1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die weltweit dritthäufigste, bösartige Tumorerkrankung [1, 2]. Die Rate an Neuerkrankung nimmt jährlich zu, sodass aktuell weltweit 1 Million Neuerkrankungen pro Kalenderjahr zu verzeichnen sind [2]. Mehr als 90% dieser Patientinnen und Patienten haben bei Erstdiagnose (ED) bereits das 55te Lebensjahr überschritten [3]. Über die letzten Dekaden lässt sich ein deutlicher Gipfel vor allem in den vermeidlich weiterentwickelten, westlichen Ländern wie Europa und Nord Amerika feststellen. Sowohl die Tumorzinzidenz als auch die Sterberate sind zwischen Frauen und Männern gleich verteilt. Auch auf die Lokalisation des Primärtumors (PT) bezogen lassen sich keine relevanten, geschlechtsbezogenen Unterschiede festmachen. 50% aller PT finden sich im Rektum, weitere 30% im Colon sigmoideum. Die verbleibenden 20% sind dem Caecum, Colon ascendens, transversum und descendens zuzuordnen [4].

Geschlechtsübergreifend führt das KRK zu einer Todeszahl von mehr als 600000 Menschen p.a.. Das entspricht 15% aller auf eine maligne Grunderkrankung zurückzuführender Todesfälle. Wenn man die Überlebenszahlen unter Berücksichtigung der weltweit standardisierten, relativen 5-Jahres-Überlebensrate (5JÜ) und der Union Internationale contre le cancer (UICC) Stadieneinteilung betrachtet, kommt man zu folgendem Ergebnis: bis zum UICC Stadium III beobachtet man eine 5JÜ von mehr als 60%. Ab UICC Stadium IV, welches auch als metastasiertes Stadium zu bezeichnen wäre, sinkt diese Rate dramatisch auf unter 8% ab [5]. Auf dieser Tatsache beruht das weiterhin große wissenschaftliche Interesse am KRK und dessen Metastasierungsverhalten. Das Metastasierungsverhalten des KRK ist auch das zentrale Thema dieser Promotionsarbeit.

## 1.2 Ätiologie und Pathologie

In der Genese des KRK spielen sowohl endogene als auch exogene Faktoren eine Rolle. Wohl bemerkt entstehen über 90% der Tumore sporadisch, das heißt ohne, dass eine genetische Disposition bekannt ist.

### 1.2.1 Exogene Faktoren

Zu den exogenen Faktoren zählen eine Reihe von hoch variablen, umwelt- und meist lebensstilabhängigen Faktoren. Diese Faktoren führen zu einer erhöhten Prädisposition für das Auftreten eines KRK, sind aber nicht als alleiniger Auslöser zu sehen. Zum einen handelt es sich hierbei, wie auch bei vielen anderen bösartigen Tumoren des Digestivtrakts, um Alkohol- und Nikotinabusus, Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 [6]. Darüber hinaus spielen der vermehrte Konsum von unprozessiertem, rotem Fleisch und eine ballaststoffarme Ernährung eine relevante Rolle bei der Adenomentstehung. So erhöht beispielsweise eine Aufnahme von rotem Fleisch über die empfohlene Norm von 25-50g pro Tag das KRK-Risiko um das 1,16-fache mit jedem 100g Mehrkonsum [7].

### 1.2.2 Endogene Faktoren

Eine weitaus greifbarere und größere Rolle spielen allerdings eine Anzahl von endogenen, patientenbezogenen Faktoren. Die wichtigsten Kausalitäten diesbezüglich sind beschrieben zwischen dem KRK und 1) der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), 2) dem Lynch-Syndrom (Hereditary non polyposis colon cancer, HNPCC), 3) chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und 4) einer positiven Familienanamnese [4].

Die FAP ist die häufigste der adenombezogenen Prädispositionen. Sie beruht auf einer Mutation in dem adenomatösen polyposis coli (APC) Gen und führt letztlich zu einer Regulationsveränderung im Wnt-Signalweg. Dieser wiederum ist mit Tumorentstehung und epithelial-mesenchymaler Transition assoziiert ist [8].



Das Lynch-Syndrom entsteht auf dem Boden einer Mutation in einem der mismatch-repair Gene MLH1, MSH2, MSH6, EPCAM und PMS2. Diese Veränderung hat eine Mikrosatteliteninstabilität (MSI) zur Folge und trägt so zur Tumorentstehung bei [9].

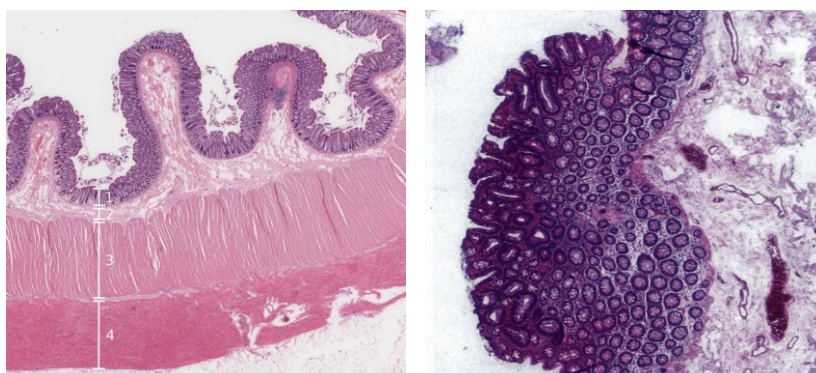
Die eben aufgeführten Punkte können zu einem gewissen Anteil die Inzidenz kolorektaler Karzinome erklären. Der deutlich größere Anteil an kolorektalen Karzinom entsteht jedoch nicht durch hereditäre Erkrankungen, sondern vielmehr ausgelöst von spontanen Mutationen. Da diese Arbeit die genetische Variabilität des eigentlichen Primarius untersucht, also sporadische auftretende KRK, werden im Folgenden Patienten mit FAP, HNPCC oder Dergleichen ausgeschlossen. Das Hauptaugenmerk liegt also auf sporadisch auftretenden KRK aus epithelialeem Ursprung, welche den weitaus größten Anteil darstellen.

### 1.2.3 Pathologie

Die Wand des Dickdarms besteht aus der Tunica mukosa (lamina epithelialis, lamina propria und lamina muscularis), Tunica submukosa, Tunica muskularis und Tunica adeventitia bzw. serosa. Die submuköse Schicht ist für das pathognomonische Kryptengeflecht verantwortlich, an dessen Basis sich die Stammzellen befinden. Aus diesen sich selbst erneuernden und atypisch teilenden Stammzellen gehen dann die reifen Epithelzellen hervor: enteroendokrine Zellen, Becherzellen, Enterozyten und Panethzellen. Diese wandern nach Abschluss ihres Lebenszyklus zur natürlichen Abstoßung an die Spitze der Krypten.

Als Adenom bezeichnet man eine Vermehrung von epithelialen Drüsenzellen. Adenome sind per se nicht bösartig und bei mehr als der Hälfte der Bevölkerung zu finden ist. Es wird davon ausgegangen, dass also die initiale Karzinomentstehung auf dem Boden entarteter wenn auch initial benigner Stammzellen beruht. Der eigentliche Entstehungsort dieser Adenome ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. In diesem Zusammenhang wird zwischen dem „*bottom-up*“-Model und dem „*top-down*“-Model differenziert. Der Hauptunterscheid zwischen den beiden Modellen besteht darin, dass sich

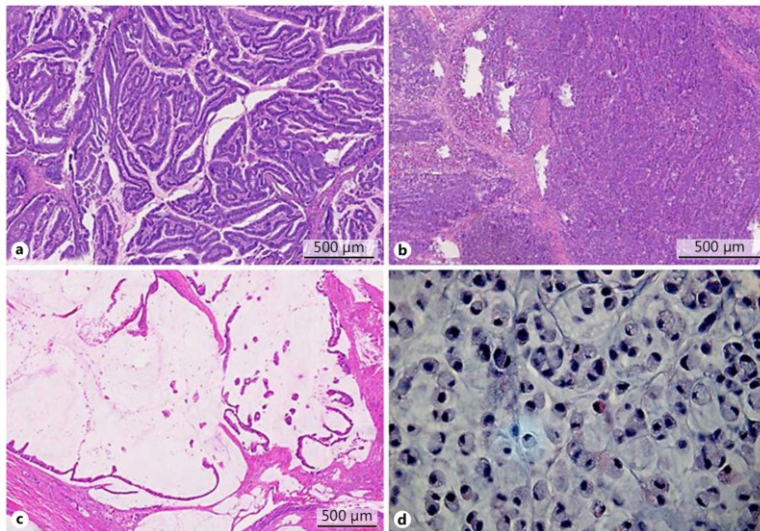
die Adenome an der Kryptenspitze (*top-down*) entwickeln und sich gen Basis ausbreiten oder dies in umgekehrter Richtung geschieht [10]. Generell lassen sich Adenome in tubulär, tubulovillös und villös einteilen. An Häufigkeit unterscheidet man in absteigender Reihenfolge tubuläre von tubulovillösen und villösen Adenomen. Das Entartungsrisiko dieser Adenome verhält sich umgekehrt zur Inzidenz: villös > tubulovillös > tubulär. Neben dem Adenom Subtyp wird das Entartungsrisiko mit der Größe der Adenome (größer 1cm) und der Anzahl (mehr als 3) in Zusammenhang gebracht [11]. Anhand der Adenom Subtypen und der Größe lassen sich unterschiedliche Dysplasiegrade einteilen [12]. Low-grade Dysplasien bezeichnen demnach fakultative Präkanzerosen wobei high-grade Dysplasien solche Adenome einschließen, die bereits die lamina muscularis der Mukosa erreicht haben. Derartige Adenome gelten dann als obligate Präkanzerose [13, 14]. Daneben ist noch das sessil-serratierte Adenom zu erwähnen, welches direkt in ein Karzinom übergehen kann und folglich als high-grad Dysplasie eingestuft wird [15, 16]



**Abb. 1: Links: normale Kolonschleimhaut mit 1) Tunica mukosa, 2) Tela submukosa, 3) Tunica muskularis, 4) Tela subserosa. Rechts: tubuläres Adenom des Dickdarms. Kopie aus [17].**

Die überwiegenden Teile der Tumore des Dickdarms sind Adenokarzinome (über 95%) entstanden aus der Adenom-Karzinom-Sequenz (AKS) bzw. dem serratierten Karzinogeneseweg (SKW). Von den oben beschriebenen Adenomen lassen sich laut World Health Organization (WHO) abhängig vom histologischen Subtyp das muzinöse Adenokarzinom, das Siegelringzellkarzinom, das kleinzellige Karzinom und das als Rarität zu wertende adenosquamöse Karzinom differenzieren (siehe Abb. 2). Diese Klassifizierung ist aus histopathologischen

Gründen relevant und beeinflusst die weitere molekulare Diagnostik (beispielsweise anhand von Nachfärbungen unterschiedlicher Biomarkerexpressionen) und Therapie des KRK. Die verschiedenen Karzinogenesewege sowie ein tieferer Einblick in die Diagnostik und Therapie werden im Folgenden beschrieben.



**Abb. 2:** Die unterschiedlichen Subtypen des KRK definiert nach WHO: a= Adenokarzinom mit glandulärer Struktur; b= medulläres Karzinom mit solidem Wachstum; c= muzinöses Karzinom; d= Siegelringzellkarzinom. Kopie aus [13].

### 1.3 Karzinogenese

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Erforschung von Tumorentstehung ein sich kontinuierlich entwickelnder Prozess ist, lassen sich zum heutigen Zeitpunkt drei federführende Theorien über die Entstehung des KRK unterscheiden. Dies ist zum einen eine Genese nach dem Prinzip der Adenom-Karzinom-Sequenz und die Entstehung aus der „serratierten Karzinogenese“. Zum anderen spielt die Theorie der Tumorentstehung aus entarteten Stammzellen eine relevante Rolle.

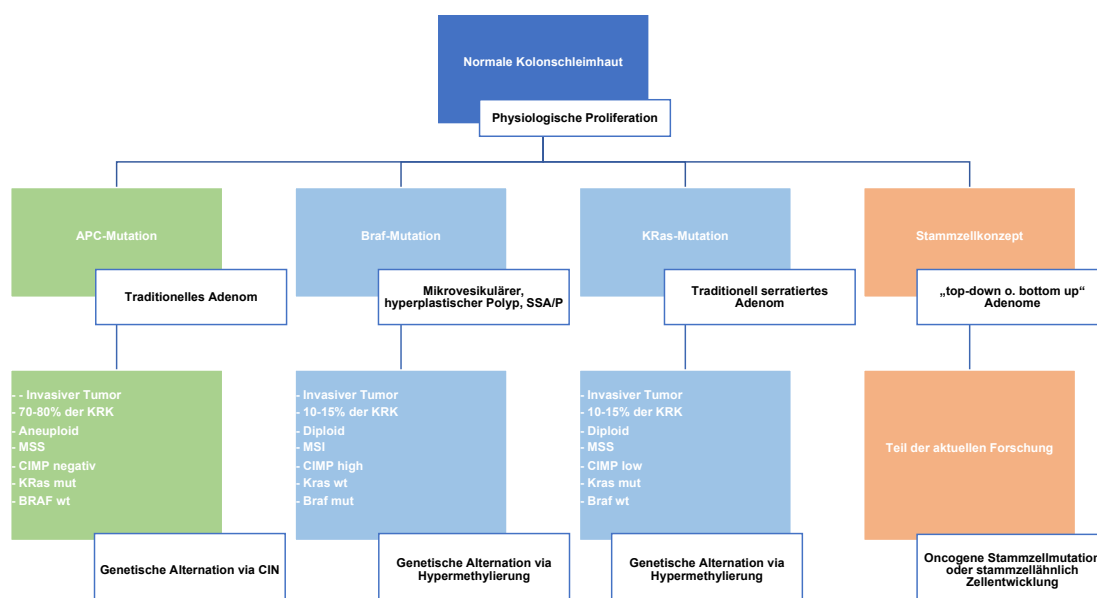


Abb. 3: Überblick über die verschiedenen Karzinogenesewege. Differenzierung der Tumorentstehung abhängig von Veränderung im APC-Gen, mismatch-repair-Genen, BRAF- und KRas Mutationen. Grün= Adenom-Karzinom-Sequenz, hellblau= Serratierte Karzinogenese, orange= Stammzellkonzept. Modifiziert nach [18].

### 1.3.1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Die AKS hat ihren Ursprung in einem von Fearon und Vogelstein [19] begründeten Modell, welches besagt, dass sich aus einem initial benignen Adenom durch schrittweise, mutationsgetriggerte Veränderungen ein bösartiges Karzinom entwickelt. Es wird davon ausgegangen, dass über 80% aller sporadisch entstehenden KRK auf diese Theorie zurückzuführen sind [20, 21]. Am Anfang diesen Prozesses steht die erstmals beschriebene und in Zusammenhang mit der Entstehung von KRK notierte Genalteration überhaupt: die *aberrant crypt focus* (APC)-Mutation [20, 21]. Das APC-Gen ist ein sogenanntes *gate-keeper*-oder auch Tumorsupressorgen. Seine Aufgabe besteht unter anderem darin, das Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose in stetigem Gleichgewicht zu halten. Es ist auch dafür verantwortlich, die Funktion des Wnt-Signalwegs, welcher maßgeblich Zellproliferation und EMT steuert, zu regulieren [22]. Kommt es zu einer Mutation von APC wird der Wnt-Signalweg hoch reguliert. Die Wnt-Signalmoleküle können an den *low-density lipoprotein receptor-related protein-Rezeptor* (LRP) und Transmembranrezeptor Frizzled (Fz) binden und den kanonischen Signalweg starten. Der Wnt-Fz-Komplex aktiviert im Folgenden das intrazelluläre Protein Dishevelled (Dh). Dieses wiederum hemmt den physiologischen Abbauprozess (u.a. bestehend aus APC, GSK3 und CK1) von  $\beta$ -Catenin welches sodann akkumuliert und in den Nucleolus wandert. Dort bindet es mit *T-cell-specific transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor* (Tcf/Lef)-Subtypen und aktiviert Gene welche wiederum die Zellteilung- und progression fördern, wie z.B. Cyclin D und C-myc [23]. Einhergehend mit einer Dysregulation im APC-Wnt-Signalweg sind dann downstream ebenso Veränderungen in der Funktion von KRas, BRaf und p53 sowie dem mitogen-activated protein (MAP) [18]. Dadurch entsteht ein ständiges Ungleichgewicht zwischen Zellteilung und Apoptose in welchem die Zellteilung überwiegt und konsekutiv Zellen weiter maligne entarten. Abbildung 4 fasst den APC-Wnt Signalweg illustrativ zusammen.

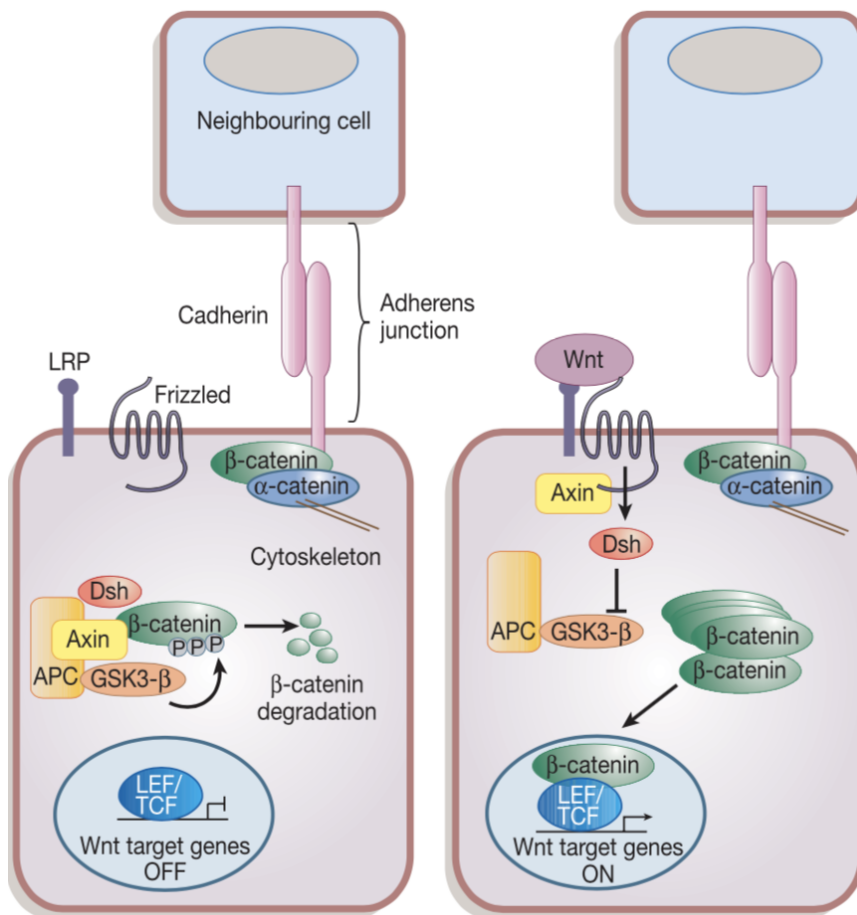


Abb. 4: APC/Wnt Signalweg. Pfeil=Aktivierung, ⊥= Inhibition. Kopie aus [11].

### 1.3.2 Serratierte Karzinogenese: „CpG-Island-Methylation-Phänotyp (CIMP)“ dependent pathway

Dem AKS steht der serratierte Karzinogeneseweg gegenüber, dessen Endprodukte sich histologisch, funktionell und von ihrem Malignitätscharakter unterscheiden [24]. Eine Mutation im KRas oder BRAF Gen induziert diesen Karzinogeneseweg. Es kommt daraufhin zu einer Störung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade und folglich zu einer ineffektiven Zellzyklusregulation [25]. Durch eine Hypermethylierung bestimmter DNA Promotorregionen, welche sich durch Cytosin und- Guanin-dinucleotidreiche Domänen auszeichnen, auch CpG-Islands genannt, resultiert ein Funktionsverlust von relevanten Reparaturgenen und ein Anhäufen defekter bzw. entarteter DNA. Zu den wichtigsten zählt wohl das *missmatch-repair-gene* hMLH1, welches als hauptverantwortliches Gen für eine Mikrosatelliteninstabilität gehandelt wird [23]. Zu den aus diesem Weg hervorgehenden Adenomen bzw. Karzinomen gehören das sessile serratierte Adenom, das serratierte Adenom, der hyperplastische Polyp und das serratierte Adenokarzinom. Abbildung 5 fasst den KRas Signalweg illustrativ zusammen.

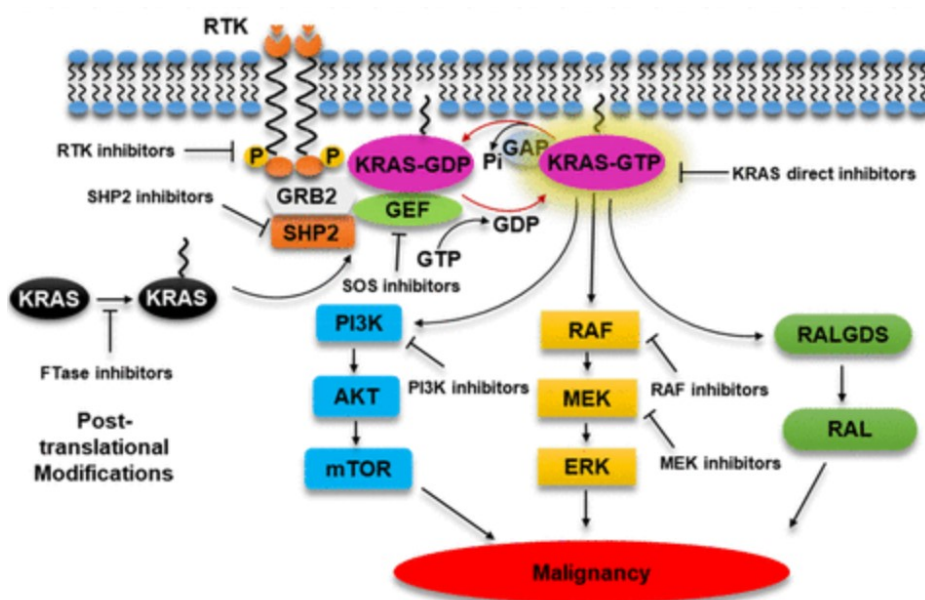


Abb. 5: KRas Signalweg. Pfeil=Aktivierung, ⊥= Inhibition. Kopie aus [11, 26].

### 1.3.3 Das Konzept der entarteten Stammzelle

Die Idee hinter dem Stammzellkonzept spiegelt in gewisser Weise die natürliche Evolution der Zellen der Dickdarmschleimhaut wider. Es wird davon ausgegangen, dass Tumore als abnorme Zellverbände anzusehen sind, welche initial aus einer entarteten Stammzelle hervorgegangen sind, die zuvor die endogene Kontrolle über Zellteilung und Differenzierung verloren hat [27]. Die Erklärung für diesen Mechanismus ist bis zum heutigen Tage noch nicht abgeschlossen und Teil der aktuellen Forschung. Zwei relevante Hypothesen werden international diskutiert: 1) eine onkogene Mutation in einer Stammzelle mit folglich unkontrollierter Proliferation und 2) eine Differenzierung normaler Zellen in einen stammzell-ähnlichen Zustand [28]. In beiden abnormalen Zellverbänden befinden sich weiterhin Stammzellen, welche nun als Tumorstammzellen zu bezeichnen sind [29]. Sie haben, wie die physiologische Stammzelle auch, das Potential, sich zu teilen und eine sogenannte *transit-amplifying*-Zelle zu bilden, welche die Vorläuferstufe der ausgereiften Tochterzellen darstellt [30]. Wie auch in den Krypten der normalen Kolonmukosa sind diese Zellen in deutlich reduzierter Anzahl zu finden, persistieren jedoch dauerhaft und sind somit perfekte Kandidaten um genetische Veränderung von Zyklus zu Zyklus zu übertragen [29]. Gleichzeitig bietet diese dauerhafte Persistenz jedoch potentielle Angriffsflächen für Identifizierungsmechanismen und Therapien. So sind neben Stammzellen, die generell mit Tumorwachstum assoziiert sind, auch Stammzellmarker nachgewiesen worden, die maßgeblich mit dem KRK in Verbindung gebracht werden. Zu diesen zählen vornehmlich der *leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled-receptor 5* (LGR5), CD44, CD133 und das *epithelial cell-adhesion molecule* (EpCAM) [27].



## 1.4 Metastasierungsverhalten

Die Fähigkeit des Primärtumors zur Absiedlungen in anderen Organen beschreibt eine der Grundeigenschaften einer bösartigen Karzinomerkrankung. Exemplarisch dargestellt kann diese Ausbreitung über die Blutbahn (hämatogen), über die Lymphabflussbahn (lymphogen) von statten gehen. Darüber hinaus wird als weiterer Weg eine Streuung per continuitatem, wie bei einer Peritonealkarzinose vermutet, diskutiert. Aufgrund der Tatsache, dass die Ausbildung von Metastasen in vielen Erkrankungen, so auch beim KRK, den limitierenden Faktor in der Behandlungsfähigkeit eines Patienten und somit seinem Gesamtüberleben (OS) darstellt, kommt diesem Kapitel eine besondere Bedeutung zu.

### 1.4.1 Grundlagen der Metastasierung des KRK

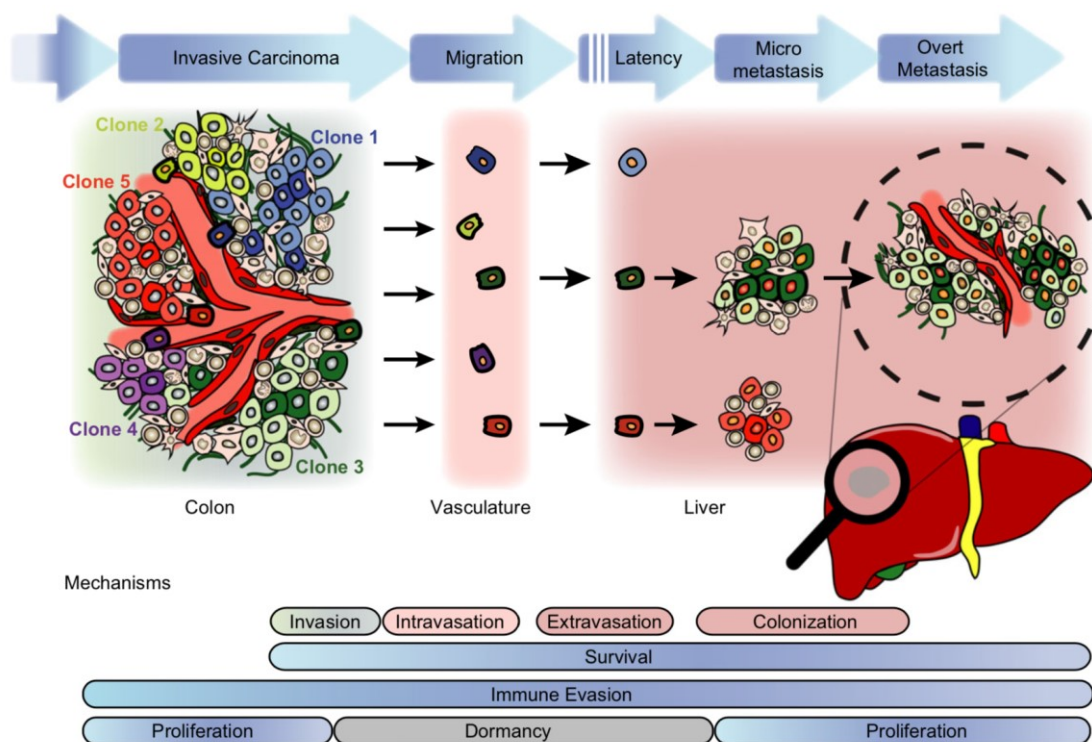
Die Lage des Tumors im Dickdarm hat entscheidenden Einfluss auf das Metastasierungsspektrum des Karzinoms. Tumore, die weiter als 16 cm von der Anokutanlinie entfernt sind, streuen bevorzugt lymphogen in mesenteriale Lymphknoten und hämatogen, abhängig von der genauen Lokalisation des Tumors, in den meisten Fällen zuerst in die Leber, seltener in die Lunge [4]. Begründet ist dies durch den Blutabfluss dieses Darmabschnitts über die V. mesenterica inferior und letztlich über das Pfortadersystem in die Leber. Dickdarntumore weniger als 16cm von der Anokutanlinie entfernt, in Europa per definitionem Rektumkarzinome, verhalten sich aufgrund ihrer venösen Drainage anders. Der Blutabfluss der tiefen Abschnitte des Rektums werden durch die V. rectalis media und inferior sowie dem internen Iliakastromgebiet drainiert und es kommt vermehrt zu Lungenmetastasen [11]. Man spricht hier also vom Abfluss des Cava-Typs. Darüber hinaus streuen sie lymphogen eher in paraaortale Lymphknoten.

Beiden Entitäten gemeinsam ist die Tatsache, dass die Metastasierung per continuitatem ebenfalls beobachtet wird. So kann es zur Infiltration von umliegenden Organen und Bindegewebsstrukturen wie auch der Ausbildung einer Peritonealkarzinose kommen. Zudem ist von außerordentlicher Bedeutung, dass bei knapp 40% der peritoneal metastasierten Patienten keine weiteren

Fernmetastasen auftreten. Man kann somit von einer lokal fortgeschritten Tumorentität mit spezifischen, genetischen Veränderungen ausgehen, die nach einer Tumorperforation zum Einzug maligner Zellen in den peritonealen Raum führt [31].

#### **1.4.2. Mechanismen der Metastasierung**

Der Prozess der Metastasierung ist ein hoch komplexer, langwieriger und multifaktorieller Vorgang. Er beginnt bereits mit der Entstehung des invasiv wachsenden, malignen Tumors. Die entarteten Zellen finden im Folgenden Anschluss an Blut- und Lymphbahnen über welche sie potentiell in ferner gelegene Organe streuen können. Werden sie, dort angekommen oder sich auf dem Weg befindend, nicht vom körpereigenen Immunsystem erkannt und bekämpft, kommt es zuletzt zum Austritt aus der Strombahn und Ansiedlung in den betroffenen Organen [31]. Die soeben beschriebenen Schritte werden als Invasion, Zirkulation, Extravasion und Kolonisation beschrieben und sind in Abbildung 6 zusammengefasst. Die einzelnen genetischen Alterationen, die die Tumorzellen dazu befähigen, den oben genannten Prozess zu durchleben, sind noch nicht abschließend geklärt. Es wurden jedoch bereits einige, vielversprechende und plausible Varianten diskutiert. Diese werden im Verlauf beschrieben und erläutert.



**Abb. 6: Vereinfachter Überblick über die durchlaufenden Sequenzen vom Primärtumor hin zur Metastase. Unterschiedlichen Farben symbolisieren die genetischen Tumorunterschiede (Klone). Schwarze Pfeile spiegeln von links nach rechts Invasion, Zirkulation, Extravasation und Kolonisation wieder. Kopie aus [31].**

Sowohl in der klinischen Forschung als auch in dieser Arbeit liegt einer der Hauptaspekte auf dem Unterschied zwischen der hämatogenen Aussaat von Tumorzellen in die Leber und dem Prozess der Entstehung einer Peritonealkarzinose. Diese beiden Wege werden im Folgenden genauer erläutert.

Bei der hämatogenen Metastasierung scheinen sowohl der Organotropismus, die Tumorbiologie und Tumorerheterogenität als auch Angiogenesefaktoren eine Rolle zu spielen. Außerdem sind sich auf das Mikromilieu ausübende Immunologische- und Inflammationsprozesse von immenser Bedeutung [8].

Der Organotropismus beschreibt zusammengefasst die Interaktion zwischen verschiedenen, tumorspezifischen Zellen und dem den Tumor umgebenden Mikromilieu. Zu den wichtigsten Mutationen, die diese Interaktion steuern, zählen

Funktionsabweichungen der epithelialen Zellverbände, häufig E-Cadherin-assoziiert, die Veränderung verschiedener Integrine, allen voran *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1), Mutationen in der Signalkaskade des *vascular-endothelial growth-factor*-Rezeptors (VEGF) (meist vermittelt durch die *pyruvate dehydrogenase kinase-1* und 2 (PDK-1 und PDK-2) und das vermehrte Auftreten von CD 133 exprimierenden Tumorstammzellen [8].

Die Tumorbilogie ist ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung. Sie beschäftigt sich hauptsächlich mit der EMT von Tumorzellen und somit Pathologien der Zellmobilität, der Invasion, Regulierung der Apoptose und Degradierung sowie Interaktion mit der Extrazellulären Matrix (EZM) [32]. Hier betroffene und wichtig zu erwähnende Signalkaskaden sind die RAS-RAF-MEK-ERK-Kaskade, der PI3K/AKT-*pathway*, der kanonische, Wnt-vermittelte Signalweg und die TGF- $\beta$ /Smad Kaskade [33].

In der Angiogenese des KRK, zumeist ebenfalls VEGF-abhängig, spielen ähnliche Kaskaden eine Rolle. Zu diesen zählen MAPK/PI3K und PKD2 assoziierte Signalwege. Sie sorgt nicht nur für eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Primarius, sondern stellt einen möglichen Eintrittsweg von Tumorzellen in die Blutbahn dar. Die Inflamationsprozesse, die den gravierendsten Einfluss auf das Mikromilieu des KRK haben, werden gehäuft initiiert durch *tumor growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), Interleukin 1b (IL-1b) und Interleukin 6 (IL6) [34].

Demgegenüber steht die Ausbildung einer Peritonealkarzinose (PK). Hier ist zwar ebenfalls von einem Verlust der Zellanhaftung auszugehen (integrin- und proteoglykanvermittelt), dann jedoch erfolgt ein Anheftungs- und Invasionsprozess an das Peritoneum und damit die Streuung der Tumorzellen [35]. Assoziiert wird dieser Vorgang unter anderem häufig mit kolorektalen Karzinomen, die bereits die Serosa überschritten haben und somit als lokal fortgeschritten zu werten sind. Darüber hinaus geht die Ausbildung einer PK mit einer Invasion von Lymphbahnen einher [36]. Zu den wichtigen Signalproteinen zählen in diesem Zuge der *endothelial growth-factor* Rezeptor (EGFR), TWIST und c-MET, Proteine der ICAM- und EPCAM-Familie sowie

---

Matrixmetalloproteinasen zur Invasion. Jedoch spielt auch in der Ausbildung der PK eine Umwandlung des Mikromilieus eine relevante Rolle. Hier werden von KRK-Zellen veränderte peritoneale Fibroblasten, Makrophagen und Mesothelzellen in der aktuellen Literatur eingehend diskutiert [37].

## 1.5 Diagnostik und Therapie

In der diagnostischen Strategie ist zwischen dem Kolonkarzinom und dem Rektumkarzinom zu differenzieren. Die Basisuntersuchung bei Verdacht auf ein KRK ist jedoch beiden gemein. Sie beginnt mit der digital-rektalen Untersuchung (DRU). Zum einen sind bis zu 10% der KRK tastbar (Rektumkarzinome), zum anderen lässt sich auf diese Weise bereits eine Infiltrationshöhe des Rektums abschätzen. Orientierend kann auch so die Schließmuskelfunktion beurteilt werden. Des Weiteren wird eine Bestimmung des Tumormarkers Karzinoembryonales Antigen (CEA) zur Ausgangsbestimmung vor Therapiestart empfohlen. Als nächstes erfolgt eine komplette Koloskopie mit Probengewinnung und ggf. Tusche- bzw. Clipmarkierung bei zeitnah geplanter Operation. Der nächste diagnostische Schritt in der Abklärungsphase ist eine Sonographie des Abdomens zum Ausschluss von Lebermetastasen und eine Computertomographie (CT) von Abdomen und Lunge. So kann auch eine mögliche pulmonale Metastasierung frühzeitig erkannt werden [38]. Besteht Anhalt für ein Rektumkarzinom, ist eine starre Rektoskopie zur genauen Höhenbestimmung des Tumors erforderlich. Dazu kommen eine MRT-Untersuchung des Beckens und eine endosonographische Untersuchung des Tumorareals. So kann der Abstand zur mesorektalen Faszie, umliegende Lymphknoten und eine Tiefeninfiltration genau beschrieben werden. Bei kleinen Tumoren, welche noch als T1 zu werten sind (siehe unten), ist die endosonographische Untersuchung zur Bestimmung der Infiltrationstiefe umso mehr angeraten, da hier zwischen endoskopischer und operativer Sanierung differenziert werden kann (siehe unten) [38].

Bei unklaren Befunden und Verdacht auf Fernmetastasierung wird die Diagnostik um weitere schnittbildgebende Verfahren erweitert. Hier kommen sowohl eine Computertomographie (CT) vom Becken und auch eine kontrastmittelgestützte Leber-sonographie, eine Magnetresonanztomographie (MRT) und eine PET-CT-Untersuchung in Betracht. Die eigentliche Durchführung dieser Untersuchungsmethoden ist jedoch als Stufenprozess anzusehen [39].

Durch Zusammenschau der oben gesammelten Informationen lässt sich das KRK anschließend anhand der TNM-Klassifikation einteilen, wobei T sich auf die Infiltrationstiefe, N auf den Befall von Lymphknoten und M auf das Vorhandensein von Metastasen bezieht:

<b>TNM</b>	<b>Ausdehnung</b>
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Infiltration der Submukosa
<b>T2</b>	Infiltration der Muscularis propria
<b>T3</b>	Infiltration der Subserosa, Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes
<b>T4</b>	Perforation des viszeralen Peritoneums (T4a) oder Infiltration anderer Organe/Strukturen (T4b)
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	1–3 regionäre Lymphknoten
<b>N2a</b>	4–6 regionäre Lymphknoten
<b>N2b</b>	≥7 regionäre Lymphknoten
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1a</b>	Fernmetastasen: Nur ein Organ betroffen
<b>M1b</b>	Fernmetastasen: Mehr als ein Organ betroffen
<b>M1c</b>	Fernmetastasen im Peritoneum, mit oder ohne Befall anderer Organe

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des KRK – Stand 2017, modifiziert nach [40].**

Darüber hinaus ist die Stadieneinteilung der kolorektalen Karzinome nach der *Union for International Cancer Control (UICC)* von hoher Bedeutung, da sie maßgeblich die Therapie beeinflusst:

<b>KRK-UICC-Stadium</b>	<b>TNM</b>
<b>0</b>	Tis (Carcinoma in situ)
<b>I</b>	Bis T2, N0, M0
<b>II</b>	
<b>IIA</b>	T3, N0, M0
<b>IIB</b>	T4a, N0, M0
<b>IIC</b>	T4b, N0, M0
<b>III</b>	
<b>IIIA</b>	Bis T2, N1, M0 oder T1, N2a, M0
<b>IIIB</b>	T3/T4, N1, M0 oder T2/T3, N2a, M0 oder T1/T2, N2b, M0
<b>IIIC</b>	T4a, N2a, M0 oder T3/T4a, N2b, M0 oder T4b, N1/N2, M0
<b>IV</b>	
<b>IVA</b>	Jedes T, jedes N, M1a
<b>IVB</b>	Jedes T, jedes N, M1b
<b>IVC</b>	Jedes T, jedes N, M1c

**Tabelle 2: Stadieneinteilung des KRK anhand der UICC-Klassifikation aus 2010.**

Vor der Einleitung einer möglichen Systemtherapie sollte dann die Diagnostik, abhängig von der Lokalisation des Primarius, um eine molekularpathologische Aufarbeitung des Tumors erweitert werden. So kann die Therapie so zielgerichtet wie möglich gestaltet werden. Zu dieser Untersuchung gehört bei Kolon-Karzinom primär die Bestimmung des Ras-Mutationsstatus auf Alterationen im KRas oder NRas Gen, da bis zu 50% der metastasierten KRK eine Ras-Mutation aufweisen. Anschließend sollte die Bestimmung von BRAf-Alternationen untersucht werden. Schließlich gilt es den Status der Microsatelliteninstabilität (MSI) zu kennen, welcher sich in hoch (MSI-h) und niedrig (MSI-n) unterscheidet.

Wenn all diese Informationen erhoben wurden, kann ein Therapieplan festgelegt werden. Dieser wird neben der Tumorausdehnung auch vom Fitnessgrad des Patienten, bestimmt anhand des ASA-Status (American Society of Anaesthesiologists) und ECOG-scores (Eastern Cooperative Oncology Group), und vom Metastasierungsprofil beeinflusst. Vereinfacht ausgedrückt gilt beim Kolonkarzinom: die Erstlinientherapie bei allen ausreichend belastbaren, nicht



metastasierten Patienten, bei denen ein kurativer Therapieansatz zu verfolgen ist, ist immer die radikale onkologische Tumorresektion mit dem Ziel der lokalen Tumorfreiheit. Onkologisch bedeutet in diesem Zusammenhang, dass alle betroffenen Darmabschnitte en-bloc im Gesunden, also mit ausreichend Sicherheitsabstand, und dem entsprechenden Lymphabfluss reseziert werden. Weist der Patient bereits synchrone, also bei Erstdiagnose vorhandene Metastasen auf oder ist der Tumor auf Grund seiner Größe nicht primär resektabel, so muss die Therapie laufend angepasst und dem UICC-Stadium gerecht durchgeführt werden. Im Falle chirurgisch nicht zu resezierender Metastasen sollte die Therapie dann im Rahmen eines interdisziplinären Konzepts um radiotherapeutische Interventionen wie die Radiofrequenzablation erweitert werden. Bei primär nicht resektablen Primären kann eine neoadjuvante Chemotherapie zum down-staging in Frage kommen. Der Übersicht halber wird die Therapie des Kolon- und des Rektumkarzinom im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

UICC-Stadium	TNM	Therapieempfehlung
	<b>Tis bis T1</b>	Radikale endoskopische Resektion ohne adj. Chemotherapie
<b>0-I</b>		
	<b>T2, N0, M0</b>	Radikale Resektion ohne adj. Chemotherapie
<b>II</b>	<b>Bis T4, N0, M0</b>	Radikale Resektion, adj. Chemotherapie individuell
<b>III</b>	<b>Jedes T, N1, M0</b>	Radikale Resektion, adj. Chemotherapie empfohlen
<b>IV</b>	<b>Jedes T, N, M1</b>	Individuelles Vorgehen je nach Befund

**Tabelle 3: Stadiengerechte Therapie des Kolonkarzinoms. Modifiziert nach [38]. TIS= carcinoma in situ.**

Beim Rektumkarzinom spielt im Vergleich zum Kolon-Karzinom die präoperative Bestrahlung eine wichtige Rolle. Im neoadjuvanten Setting werden Patienten bereits ab Stadium UICC II radio -beziehungsweise radiochemotherapiert. Dies kann im Rahmen einer Kurzzeitbestrahlung (5 Zyklen mit je 5 Gy) und zeitnaher Operation innerhalb von zwei Wochen oder einer konventionell-fraktionierten Radiochemotherapie mit bis zu insgesamt 50Gy und einer Operation nach 6-8 Wochen erfolgen. Die adjuvante Therapie ist dann abhängig vom jeweiligen postoperativen Tumorstadium.

UICC-Stadium	TNM	Therapieempfehlung
	<b>Tis bis T1</b>	Low-Risk: Lokale, transanal-endoskopische Vollwandexzision, keine adj. Ctx High-Risk: Rektumresektion/ Rektumextirpation, keine adj. Ctx
<b>0-I</b>		
	<b>T2, N0, M0</b>	Rektumresektion/ Rektumextirpation, keine adj. Chemotherapie
<b>II</b>	<b>Bis T4, N0, M0</b>	Mittleres und unteres Kolondrittel: Rektumresektion/ Rektumextirpation, meist neoadj. RCtx Oberes Drittel: Rektumresektion und adj. Ctx
<b>III</b>	<b>Jedes T, N1, M0</b>	Mittleres und unteres Kolondrittel: Rektumresektion/ Rektumextirpation, meist adj. RCtx Oberes Drittel: Rektumresektion und adj. Ctx
<b>IV</b>	<b>Jedes T, jedes N, M1</b>	Individuelles Vorgehen

**Tabelle 4: Stadiengerechte Therapie des Rektumkarzinoms. Modifiziert nach [38]. Ctx= Chemotherapie, RCtx= Radiochemotherapie.**

Die finale Entscheidung der sowohl zu dem Patienten als auch zum Krankheitsstadium passenden Chemotherapie sollte dann in einem interdisziplinären Tumorboard gefällt werden. Die aktuell gängigsten Therapeutikakombinationen sind das FOLFOX-Protokoll (5-FU + Folinsäure + Oxaliplatin), das FOLFIRI-Protokoll (5-rFU + Folinsäure + Irinotecan), das FOLFOXIRI-Protokoll (5-FU + Folinsäure + Oxaliplatin + Irinotecan) und das XELOX-Regime (Capecitabin + Oxaliplatin). Die Zugabe des Antikörpers Bevacizumab (VEGF-*pathway*-Inhibitor) wird heute bei den meisten Kombination empfohlen. Abhängig vom molekularpathologischem Mutationsstatus und der Tumorlokalisierung kann die Therapie dann noch um passende und zielgerichtete Antikörper erweitert werden. Die etabliertesten sind Cetuximab oder Panitumumab als Anti-EGFR-Therapie [38]. Patienten, die für solch eine Therapieerweiterung in Frage kommen, sollten auf Grund fehlender Evidenzlage in Studien eingeschlossen werden.

## 1.6 Chirurgisches Verfahren

Auch in der chirurgischen Sanierung haben sich in den letzten Jahren deutlich Fortschritte gezeigt. Beim Kolonkarzinom hat die Darmresektion in Kombination mit kompletter mesokolische Exzision (CME) sowohl das Rezidiv-Risiko gesenkt als auch die Lymphadenektomie deutlich verbessert [41]. Durch scharfes trennen des parietalen vom viszeralen Blatt des Mesokolons kann das viszerale Mesokolon samt Lymphknotenpaketen mit intakten Hüllschichten entfernt werden. Beim Rektumkarzinom hat die komplette mesorektale Exzision gleiches bewirkt. Bei schichtgerechter Präparation kann auf diese Weise nervenschonend bis zum Beckenboden präpariert werden und eine deutlich höhere Radikalität erreicht werden [42]. Das Ausmaß der Darmresektion ist dabei abhängig von der genauen Tumorlokalisierung. Tabelle 5 fasst die Tumorlokalisierung mit zugehörigem Resektionsausmaß zusammen.

Lokalisation	Resektionsausmaß
Coecum	Onkologische Hemikolektomie rechts
Kolon ascendens	Onkologische Hemikolektomie rechts
Rechte Fleur	Onkologische erweiterte Hemikolektomie rechts
Kolon transversum	Onkologische Transversumresektion, ggf. Hemikolektomie rechts oder links
Linke Fleur	Onkologische erweiterte Hemikolektomie links
Kolon descendens	Onkologische Hemikolektomie links
Kolon sigmoideum	Onkologische Hemikolektomie links
Oberes Rektum	Onkologische anteriore Rektumresektion
Mittleres Rektum	Onkologische tiefe anteriore Rektumresektion
Unteres Rektum	Onkologische tiefe anteriore Rektumresektion
Tiefes Rektum	Onkologische abdominoperineale oder intersphinktere Rektumresektion

**Tabelle 5: Chirurgisches Therapieausmaß abhängig von der Tumorlokalisierung**

## 1.7 Prävention und Überleben

Um Patienten frühzeitig zu erkennen und so präventiv einer unnötigen Fortschreitung der Tumorerkrankung vorzubeugen, wird in Deutschland empfohlen, Männer über 50 Jahre ohne Risikoprofil koloskopisch zu screenen. Bei Frauen ab 50 Jahren wird der jährliche Stuhltest auf okkultes Blut empfohlen [38]. Ab dem 55ten Lebensjahr wird bei beiden Geschlechtern dann die Koloskopie inklusive einer DRU angeraten. Bei unauffälligem Befund sollte die Koloskopie alle 10 Jahre wiederholt werden. Bei erhöhtem Risikoprofil ist die Vorsorge entsprechend anzupassen. Bei Patienten mit Verwandten ersten Grades, die ein KRK in der Anamnese haben oder unter hereditären Erkrankungen, die zur Ausbildung multipler Adenome führen, leiden, bedeutet dies die koloskopische Vorsorge 10 Jahre vor Erstdiagnose des Indexpatienten zu beginnen. Bei genetischer Vorbelastung im Sinne einer FAP oder eines HNPCC ist die Vorsorge individuell zu gestalten [43]. Bei Zutreffen der Amsterdam-Kriterien (Hinweise für das Vorliegen einer HNPCC) und Mikrosatellitenstabilität beziehungsweise Zutreffen der Bethesda-Kriterien (Hinweise für das Vorliegen einer HNPCC) sollte die Koloskopie ab dem 25. Lebensjahr begonnen werden und alle 3-5 Jahre beziehungsweise alle 3 Jahre respektive wiederholt werden.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einem KRK liegt in Deutschland bei ungefähr 62% [3]. Im Vergleich zu vielen anderen onkologischen Operationen ist beim KRK eine signifikante Korrelation zwischen Erfahrungsgrad des Operateurs und Überleben des Patienten nachgewiesen. Beim Kolonkarzinom ist ab Stadium III des Weiteren eine signifikante Verbesserung des Überlebens nach Erhalt einer adjuvanten Chemotherapie nachgewiesen [38]. Beim Rektumkarzinom kann außerdem die Lokalrezidivrate durch neoadjuvanten Therapie erheblich gesenkt werden [38]. Aber auch in fortgeschrittenen metastasierten Stadien ist durch eine multimodale Therapie ein deutlich verbessertes Überleben zu beobachten. Im Falle einer Metastasierung in die Leber können z.B. durch eine Kombination aus operativer Sanierung und Oxaliplatin-basierten Chemotherapie Überlebenszahlen von bis zu 8 Jahren erreicht werden.

### 1.8 Calcium und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1)

Das Calcium und Integrin-bindende Protein 1 (CIB1, Calmyrin, KIP, SIP2-28) ist ein kleines, intrazelluläres und ubiquitär exprimiertes Protein und Teil einer Familie von 4 verwandten Proteinen (CIB1-4). CIB1 wurde im Jahr 1997 das erste Mal beschrieben. Es wurde bekannt als Bindungspartner für den zytoplasmatischen Teil des Integrins  $\alpha$ IIb, einem Teil des Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, und somit einem Plättchen-spezifischen Integrin [44]. Demnach wurde CIB1 initial eine Rolle in der integrinvermittelten Aggregation und Adhesion von diversen Zellen zugeordnet.

Die strukturellen Eigenschaften von CIB1 als Calcium-bindendes Protein sind nahe verwandt den Strukturen von Calcineurin B und Calmodulin [45]. So verfügt auch CIB1 über vier Helix-Loop-Helix EF-Hände, die aus 8 von den insgesamt 10  $\alpha$ -Helices gebildet werden. Trotz seiner eher geringen Größe liegt das molekulare Gewicht von CIB1 bei über 24 kDa [46]. Die beiden C-terminalen Enden sind für die Bindung von sowohl Calcium als auch von Magnesium verantwortlich [47, 48]. Außerdem kann CIB1 an seinem N-Terminus eine Myristoyl-Gruppe tragen, welche jedoch in ihrer Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [49].

Auf Grund dieser Eigenschaften kann CIB1 sowohl lösliche als auch transmembranöse Proteine binden und deren Funktion steuern und ist in einer Vielzahl physiologisch-zellulärer Prozesse involviert [50]. Wie schon erwähnt fand CIB1 zu Beginn Eingang in die Forschung im Kontext der Hämostase, der Thrombozytenaktivierung und der Gefäßwandfunktion [51]. Je tiefer sich die Forschung jedoch mit diesem kleinen Protein beschäftigte, desto größer erschien das Wirkspektrum. Nicht nur scheint CIB1 in die stressinduzierte Angiogenese involviert zu sein sondern spielt auch eine zentrale Rolle in der pathologischen Herzmuskelhypertrophie und zahlreichen weiteren nicht malignen Erkrankungen [52, 53].

Doch auch in den Bereich der Kanzerogeneseforschung fand CIB1 seinen Weg. So zeigen neue Studien, dass CIB1 in der Entstehung verschiedenster maligner Tumore involviert ist, meist in einer Rolle als Mediator. Zu diesen zählen, unter

anderem das Pankreaskarzinom, das hepatozelluläre Karzinom (HCC) und das KRK [54-56]. In diesem Zusammenhang spielt CIB1 eine Rolle in der Tumorprogression über eine Interaktion mit der Polo-like Kinase 3 (PLK3) und als Vermittler antiapoptotischer Signale von Sphingosein Kinase 1 (SK1) und nuclear factor kappa-light-chain-*enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) [54, 57]. Darüber hinaus fungiert CIB1 als Promotor erhöhter Spiegel von VEGF. Initiiert wird dies über eine Aktivierung von Protein Kinase D2 (PKD2) und über Pi3K/AKT und MEK/ERK *pathways*. Diese Signalwege führen letztlich zu einem verlängerten Überleben der Tumorzelle [58, 59]. Die wichtigsten Bindungspartner von CIB1 sind in Abbildung 7 noch einmal zusammengefasst.

Ein direkter Zusammenhang zwischen CIB1 und dem Prozess der Metastasierung des KRK ist bis heute nicht bekannt. Weder bezogen auf die Entstehung von Fernmetastasen beim KRK, noch in Verbindung zu dem Weg oder dem Ziel der Ferninvasion.

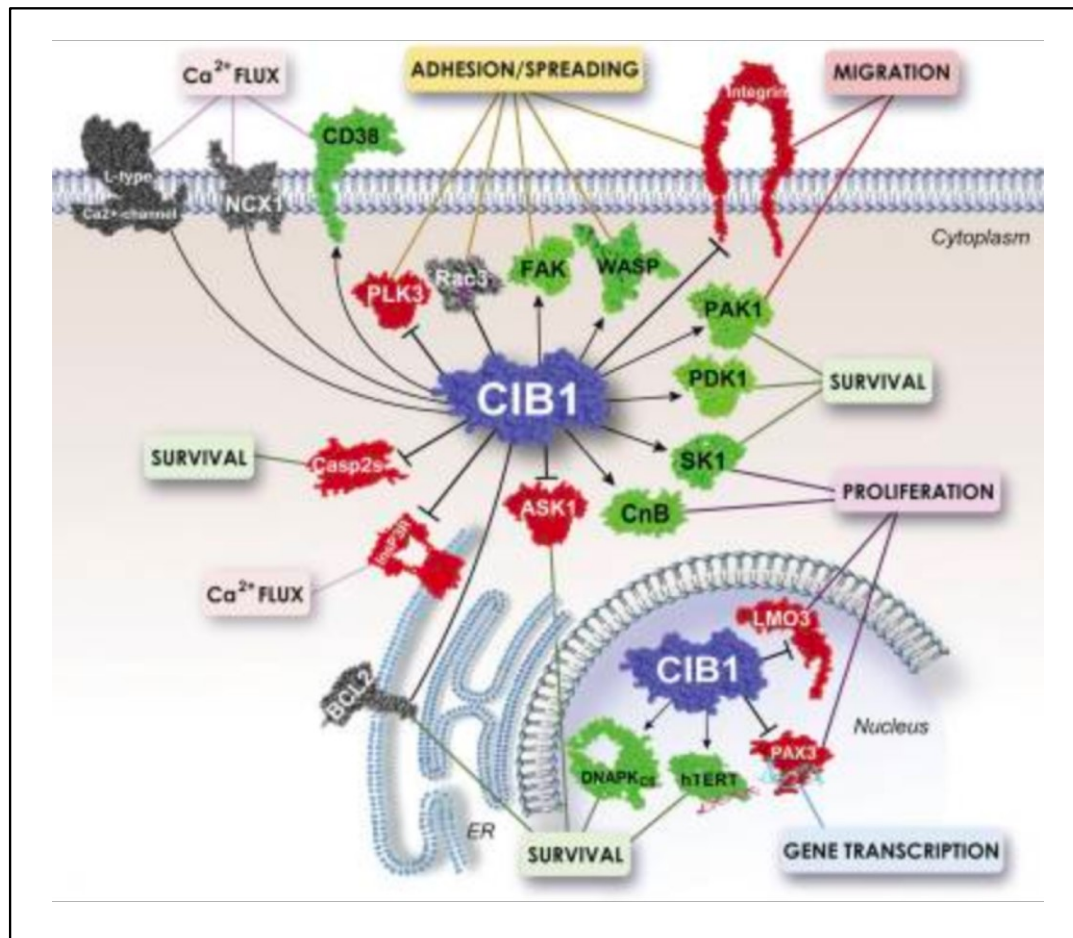


Abb. 7. Darstellung wichtiger Interaktionspartner von CIB1. Grün=Verstärkung durch CIB1, grau=unbekannter Mechanismus, rot=Inhibierung. BCL2=B-cell lymphoma 2, hTERT=human telomerase reverse transcriptase, WASP=Wiskott-Aldrich syndrome protein, Casp2s=caspase 2S, ER=endoplasmic reticulum, DNA-PKCS=DNA-protein kinase catalytic subunit, FAK=focal adhesion kinase. Kopie aus [48].

## 1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Promotionsarbeit

Das KRK ist nach wie vor eine der häufigsten, malignen Tumorerkrankungen weltweit [2]. So ist das KRK für 600000 Tote jedes Jahr verantwortlich [1]. Der Faktor, der das Überleben der Patienten und die bereitstehenden Therapieoptionen am stärksten beeinflusst, ist die Metastasierung. Dabei ist wichtig zu bemerken, dass über 20% der Patienten bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen aufweisen und weitere 60% in den nächsten fünf Jahren metastasieren werden [41, 42]. Die hämatogene Aussaat in die Leber (bei 33% der Patienten) und die Invasion des Peritoneums (bei 25-30% der Patienten) stellen diesbezüglich sowohl die häufigsten als auch einflussreichsten Ziele einer Metastasierung dar [60, 61]. Gleichzeitig werden die Therapieoptionen von Patienten mit einem solchen Metastasierungsmuster deutlich eingeschränkter und komplexer.

Über die letzten Jahre wurden jedoch deutliche Fortschritte in der multidisziplinären Behandlung dieser Patienten gemacht. Große Leberresektionen, Verbesserungen in der Systemtherapie, zytoreduktive Eingriffe und hypertherme, intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) stellen nennenswerte Beispiele dar [62, 63]. Nichtsdestotrotz ist eine Heilung für KRK-Patienten des Stadium IV nicht gelungen und 80% dieser Patienten versterben innerhalb der ersten fünf Jahre nach Erstdiagnose [64, 65]. Demzufolge ist es von imperativer Bedeutung, den Prozess der Metastasierung genau zu beleuchten und relevante genetische Veränderung auszuarbeiten. Erst dann bietet sich die Chance, sowohl sensitivere diagnostische *tools* wie neue Biomarker und „*liquid biopsies*“ als auch effektive *follow-up* Mechanismen zu entwickeln. Gleichzeitig kann sich so vielleicht die Tür zu weiteren Bauteilen einer personalisierten Therapie wie zum Beispiel mit immunotherapeutischen Antikörpern öffnen.

In diesem Kontext ist das Ziel dieser Arbeit, die RNA-Expression multipler Onkogene und Tumorsuppressorgene, welche eine Assoziation mit den verschiedenen Metastasierungsmustern des KRK aufweisen, zu untersuchen. Grundlage dafür ist eine RNA-Expressionsanalyse von lokal fortgeschrittenen KRK ohne Fernmetastasierung (M0), KRK die zu einem Befall der Leber (HEP)



führen, diejenigen KRK, die ausschließlich eine Invasion des Peritoneums (PER) zeigen und von KRK die sowohl die Leber als auch das Peritoneum (HEP/PER) befallen. Nach multidimensionaler Analyse der RNA-Expressionsprofile der Gruppen M0, HEP und PER werden signifikant unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich M0 vs. HEP und M0 vs. PER näher beleuchtet. Das erfolgversprechendste Gen wird weiter an einem vergrößerten Kollektiv mittels immunhistochemischer Färbung validiert. Anschließend folgen Korrelationsanalysen zu verschiedensten klinisch-pathologischen Variablen.

Ziel ist es, Marker zu finden, die in den Metastasierungsweg von KRKmen sowohl involviert sind als auch diesen adäquat prognostizieren können. Auf diese Weise kann man zum ein lokal fortgeschrittenes, nicht metastasiertes KRK effektiv Nachsorgen und risikostratifizieren. Zum anderen bietet sich die Möglichkeit, bereits metastasierte KRK frühzeitig zu erkennen und zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Vorarbeit der Forschungsgruppe

Der experimentelle Teil der Rohdatenerfassung der RNA-Expression der vier in dieser Dissertation weiter untersuchten Gruppen M0, HEP, HEP/PER und PER ist als Vorarbeit unserer Forschungsgruppe entstanden. Der Ablauf wird im Folgenden beschrieben. Von jeweils sechs Patienten aus den oben genannten Gruppen wurde von in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPEs) RNA isoliert. Nach Bereinigung wurde die mRNA-Expressionsrate mittels des NanoString nCounter FLEX Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, USA) erfasst. Anschließend wurde die RNA mit dem PanCancer Progression Panel CodeSet (NanoString Technologies, Seattle, USA) hybridisiert [66]. Dieses Panel umfasst 770 Gene inklusive 30 Referenzgene welche mit der Entstehung, der Progression und der Metastasierung von Karzinomen assoziiert sind. Als Beispiele dienen Stoffwechsel in hypoxischer Umgebung, EMT, Angiogenese, Invasion und Interaktion in die und mit der EZM. So entstanden Rohdaten der RNA-Expression spezifisch für jede Subgruppe. Diese wurden in dieser Dissertation analysiert, dann charakterisiert und im Verlauf validiert.

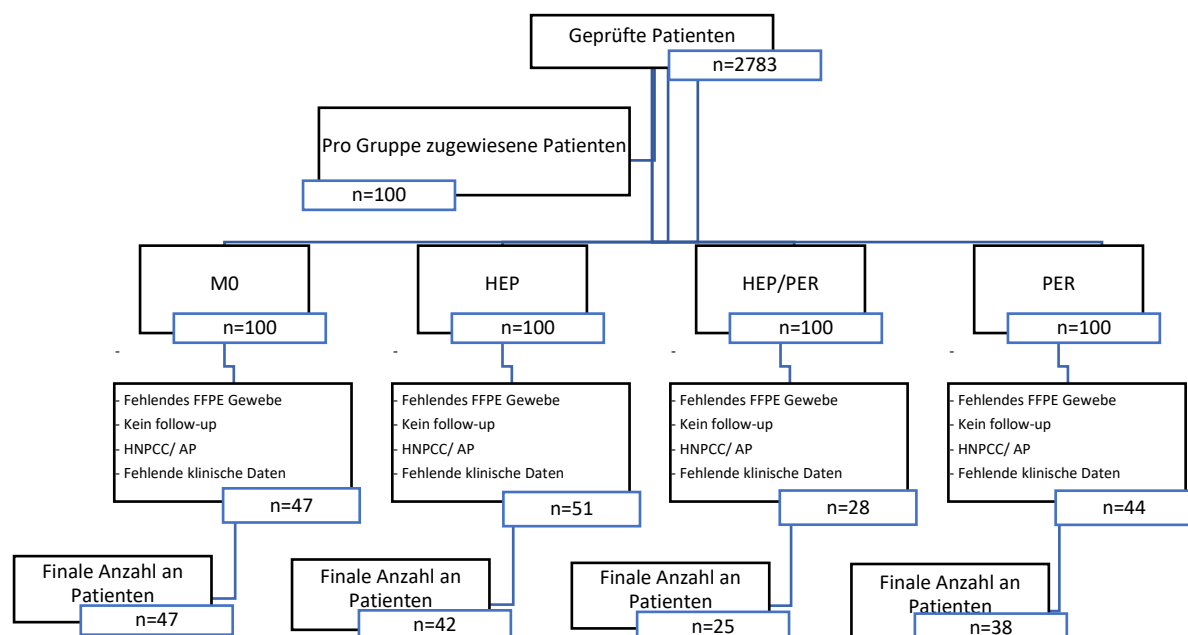
Involviert waren zum Einen Kollegen des Instituts für Pathologie der Ludwig-Maximilian Universität München (München, Deutschland), namentlich vor allem Prof. Dr. Jens Neumann und Dr. Jörg Kumbrink. Zum anderen meine Kollegen aus der Klinik für Allgemein, Viszeral und Transplantationschirurgie der Ludwig-Maximilian Universität München (München, Deutschland), PD Dr. Florian Bösch und Prof. Dr. Martin Angele.

## 2.2 Erarbeitung des Patientenkollektivs und der Gewebebank

Die zugrundeliegende Dissertation ist sowohl eine retrospektiv-klinische als auch experimentelle Fall-Kontrollstudie. Der verwendete Datensatz ist an der Klinik für Allgemein, Viszeral und Transplantationschirurgie der Ludwig-Maximilian Universität München (München, Deutschland) erarbeitet und gepflegt worden. Alle Patienten, die zwischen 2004 und 2015 an einem KRK operiert worden sind, fanden Eingang in die primäre Zusammensetzung des Kollektivs. Im Anschluss an die initiale Patientenauflistung wurden die Patienten in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, M0, besteht aus Patienten, die an einem lokal fortgeschrittenen KRK (T3,4) leiden, jedoch keinerlei Fernmetastasen aufweisen. Die Gruppe HEP schließt Patienten ein, die im Rahmen ihres KRK synchrone oder metachrone Lebermetastasen aufwiesen, bei denen jedoch das Peritoneum nicht befallen war. Die Gruppe PER beschreibt Patienten, bei denen ausschließlich das Peritoneum angegriffen wurde, die also unter einer Peritonealkarzinose leiden. Die Patienten der vierten Gruppe, HEP/PER, zeigen sowohl eine Invasion der Leber als auch des Peritoneums. Bei allen Patienten wurde im Sinne der Korrektheit der Gruppeneinteilung als Minimum ein striktes fünf-Jahres *follow-up* eingehalten.

Als nächstes wurde jeder dieser vier Gruppen 100 Patienten aus dem geprüften Gesamtkollektiv blind und randomisiert zugordnet. Für diese 100 Patienten wurden sodann klinische und pathologische Variablen ermittelt und tabellarisch erfasst. Zu diesen zählen unter anderem aktualisierte Überlebensdaten, Tumorgröße, postoperative Tumorklassifikation und der Therapieverlauf inklusive Operation. Für die Erhebung dieser Informationen wurde die digitale Patientenakte sowie für ältere Fälle noch vorliegende Akten in Papierform verwendet. Außerdem wurde zu jedem Patienten das zugehörige FFPE Tumorgewebe des Primarius aus dem pathologischen Archiv identifiziert. Im Anschluss wurde das Gesamtkollektiv auf Vollständigkeit der Daten überprüft. Patienten mit hereditären Erkrankungen wie einer FAP oder HNPCC sowie jedweder anderer maligner Erkrankung wurden aus dem Panel entfernt. Ebenso nicht weiter berücksichtigt wurden diejenigen Patienten, bei denen kein oder nicht genügend FFPE vorhanden war.

Unter Berücksichtigung aller erwähnten Voraussetzungen ist also ein Kollektiv entstanden, welches sich aus 47 Patienten in der Gruppe M0, 51 Patienten in der Gruppe HEP sowie jeweils 44 und 28 Patienten in den Gruppen PER und HEP/PER zusammensetzt. Die Gesamtheit des Kollektivs und die ermittelten Patienteninformationen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Nun wurde der gesamte Datensatz irreversibel anonymisiert und kodiert sodass die weitere experimentelle Arbeit blind und ohne Patientennamenkenntnis fortgesetzt wurde. Der Arbeitsflow ist gemäß den CONSORT-Richtlinien in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Die Studie wurde gemäß den Empfehlungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität München durchgeführt. Die Recherche der gesamten Arbeit folgte der Deklaration von Helsinki aus dem Jahre 1975. Die Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilian Universität stimmte dem Studienplan mit dem Ethik-Votum 19-996 zu.



**Abb. 8: CONSORT-flow chart. Von Erstellung der Datenbank bis zum finalen Kollektiv.**

Variable	MO n (%)	HEP n (%)	PER n (%)	HEP/PER n (%)	p-Wert
<b>Anzahl Patienten</b>	47	51	44	28	
<b>Mittleres Alter</b>	66	65	67	61	0,55
<b>Geschlecht</b>					
weiblich	20 (44,0)	24 (47,0)	23 (52,5)	13 (46,0)	0,36
männlich	27 (56,0)	27 (53,0)	21 (47,5)	15 (54,0)	
<b>Lokalisation PT</b>					
Rechtes Kolon	15 (27,8)	15 (28,9)	17 (38,5)	10 (35,8)	0,8
Linkes Kolon	32 (72,2)	36 (71,1)	27 (61,5)	18 (64,2)	
<b>UICC initial</b>					
I	17 (36,0)	1 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,00011
II	11 (23,5)	3 (5,9)	4 (9,0)	2 (7,1)	
III	19 (40,5)	6 (1,8)	14 (31,0)	4 (14,3)	
IV	0 (0,0)	41 (89,4)	26 (60,0)	22 (78,6)	
<b>pT</b>					
pT1	11 (23,5)	2 (2,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,031
pT2	10 (21,3)	4 (7,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	
pT3	22 (47,0)	41 (82,0)	12 (27,3)	15 (53,5)	
pT4	4 (7,2)	4 (7,8)	32 (72,7)	13 (46,5)	
<b>pN</b>					
N0	29 (61,7)	17 (33,3)	9 (20,5)	5 (18,0)	0,002
N1	11 (23,5)	16 (31,2)	17 (38,5)	6 (13,6)	
N2	7 (14,8)	18 (35,5)	18 (41,0)	17 (68,4)	
<b>Grading</b>					
Low grade	29 (61,7)	29 (56,9)	22 (50,0)	17 (60,8)	0,7
High grade	18 (38,3)	22 (44,1)	22 (50,0)	11 (39,2)	
<b>Zeitpunkt der Metastasierung</b>					
Synchron	n.a.	41 (89,4)	n.a.	22 (78,6)	0,5
Metachron	n.a.	10 (10,6)	n.a.	6 (22,4)	
<b>Tumorperforation</b>					
ja	0 (0,0)	3 (5,9)	4 (9,1)	10 (35,7)	0,0002
nein	47 (100)	48 (94,1)	40 (90,9)	18 (64,3)	

**Tabelle 6: Klinisch-pathologische Patienteninformation. (PT=Primärtumor; UICC= union for international cancer control, G=grading; T=Tumorgröße; N=Lymphknotenstatus; n.a.=nicht anzuwenden).**

## 2.2 Material

### 2.2.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Alle benutzten Materialien und Chemikalien sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Material	Hersteller
CIB1 rabbit polyclonal antibody	Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden
Aqua Bidest.	H. Kemdl GmbH, Feldkirchen, D
Collecting Tubes 2ml	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
DAB+ system	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
H2O (steril)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Handschuhe	Anwen GmbH, Schloß Holte-Stukenbrock, Deutschland
Hematoxylin Gill's Formula	Vector Laboratories, Burlingame, CA
ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Objektträger	Menzel-Gläser SuperFrost Ultra Plus Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reinst. Ethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Skalpelle	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Tubes 0,2, 0,5, 1,5	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIZMA® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aqua dest.	H. Kemdl GmbH, Feldkirchen, Deutschland
TRIZMA® hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

**Tabelle 7: Darstellung aller gebrauchten Materialien und Chemikalien.**

### 2.2.2 Geräte

Tabelle 8 umfasst eine Auflistung aller für diese Arbeit verwendeten Geräte sowie den Produkthersteller.

Geräteart	Produkthersteller
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Pro Taqs V Antigen Enhancer	Quartett, Berlin, Germany

**Tabelle 8: Darstellung aller verwendeten Geräte.**

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Präparation und Durchführung der Immunhistochemie

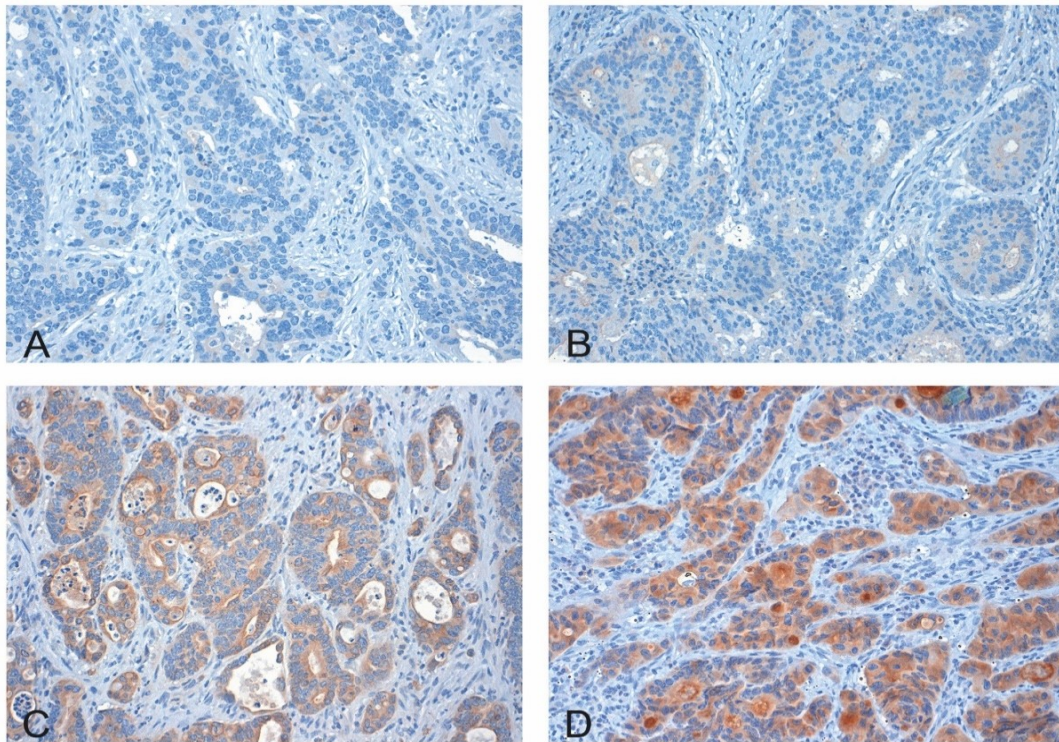
Der Färbeprozess dieser Arbeit beruht ausschließlich auf den oben genannten FFPEs der Primarien von KRK. Pro Tumorblock wurde mit Hilfe eines Mikrotoms eine Schnittserie von 20 5µm dicken Schnitten erstellt, welche anschließend jeweils auf einen Objektträger aufgetragen wurden. Nach Entparaffinierung der Präparate in einer Alkoholreihe (3 mal 10 Minuten in Xylol 100%ig gefolgt von 3 mal 10min in Ethanol 100%ig) und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte auf Vorhandensein von ausreichend Tumorgewebe überprüft. Anschließend wurden die Schnitte von Prof. Neumann (JN) überprüft, validiert und das Tumorgewebe markiert.

Um CIB1 im Folgenden immunhistochemisch zu färben wurde der rabbit polyclonal antibody (Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden) verwendet. Die initiale Darstellung der Antigene erfolgte hitzeinduziert. Dafür wurden die Schnitte mit dem Pro Taqs V Antigen Enhancer (Quartett, Berlin, Germany) erhitzt. Die endogene Peroxidase wurde mittels Wasserstoffperoxid 7,5%ig ausgeschaltet. Nun werden die Primärantikörper hinzugefügt. Diese wurden in einer Dilution von 1:80 aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit TRIS-Puffer bevor die Schnitte weiter behandelt wurden. Es wird das Detektionssystem *ImPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) als sekundärer Antikörper aufgebracht. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das DAB+ System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) als Chromogen verwendet. Die Gegenfärbung und Benetzung erfolgte mit der Hematoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories, Burlingame, CA) und Gelatine aus Glycerin.

### 2.3.1 Bewertung und scoring der Immunhistochemie

Nach Verblindung der gesamten Präparate auf Gruppenzugehörigkeit wurden die Schnitte von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern mikroskopiert. Anschließend wurden die Resultate miteinander verglichen. Bei Diskrepanzen der Ergebnisse wurde unter einem mehrköpfigen Mikroskop eine erneute, gemeinsame Untersuchung durchgeführt und ein Konsens erreicht. Jeder Tumorregion eines Schnittes wurde ein Intensitätsscore zugeteilt, welcher von 0 bis maximal 3 reichen kann. In diesen Fällen beschreibt 0 keine Expression (Abb. 9 A), 1 eine schwache Expression von CIB1 (Abb. 9 B), 2 eine moderate Ausprägung (Abb. 9 C) und 3 eine starke Anfärbung (Abb. 9 D). Da jeder Tumor auf den einzelnen Schnitten unterschiedliche Areale mit unterschiedlicher Färbungsintensität aufwies, wurde zusätzlich jedes Areal mit seiner angefärbten Intensität in Proportion zur Gesamttumorfläche auf dem Schnitt gestellt. Dies geschah in 5% Schritten auf einer Bandbreite von 0-100. So ließ sich ein finaler Immunoscore (H-score, von null bis 300) berechnen indem man jeden einzelnen Intensitätsscore mit der zugehörigen, gefärbten Fläche multipliziert. Diejenigen Fälle, die einen H-score über dem Median von 105 aufwiesen, wurden als *high-grade* eingestuft, darunter als *low-grade* [67]. Abbildung 9 präsentiert exemplarisch alle 4 beobachteten Färbungsintensitäten.





**Abb. 9: Immunhistochemische Färbung von CIB1: Adenokarzinom des Kolos mit (A) abwesender, (B) schwacher, (C) moderater und (D) starker Expression (Vergrößerung 200-fach).**

## 2.4 Statistische Analyse

Die verschiedenen RNA-Expressionswerte, welche mittels des nCounter® PanCancer Progression Panels von NanoString-Technologies (Hamburg, Germany) ermittelt worden sind, wurden tabuliert. Expression und Signifikanz wurden mit dem NanoString Technology *software package* nSolver4.0 (2017) berechnet. Die unterschiedlichen Gensignaturen der vier Subgruppen wurden mittels einer Principal Component Analyse (PCA) exploriert und sind in dem PCA-Schaubild in Abbildung 10 dargestellt. Fehlende input-Variablen wurden mit dem *missing-forest* Algorithmus kalkuliert. Der Genexpressionsvergleich zwischen M0 vs. HEP und M0 vs. PER wurde durch eine *one-way* ANOVA Analyse vollzogen. Expressionswerte aller Gene samt Signifikanz und *fold-change* sind in Vulcanoplots und signifikant unterschiedlich exprimierte Gene in den *heat-maps* in Abbildung 10 dargestellt. Die ermittelten Immunoscores aller vier Gruppen sowie die Korrelation selbiger mit den klinisch-pathologischen Variablen wurden über zweiseitige  $X^2$ -Tests, student's T-tests und one-way Anova-Analysen mit der Bonferroni-Korrektur für mehrfache Tests verglichen und korreliert. Die Analyse wurde mittels RStudio (Version 3.2.6, RStudio Inc., USA), SPSS v 20.1 für Mac (IBM Corp., Armonk, NY) und Prism 8.0 für Mac (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) durchgeführt. Über die gesamte Arbeit ist gekennzeichnet worden, ob Ergebnisse als Mittelwerte oder über den Median mit jeweils zugehörigem Standardfehler (*StDev*) dargestellt worden sind. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant und p-Werte kleiner 0,001 als hoch signifikant anerkannt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Kohorte

Die klinisch-pathologischen Variablen sind gemäß den Richtlinien der WHO aus 2019 und der TNM-Klassifikation maligner Tumore aus 2018 in Tabelle 6 aufgelistet [68, 69]. Das finale Panel bestand aus 170 Patienten. Von diesen gehörten 47 der Gruppe M0 an, 51 der Gruppe HEP, 44 waren als PER klassifiziert und weitere 28 als HEP/PER. Um die Gruppen möglichst homogen zu halten, wurden konsequent nur Patienten mit einem 5-Jahres *follow-up* eingeschlossen. Zwischen allen 4 Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied im mittleren Alter welches zwischen 61 und 66 Jahren lag ( $p > 0,05$ ). Von allen eingeschlossenen Patienten waren 80 männlichen Geschlechts und 90 weiblich ( $p > 0,05$ ). Ebenfalls homogen in allen Gruppen beobachtet war die Lokalisation des Primarius, welcher bei 67% aller Patienten im linken Hemikolon gefunden wurde. In der Subgruppe HEP/PER wiesen 36% der Patienten eine Perforation der Serosa auf, was in M0 nie, in HEP zu 65% und in PER nur zu 9% beobachtet wurde. Unter den Patienten mit Lebermetastasen wiesen 78% ein Tumorstadium T3 auf. Bei den Karzinomen, die mit einer Peritonealkarzinose einhergingen entsprachen nur 27,8% dem Tumorstadium T3, 72,5% entsprachen dem Status T4. Was den Befall von Lymphknoten angeht, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen. Von den Patienten mit einem Befall der Leber waren 89,4% bei Erstdiagnose bereits dem UICC Stadium IV zuzuordnen, also synchron hepatisch metastasiert. In PER waren dies nur 60% und in HEP/PER 78,6%.

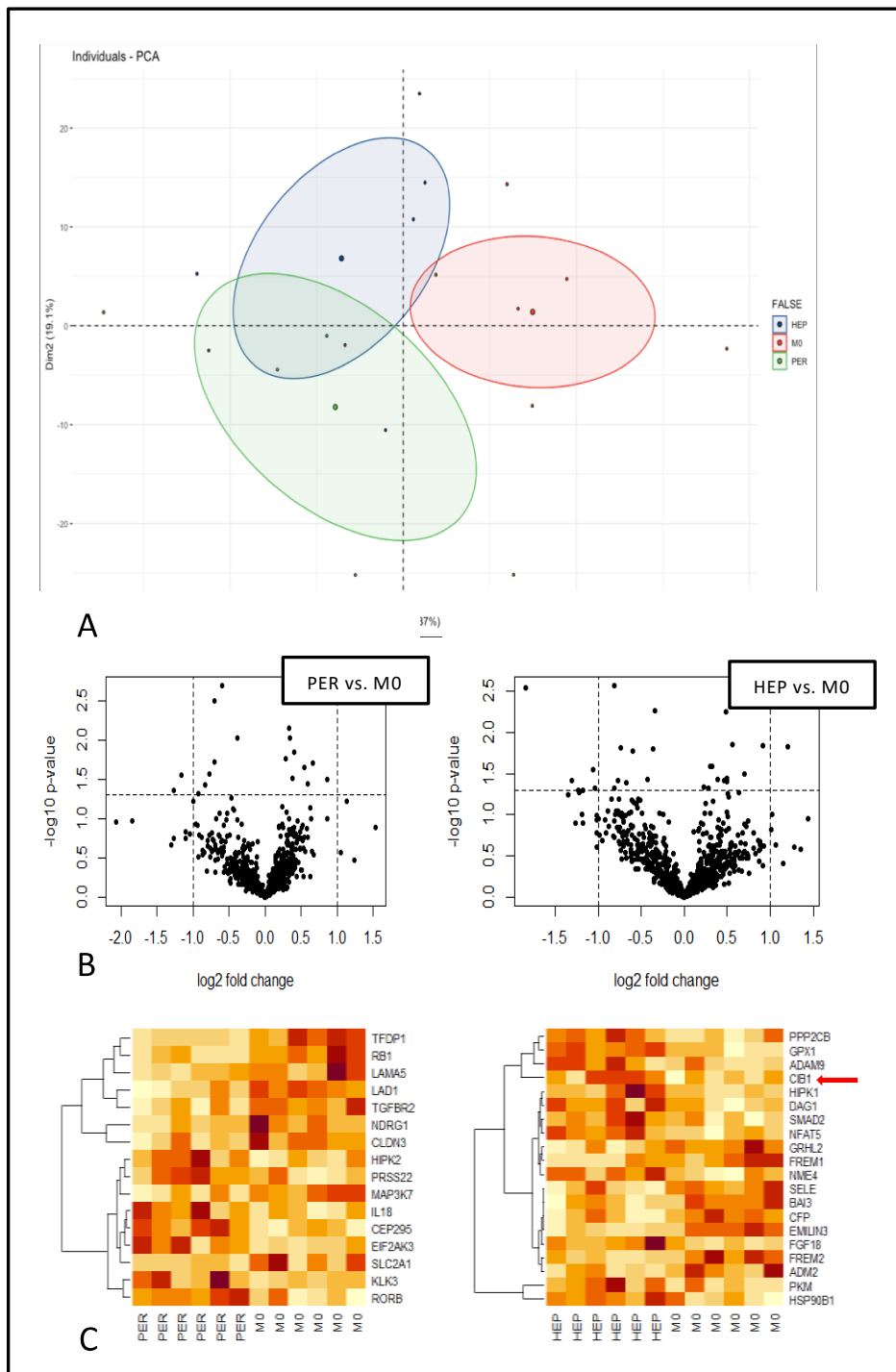
### 3.2 Auswertung der NanoString nCounter Expressionanalyse

Um die linearen Genexpressionswerte der Gruppen M0, HEP und PER, welche mittels des PanCancer Progression Panel Code Sets (NanoString Technologies, Seattle, USA) gewonnen wurden, genauer miteinander zu vergleichen und eine Aussage über die Gensignaturen der einzelnen Gruppen treffen zu können, wurde eine PCA verwendet. In dieser wurde sich auf das *cluster*-Muster jeder Gruppe für sich fokussiert. Die Cluster beschreiben letztlich die Ausprägung jedes einzelnen Genes und die Ähnlichkeit des Ausprägungsmusters der zu einem Cluster gehörenden Gene. Der Plot der PCA ist in Abbildung 10A dargestellt. Wie anhand der kolorierten, ovalen Strukturen (Expressionswolken) zu erkennen, hat jede Subgruppe eine sehr spezifische Ausprägung der einzelnen Gene mit enger Nähe zueinander. Gleichzeitig zeigen die Gruppen M0, HEP und PER nur marginale Querschnittspunkte ihrer Expressionswolken. Es gibt nur wenig Raum, in dem sich das Ausprägungsmuster einzelner Gene der jeweiligen Gruppen überschneidet. Das unterstreicht die Hypothese, dass Tumore mit unterschiedlichen Metastasierungsmustern unterschiedliche Gensignaturen haben.

Die Vulcanoplots in Abbildung 10B stellen graphisch den Vergleich der Gruppen M0 vs. HEP und M0 vs. PER dar. Jedes Gen ist in Form eines Punktes gekennzeichnet und mit seinem *fold-change* im Vergleich zu M0 und der zugehörigen Signifikanz repräsentiert. Die aus diesem Vergleich als signifikant unterschiedlich exprimiert hervorgehenden Gene sind abschließend in den *heat-maps* in Part C der Abbildung 10 illustriert. Insgesamt ließen sich in dem Vergleich HEP vs. M0 20 signifikant unterschiedlich ausgeprägte Gene herausarbeiten. Der *fold-change* reichte von -3,58 bis zu +2,31. In PER vs. M0 kristallisierten sich 18 Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert hervor, der *fold-change* reichte von -2,4 bis +1,81. Für beide Vergleiche wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 vorausgesetzt.

Mit einem Mittelwert von 2219,18, einem Minimum von 1.769,57 und einem Maximum von 2.219,18 war CIB1 das am homogensten signifikant überexprimierteste Gene ( $p < 0,002$ ) in HEP im Vergleich zu M0. Da diskutiert wird, dass CIB1 in der Entstehung und Progression von verschiedensten,

intestinalen Tumoren eine Rolle spielt [50], wurde es zur weiteren Charakterisierung und immunhistochemischen Validierung in einem vergrößerten Kollektiv ausgewählt.



**Abb. 10: Genexpressionsanalyse aller vier Subgruppen präsentiert in (A) einer Principal Component Analyse, (B) Volcanoplots mit allen Genen inklusive Signifikanz und *fold-change* und (C) *heat-maps* aller signifikanten Gene: dunkelrot=starke Expression, Orange=semi-starke Expression, Weiß= schwache Expression. CIB1 ist mit einem roten Pfeil markiert.**

### 3.3 Beurteilung der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Validierung des Markers CIB1 zeigte eine signifikante Korrelation zwischen CIB1 und dem Metastasierungsprofil. Die Expression von CIB1 korreliert hoch signifikant mit dem Vorhandensein von Lebermetastasen ( $p < 0,001$ ), nicht jedoch mit der Ausbildung einer Peritonealkarzinose. Der mittlere H-score in der Gruppe der KRK mit hepatischen Metastasen lag bei 145,2. Mit einem minimalen H-score von 80 und einem Maximum von 250 wurde eine Ausprägungsweite von 170 beobachtet. In der Gruppe M0 lag der Mittelwert bei 83,09. Der beobachtete Mittelwert des H-scores in PER war mit 47,73 (Minimum 5, Maximum 140, *range* 135) noch deutlich niedriger als in M0 ( $p < 0,001$ ). In der Gruppe HEP/PER lag der Mittelwert bei 55, der Minimalwert bei 45, der Maximalwert bei 200 und die Ausprägungsweite betrug somit 155. Tabelle 9 fasst die statistische Aufarbeitung zusammen.

<b>Anzahl der Beobachtungen</b>	47	51	28	44
<b>Minimum</b>	10	80	45	5
<b>Maximum</b>	180	250	200	140
<b>Range</b>	170	170	155	135
<b>95% CI des Medians</b>				
Eigentliches confidence level	96,00%	97,25%	98,08%	95,12%
Unteres confidence limit	45	130	120	20
Oberes confidence limit	110	155	170	45
<b>Mean</b>	83,09	145,2	140	40,23
<b>Std. Deviation</b>	47,73	38,95	43,81	35,97
<b>Std. Error of Mean</b>	6,962	6,084	8,431	5,423

**Tabelle 9: Zusammenfassung der statistisch-deskriptiven Auswertung der Immunhistochemie.**

Die Ausprägungs- und Signifikanzverhältnisse zwischen den Mittelwerten aller 4 Gruppen zueinander ist in Abbildung 11 präsentiert.

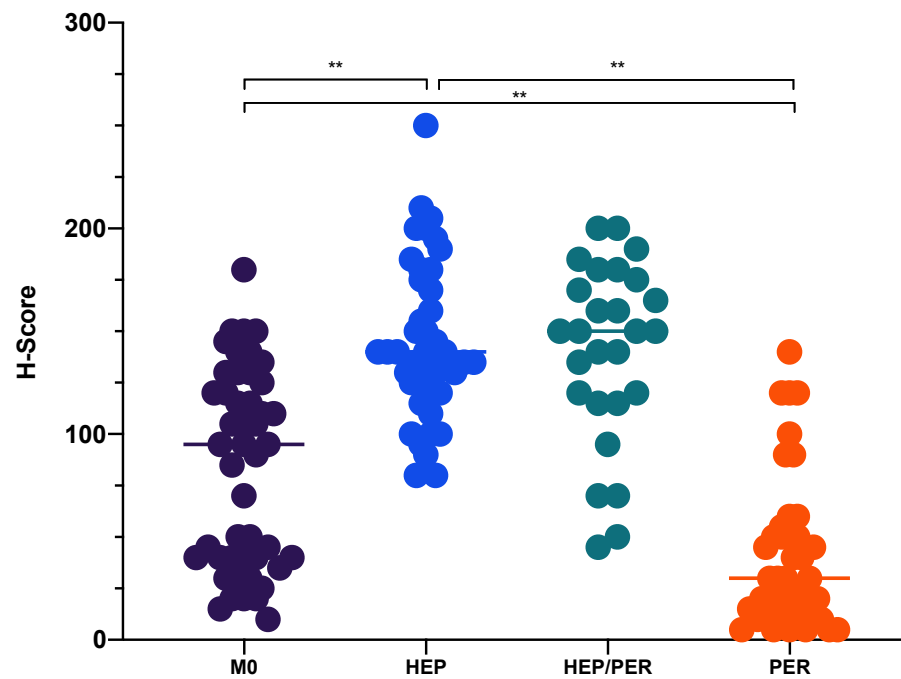


Abb. 11. Verteilungsmuster CIB1-Expression in allen vier KRK-Subgruppen. \*\*p-Wert<0.001.

Um die Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen genauer zu beleuchten wurde jeder H-score in einem weiteren Schritt als *high* bzw. *low* klassifiziert. Als Benchmark wurde der *overall* Median von 105 verwendet. In der Gruppe HEP wurden 73% der H-scores als *high* klassifiziert. Im Vergleich dazu wurden in MO nur 38,3 % als *high*, in PER 9,1% und in HEP/PER 78,6% als *high* eingestuft. Eine one-way Anova-Analyse zeigte einen Gruppenunterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,0001$ . Die Datenerhebung ist in Tabelle 10 repräsentiert, Abbildung 12 zeigt graphisch den Vergleich.

H-score range	MO (%)	HEP (%)	HEP/PER (%)	PER (%)	X2
0	0	0	0	6	
20	6	3	1	15	
40	12	2	1	9	
60	2	2	1	7	
80	2	2	2	0	
100	7	5	1	3	
120	7	6	4	3	
140	7	13	3	1	
160	3	5	7	0	
180	1	5	5	0	
200	0	5	2	0	
220	0	1	0	0	
240	0	1	0	0	
260	0	1	1	0	
high	18 (38,3)	37 (72,5)	22 (78,6)	4 (9,1)	$p < 0,0001$
low	29 (61,2)	14 (27,5)	6 (21,4)	40 (90,9)	$p < 0,0001$

**Tabelle 10: Zusammenfassung der statistisch-deskriptiven Auswertung der H-score Klassifikation high vs. low.**



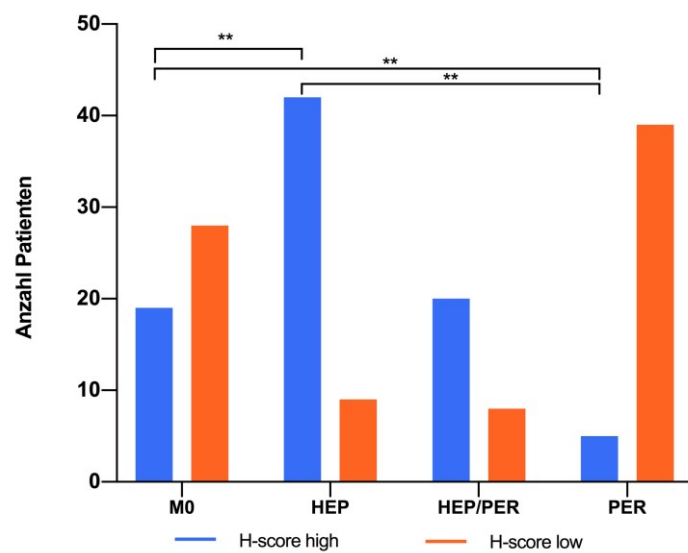


Abb. 12: Verteilungsmuster der CIB1-Expression nach Klassifikation in high vs. low \*\*p-value<0.001.

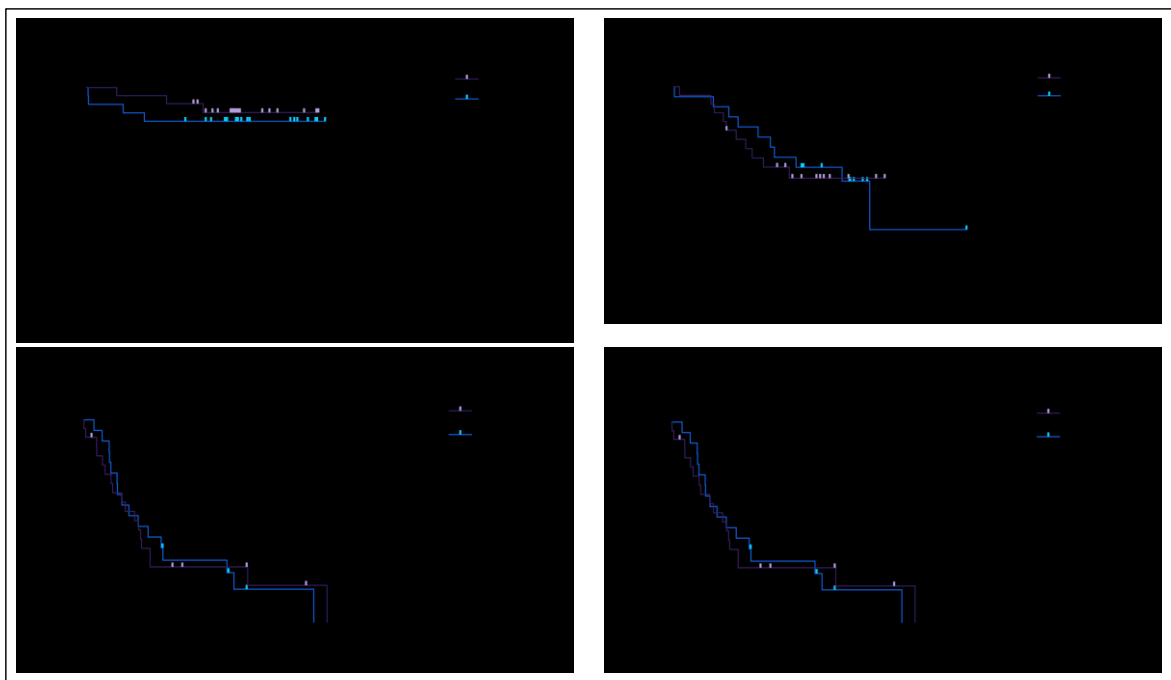
### 3.4 Korrelation zu klinisch-pathologischen Variablen

Um festzustellen, ob es Zusammenhänge zwischen der Expression von CIB1 und der Ausprägung klinisch-pathologischer Variablen gibt, wurde zum einen eine Überlebensanalyse erstellt, zum anderen eine Korrelationsmatrix. In dieser wurde die Expression von CIB1 nach Klassifikation in *high* und *low* mit dem Alter, Geschlecht, T-Status, N-Status und der Tumorgraduierung korreliert (Tabelle 11). Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ausschließlich zwischen dem H-score und dem T-Status. Die Expression von CIB1 korreliert positiv mit dem Status T3 ( $p < 0,05$ ).

Variable	Total	Low	High	p-Wert
<b>Alter</b>				0,57
< 65	77 (45,2)	41 (48,1)	36 (42,3)	
≥65	93 (54,8)	44 (51,9)	49 (57,7)	
<b>Geschlecht</b>				0,81
männlich	90 (53,0)	43 (50,6)	46 (53,8)	
weiblich	80 (47,0)	42 (49,4)	39 (46,2)	
<b>T-status</b>				0,018
T1	14 (6,9)	10 (9,2)	6 (4,2)	
T2	15 (7,5)	9 (7,9)	8 (8,3)	
T3	89 (54,1)	34 (40,8)	49 (65,3)	
T4	52 (31,4)	35 (42,1)	19 (22,2)	
<b>N-status</b>				0,062
N0	59 (34,8)	29 (35,1)	226 (32,9)	
N1	49 (28,6)	30 (26,4)	18 (21,9)	
N2	62 (36,6)	24 (28,6)	35 (45,2)	
<b>Grade</b>				0,65
Grade 1	9 (3,8)	7 (5,3)	5 (2,8)	
Grade 2	89 (54,1)	44 (53,9)	44 (55,6)	
Grade 3	69 (41,5)	34 (40,8)	32 (40,3)	
Grade 4	3 (0,6)	0	4 (1,4)	
5-Jahres Überleben	66,40%	63,50%	69%	0,55
Mittleres Überleben	5,3 Jahre	5,2 Jahre	5,4 Jahre	

**Tabelle 11. Korrelation zwischen dem Expressionsgrad von CIB 1 (high vs. low Expression) und klinisch-pathologischen Parametern.**

Für die Überlebensanalysen wurden die einzelnen Subgruppen anhand ihres medianen CIB1-Expressionswertes in zwei Gruppen unterteilt. Das Überleben der Patienten mit hoher CIB1-Expression (über 105) wurden mit dem Überleben von Patienten mit einem niedrigen CIB1-Wert kleiner 105 verglichen. In den Überlebensbeobachtungen ließ sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen M0, HEP, HEP/PER und PER zeigen. Die Kaplan-Meier Überlebenskurven werden in Abbildung 13 präsentiert. Die statistischen Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.



**Abb. 13: Überlebensanalysen aller vier Subgruppen anhand der CIB1-Expression. Einteilung nach CIB1-Median jeder Subgruppe M0, HEP, PER, HEP/PER.**

Subgruppe	Mittleres Überleben (M)	p-Wert
<b>M0</b>		
CIB1 high	62	0,3037
CIB1 low	65	
<b>HEP</b>		
CIB1 high	62	0,0622
CIB1 low	76	
<b>PER</b>		
CIB1 high	23	0,9664
CIB1 low	23	
<b>HEP/PER</b>		
CIB1 high	30	0,7463
CIB1 low	31	

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Überlebensanalyse von M0, HEP, PER und HEP/PER.**

**M=Monate**

#### 4. Diskussion

Das KRK ist, wie oben erwähnt, eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit, vor allem aber in westlichen Regionen [2]. Wenn Patienten ohne Fernmetastasen erstdiagnostiziert werden, lässt sich das kolorektale Karzinom gut und effektiv therapieren. Die Patienten haben in diesem Szenario hervorragende Überlebenschancen [62, 63]. Kommt es allerdings zu einer Invasion fernliegender Organe wie der Leber oder dem Peritoneum, fallen die Überlebenschancen deutlich ab.

Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der Behandlung von solch komplexen Patienten erzielt. Die multidisziplinäre Therapie wurde um viele, zytotoxische, biologische oder immunotherapeutische Präparate erweitert. So wurden viele Patienten, welche initial nicht als resektabel galten durch präoperatives *down-staging* der Chirurgie zugänglich. Außerdem wurde das Portfolio von *second-line* Therapien deutlich erweitert [62, 63]. Auch die chirurgischen Fähigkeiten haben sich deutlich weiterentwickelt. So reicht das chirurgische Spektrum heutzutage von atypischen Leberresektion bis zu Hemihepatektomien. In vielen Fällen erfordert dies komplexe, zweiphasige Ansätze. In solchen Fällen werden in einem ersten Schritt im Sinne eines *in-situ splits* die Portalvenen ligiert oder interventionell embolisiert. Beides dient der Anregung der Hypertrophie des verbleibenden, gesunden Lebergewebes. Anschließend kann so ohne die Gefahr von zu wenig verbleibendem Lebergewebe eine erweiterte Hemihepatektomie durchgeführt werden. In vielen Fällen kann so makroskopisch Tumorfreiheit erreicht werden [70]. Auch die zytoreduktive Chirurgie mit konsekutiver HIPEC bei Patienten mit PK hat weitere Verbesserungen gebracht [71]. Obgleich dieser vielen Fortschritte lassen sich Patienten mit einem metastasierten KRK nach wie vor jedoch nicht kurativ therapieren. So kommt es mit Auftreten von Fernmetastasen zu einem rapiden Abfall der 5-Jahres Überlebensrate: fast 80% der Patienten mit Fernmetastasen sterben innerhalb der ersten 5 Jahre nach Erstdiagnose [64, 65].

Leider ist der klinische Verlauf von lokal fortgeschrittenen KRK wenig vorhersehbar. Patienten nehmen trotz ähnlicher Tumorstadien sehr

unterschiedliche Verläufe. Einige bleiben dauerhaft frei von Metastasen, andere entwickeln Leber-, Hirn,- oder Lungenmetasen, wieder andere leiden unter einer Peritonealkarzinose. Von einem klinischen und mechanistischen Blickwinkel aus gesehen sind diese Verläufe hoch interessant. Genauere Kenntnisse über die Tumorbiologie, die tumorinduzierte Angiogenese und den Organotropismus sind notwendig, um den Prozess der Metastasierung besser zu verstehen. Erst dann ist es möglich, neue Mediatoren, Biomarker oder aber auch Prädispositionen zu definieren, die sowohl mit dem Mechanismus als auch der Route der Fernmetastasierung assoziiert sind. Diese Marker sollten dann Eingang in die Risikostratifizierung von Patienten mit KRK finden. Darüber hinaus könnten so zum einen neue, primärdiagnostische aber auch *follow-up* Protokolle entwickelt werden, zum anderen die personalisierte, präzise zielgerichtete Medizin verbessert werden.

Dementsprechend war es das Ziel dieser Arbeit, die Gensignaturen der Gruppen M0, HEP, PER und HEP/PER als Kontrollgruppe näher zu beleuchten. Die PCA der Gruppen M0, HEP und PER zeigte ein sehr markantes Muster. Die Expressionswolken der einzelnen Gruppen sind in sich spezifisch definiert und präsentieren nur in sehr geringen Teilen Überschneidungen. Das unterstreicht die Hypothese unterschiedlicher Gensignaturen deutlich. Unter den signifikant unterschiedlich exprimierten Gene zeigte sich bei CIB1 eine homogene und signifikante Überexpression in der Gruppe HEP im Vergleich zu M0. Mit einem mittleren H-score in HEP von 145 verglichen mit einem Mittelwert von 83,1 in M0 und 40,23 in PER bestätigte die Validierung an dem vergrößerten Kollektiv diese Beobachtung auf einem Proteinniveau. Darüber hinaus wurden 72,3% aller mikroskopierten Schnitte in HEP als *high* eingestuft. Dem gegenüber stehen nur 38,3% in M0 und 9,1% in PER von Schnitten, die als *high* klassifiziert wurden.

Wie bereits erwähnt ist CIB1 als ein möglicher Promotor der Karzinogenese und Tumorprogression beschrieben [50]. So wird, unter anderem, eine Rolle als Mediator von onkogen verlängertem Zellüberleben, EMT, Inhibierung natürlicher Apoptose und erhöhter Signalspiegel von VEGF vermutet. Die potentielle Relevanz dieses kleinen Proteins wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass eine Überregulation von CIB1 in vielen Tumoren mit einer onkogenen

Veränderung von KRAS einher geht [72]. Gleichzeitig führen genetische Alternationen im RAS-Gen zu einer Überexpression von CIB1 und sind in über 35% aller Patienten mit KRK zu finden. [73]. Die aktuellen Ergebnisse könnten darüber hinaus darauf hindeuten, dass CIB1 ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung von Fernmetastasen und möglicher Metastasierungswege einnimmt. Es besteht also die Option, CIB1 als neuen Biomarker für die Detektion metachroner Lebermetastasen und follow-up Marker für Patienten nach Leberresektion zu verwenden. Interessanterweise konnte an Patienten, die unter akutem oder chronischem ischämischem Herzversagen leiden bereits gezeigt werden, dass CIB1 mittels *enzyme linked immunosorbent essays* (ELISA) effizient in Urinproben nachgewiesen werden. Dies kann vielversprechend auf KRK Patienten übertragen werden. So sollte im Rahmen einer Studie die CIB-1 Expression im Urin von Patienten ohne Lebermetastasen mit der Expression von Patienten mit Lebermetastasen, wohlbemerkt vor und nach Resektion, verglichen werden. Auf die Weise könnte sich ein neues Werkzeug entwickeln lassen, um nicht metastasierte Patienten auf Tumorprogress im Sinne einer neuen Metastasierung zu überprüfen.

CIB1 fungiert als Mediator von SK1, einem *downstream target* von RAS. SK1 ist ein Onkogen, welches die Transformationsraten und das Überleben von Tumorzellen deutlich steigern kann [74]. CIB1 ist federführend mit dafür verantwortlich, SK1 zu aktivieren. Durch die Calcium-Myristoyl *switch function* kann CIB1 SK1 an die extrazelluläre Membran translozieren. Dies versetzt SK1 in die Lage, das Produkt S1P zu produzieren indem es mit dem Sphingosine-1-Phosphate Rezeptor interagieren kann [75]. S1P wiederum wird aktuell vehement in seiner Rolle als Promotor der Metastasierung diskutiert, nicht zuletzt da in Patienten, die Lungenmetastasen haben, deutlich erhöhte S1P Spiegel nachgewiesen werden konnten [75]. Der Nachweis einer Korrelation von erhöhten Serum S1P und CIB1 Werten könnte im Sinne einer *liquid biopsy* von relevanter klinischer Bedeutung für die Detektion von Fernmetastasen und der Patientennachsorge sein. Gleichzeitig gibt es für S1P bereits den anti S1P Antikörper Sphingomab™, dessen Applikation bereits einen deutlichen Rückgang der Manifestation von Lungenmetastasen über eine Reduktion von S1P Werten zeigen konnte [76]. Der CIB1-SK1 Signalweg kann somit einen

interessanten Angriffsweg für die Bekämpfung von Lebermetastasen beim KRK sein.

Auch aus dem großen Themenbereich der epithelial-mesenchymal Transition ergeben sich interessante Aspekte bezogen auf die Rolle von CIB1 in der Metastasierung und potentieller therapeutischer Angriffspunkte. So zeigte neueste Literatur, dass CIB1 der *downstream* Mediator von PKD2 ist. Dieses wiederum führt zu deutlich erhöhtem Aufkommen mesenchymaler Marker wie SNAI1, einem Verlust von E-Cadherin über eine *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) induzierte epithelial-mesenchymale Transition [58]. Darüber hinaus ist PKD1 dafür bekannt, den PI3K/AKT Signalweg zu modifizieren. Dieser erhöht die Expression von ZEB und SNAIL, die direkte Inhibitoren von E-Cadherin sind und weitere Marker der EMT sind [8]. Wenn man Brustkrebszellen mit einem universellen pan-PDK Inhibitor behandelt, konnte ein signifikanter Rückgang an EMT-Markern wie Vimentin, *smooth muscle actin* (SMA), Snail und N-cadherin beobachtet werden [77]. Es erscheint also vielversprechend, über eine Inhibition von CIB1 direkt den Prozess der EMT beeinflussen. Leider ist dies *in vivo* zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich. *In vitro* allerdings gibt es bereits ähnlich Versuche. CIB1 exprimierende HCC-Zelllinien wurden mit einer CIB1 inhibierenden CIB1-siRNA und einer stummen Kontroll-RNA behandelt [54]. In diesen Versuchen konnte ein effektiver *knock-down* von CIB1 beobachtet werden und in Folge dessen wurde ein etwa 40%iger Rückgang der Proliferationsrate von Tumorzellen, die mit der CIB1-siRNA behandelt wurden, beschrieben. Weitere Studien an KRK-Zelllinien sind hier unbedingt erforderlich.

Neben der potentiell bedeutenden Rolle in der Therapie und Diagnostik stellt sich natürlich die Frage, ob CIB1 auch von prognostischer Relevanz bezogen auf das Gesamtüberleben von metastasierten KRK Patienten sein kann. In unserer Subgruppenanalyse der Gruppe HEP konnte keine eindeutige Aussage diesbezüglich getroffen werden. Teilt man die Patienten mit Lebermetastasen in zwei Gruppen anhand ihres mittleren H-scores, zeigte sich zwar eine Tendenz hin zum besseren Gesamtüberleben der Patienten mit dem niedrigeren H-score. Diese verfehlte jedoch knapp das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . In den anderen Subgruppen ließ sich keine klare Tendenz ableiten. Zu erwähnen ist allerdings,



dass das Kollektiv nicht aus *matched-pairs* bestand und auf Grund der geringen Beobachtungsgröße, vor allem nach Aufteilung innerhalb der Subgruppen, auch nur eingeschränkt aussagekräftig ist. Darüber hinaus konnten ich keine eindeutige Korrelation von CIB1 und zum Beispiel den Tumorstadien zeigen. Dies lässt vermuten, dass der Prozess der Metastasierung nicht nur mit der Größe des Tumors, sondern genauso mit der Tumorbiologie und dem Organotropismus zusammenhängt.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die Tatsache, dass die Analyse der NanoString Daten keinen signifikanten Unterschied in der Expression von CIB1 im Vergleich zwischen M0 und PER gezeigt hat. Wir konnten darüber hinaus auf Proteinebene nachweisen, dass CIB1 sogar signifikant weniger in der Gruppe der Patienten mit PK ausgeprägt ist. Der mittlere H-score in M0 war 83,09 und in PER 40,20 obwohl sowohl HEP als auch PER als „fernmetastasiert“ klassifiziert werden. 72,2% aller Tumore, die zu einer Invasion des Peritoneums führten, wurden als T4 eingestuft wurden. Das könnte bedeuten, dass die Peritonealkarzinose eher die Endstufe eines lokal fortgeschrittenen und hoch aggressiv wachsenden KRK ist, der am Ende die Serosa perforiert und weniger von der EMT und dem Organotropismus abhängt. Andererseits zeigen die Resultate der Genexpressionsanalyse deutliche, genetische Unterschiede. Zudem konnte eine Perforation der Serosa in HEP (9%) genauso wie in PER (6%) nur selten gefunden werden. In der Gruppe HEP/PER und PER waren es allerdings über 36% der Tumore, die eine Perforation in der postoperativen, histopathologischen Aufarbeitung zeigten. Ebenso zeigten diese auch eine CIB1 Expression die sogar noch etwas höher ist als in HEP. Dies könnte bedeuten, dass der Organotropismus sehr wohl für den eingeschlagenen Metastasierungsweg verantwortlich ist und die Patienten der Gruppe HEP/PER ihre Peritonealkarzinose auf Grund einer Serosaperforation ausgebildet haben.

Obwohl diese Studie eine relevante Korrelation zwischen der Expression von CIB1 und dem Metastasierungsmusters von KRK zeigen konnte, beruht sie natürlich auf retrospektiven Daten, was eine Limitierung ist. Ich wollte allerdings ebenfalls das Metastasierungsmuster von synchron und metachron auftretenden Fernmetastasen beleuchten. Dafür ist ein reines 5-Jahres follow-up

unumgänglich. Dies begründet den retrospektiven Charakter der Studie. Nichtsdestotrotz konnten eindeutige Hinweise für Unterschiede in der Tumorbiologie aufgezeigt werden, die unterschiedliche Metastasierungswege erklären könnten. So konnte CIB1 als relevantes Protein in der Entstehung hämatogener Lebermetastasen identifiziert werden.

## 5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die weltweit dritthäufigste, bösartige Tumorerkrankung und es kommt zu bis zu einer Million Neuerkrankung pro Kalenderjahr. [1, 2]. Werden bei Patienten, die an einem KRK erkrankt sind, Fernmetastasen detektiert (UICC Stadium IV), liegt die 5JÜ bei unter 8% [5]. Dies stellt eine drastisch schlechtere Überlebenschance im Vergleich zum nicht metastasierten Krankheitsstadium dar.

Daher ist das Ziel dieser Dissertation, den Mechanismus der Metastasierung genauer zu untersuchen. Die zugrundeliegende Hypothese ist, dass der Metastasierungsweg des KRK unter anderem durch die genetische Vielfalt des Primarius determiniert wird. Das unterschiedliche, genetische Muster des Primärtumors ist also mit dafür verantwortlich, dass KRK zu einem Befall der Leber führen, nicht metastasieren oder in das Peritoneum streuen. Während die hämatogene Aussaat in die Leber mit Veränderungen der Angiogenese, EMT und Organotropismus in Verbindung gebracht wurde, könnte es sich bei Karzinomen, die zu einer Peritonealkarzinose führen, eher um lokal fortgeschrittene und aggressiv wachsende Tumore handeln. Um diese Hypothesen der unterschiedlichen Metastasierungswege zu untersuchen, wurden vier unterschiedliche Gruppen anhand eines hoch selektivem Metastasierungsmuster gebildet: Patienten mit lokal fortgeschrittenem KRK ohne Fernmetastasierung (M0), KRK mit hepatischen Metastasen (HEP), KRK, die ausschließlich eine Peritonealkarzinose (PER) zeigen und solche KRK, die sowohl die Leber als auch das Peritoneum (HEP/PER) befallen.

Anhand der Analyse der Genexpressionsdaten der Gruppen M0, HEP und PER konnte in der Tat verdeutlicht werden, dass sich diese Tumorentitäten in ihrer Gensignatur deutlich unterscheiden. Die PCA zeigte darüber hinaus, dass es nur wenig genetische Überschneidungen zwischen den einzelnen Gruppen gibt. Die PCA zeigte jedoch ebenso, dass die Genexpressionsprofile der jeweiligen Gruppen mit gleichem Metastasierungsmuster in sich sehr homogen waren. CIB1 zeigte dabei mit das homogenste Expressionsmuster. In der immunhistochemischen Validierung zeigte sich, dass CIB1 in Tumoren, die zu einem Befall der Leber führen, hochgradig und signifikant überexprimiert ist. Die

Expression von CIB1 in Tumoren, die nicht metastasieren oder zu einer Peritonealkarzinose führen, war deutlich geringer. Die Aufarbeitung der Tumorstadien lässt hingegen vermuten, dass die KRK, die der Gruppe PER angehören, fortgeschrittener waren als die Tumore der Gruppen HEP und M0. Gerade im Falle einer isolierten Peritonealkarzinose kann man zumindest von einer Kombination aus aggressiverem Wachstumsmuster und genetischer Prädisposition ausgehen. So war selbst im Falle einer Perforation der Serosa und bestehender PK CIB1 mit dem Auftreten von Lebermetastasen assoziiert. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass CIB1 zumindest mit für das Auftreten von Lebermetastasen, jedoch nicht für die Ausbildung einer Peritonealkarzinose verantwortlich zu sein scheint.

Es darf also geschlussfolgert werden, dass CIB1 ein vielversprechender Biomarker zur Risikostratifizierung von KRK Patienten zur Ausbildung einer Lebermetastasierung darstellt. Darüber hinaus kann CIB1 in Zukunft möglicherweise sowohl zur Primärdiagnostik als auch zum follow-up von initial metastasenfrem Patienten genutzt werden. In einem nächsten Schritt ist eine Modulation von CIB1 sowohl in vitro als auch in vivo denkbar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Sakin, A., et al., *Factors affecting survival in patients with isolated liver-metastatic colorectal cancer treated with local ablative or surgical treatments for liver metastasis*. J buon, 2019. **24**(5): p. 1801-1808.
2. Arnold, M., et al., *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. Gut, 2017. **66**(4): p. 683-691.
3. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
4. Dekker, E., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2019. **394**(10207): p. 1467-1480.
5. Tarazi, M., et al., *Two and five year survival for colorectal cancer after resection with curative intent: A retrospective cohort study*. Int J Surg, 2018. **55**: p. 152-155.
6. Kuipers, E.J., et al., *Colorectal cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15065.
7. Song, M., W.S. Garrett, and A.T. Chan, *Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention*. Gastroenterology, 2015. **148**(6): p. 1244-60.e16.
8. Pretzsch, E., et al., *Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 7407190.
9. Büttner, R. and N. Friedrichs, *[Hereditary colon cancer in Lynch syndrome/HNPCC syndrome in Germany]*. Pathologe, 2019. **40**(6): p. 584-591.
10. Leedham, S.J., et al., *Gastrointestinal stem cells and cancer: bridging the molecular gap*. Stem Cell Rev, 2005. **1**(3): p. 233-41.
11. Mitarbeiter, G.H.u., *Innere Medizin* 2015. **7**.
12. Choi, J.H. and J.Y. Ro, *The 2020 WHO Classification of Tumors of Soft Tissue: Selected Changes and New Entities*. Adv Anat Pathol, 2020.
13. Choi, W., et al., *Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy*. Cancer Cell, 2014. **25**(2): p. 152-65.
14. AJCC, *Colon and Rectum Cancer Staging*. Vol. 7th edition. 2018.
15. Sagaert, X., A. Vanstapel, and S. Verbeek, *Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far?* Pathobiology, 2018. **85**(1-2): p. 72-84.
16. Aust, D.E., *[WHO classification 2010 for the lower gastrointestinal tract: what is new?]*. Pathologe, 2011. **32 Suppl 2**: p. 326-31.
17. Bouza, A., *Bild und Annotation in der digitalen Mikroskopie*. Smart Zoom, Smart Media, 2018.
18. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.

19. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
20. Lao, V.V. and W.M. Grady, *Epigenetics and colorectal cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(12): p. 686-700.
21. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
22. Sansom, O.J., et al., *Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 676-9.
23. Klos, C.L. and S. Dharmarajan, *Polyp Genetics*. Clin Colon Rectal Surg, 2016. **29**(4): p. 289-295.
24. Langner, C., *Serrated and non-serrated precursor lesions of colorectal cancer*. Dig Dis, 2015. **33**(1): p. 28-37.
25. Terrell, E.M. and D.K. Morrison, *Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2019. **9**(1).
26. Chen, H., et al., *Small-Molecule Inhibitors Directly Targeting KRAS as Anticancer Therapeutics*. J Med Chem, 2020. **63**(23): p. 14404-14424.
27. Munro, M.J., et al., *Cancer stem cells in colorectal cancer: a review*. J Clin Pathol, 2018. **71**(2): p. 110-116.
28. Shimokawa, M., et al., *Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells*. Nature, 2017. **545**(7653): p. 187-192.
29. Marotta, L.L. and K. Polyak, *Cancer stem cells: a model in the making*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(1): p. 44-50.
30. Ricci-Vitiani, L., et al., *Colon cancer stem cells*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(11): p. 1097-104.
31. Tauriello, D.V., et al., *Determinants of metastatic competency in colorectal cancer*. Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 97-119.
32. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
33. Müller, M.F., A.E. Ibrahim, and M.J. Arends, *Molecular pathological classification of colorectal cancer*. Virchows Arch, 2016. **469**(2): p. 125-34.
34. Li, Y., et al., *IL-1 $\beta$  promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation*. Mol Cancer, 2012. **11**: p. 87.
35. Sluiter, N., et al., *Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options*. Clin Exp Metastasis, 2016. **33**(5): p. 401-16.
36. Lemoine, L., P. Sugarbaker, and K. Van der Speeten, *Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(34): p. 7692-707.

37. Kojima, M., et al., *Human subperitoneal fibroblast and cancer cell interaction creates microenvironment that enhances tumor progression and metastasis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88018.
38. Schmiegel, W., et al., [Not Available]. Z Gastroenterol, 2017. **55**(12): p. 1344-1498.
39. Nasser, Y. and S.J. Langenfeld, *Imaging for Colorectal Cancer*. Surg Clin North Am, 2017. **97**(3): p. 503-513.
40. Wittekind, C., [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. Pathologe, 2010. **31**(5): p. 331-2.
41. Cook, A.D., R. Single, and L.E. McCahill, *Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000*. Ann Surg Oncol, 2005. **12**(8): p. 637-45.
42. Desch, C.E., et al., *Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8512-9.
43. Roncucci, L. and F. Mariani, *Prevention of colorectal cancer: How many tools do we have in our basket?* Eur J Intern Med, 2015. **26**(10): p. 752-6.
44. Naik, U.P., P.M. Patel, and L.V. Parise, *Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 4651-4.
45. Rusnak, F. and P. Mertz, *Calcineurin: form and function*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1483-521.
46. Gifford, J.L., M.P. Walsh, and H.J. Vogel, *Structures and metal-ion-binding properties of the  $Ca^{2+}$ -binding helix-loop-helix EF-hand motifs*. Biochem J, 2007. **405**(2): p. 199-221.
47. Huang, H., et al., *Solution structures of  $Ca^{2+}$ -CIB1 and  $Mg^{2+}$ -CIB1 and their interactions with the platelet integrin  $\alpha$ IIb cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 17181-92.
48. Leisner, T.M., et al., *CIB1: a small protein with big ambitions*. Faseb j, 2016. **30**(8): p. 2640-50.
49. Huang, H. and H.J. Vogel, *Structural basis for the activation of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by calcium- and integrin-binding protein 1*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(8): p. 3864-72.
50. Wang, X., et al., *The Emerging Roles of CIB1 in Cancer*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(4): p. 1413-1424.
51. Kleiman, N.S., et al., *Platelets: developmental biology, physiology, and translatable platforms for preclinical investigation and drug development*. Platelets, 2008. **19**(4): p. 239-51.
52. Zayed, M.A., et al., *CIB1 regulates endothelial cells and ischemia-induced pathological and adaptive angiogenesis*. Circ Res, 2007. **101**(11): p. 1185-93.

53. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure*. *Jama*, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
54. Junrong, T., et al., *Proteomic identification of CIB1 as a potential diagnostic factor in hepatocellular carcinoma*. *J Biosci*, 2011. **36**(4): p. 659-68.
55. Armacki, M., et al., *A novel splice variant of calcium and integrin-binding protein 1 mediates protein kinase D2-stimulated tumour growth by regulating angiogenesis*. *Oncogene*, 2014. **33**(9): p. 1167-80.
56. Nagayoshi, Y., et al., *Profiling of autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21 Suppl 3**: p. S459-65.
57. Jarman, K.E., et al., *Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(1): p. 483-92.
58. Azoitei, N., et al., *Protein kinase D2: a versatile player in cancer biology*. *Oncogene*, 2018. **37**(10): p. 1263-1278.
59. Holtrich, U., et al., *Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages*. *Oncogene*, 2000. **19**(42): p. 4832-9.
60. Segelman, J., et al., *Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer*. *Br J Surg*, 2012. **99**(5): p. 699-705.
61. Baguena, G., et al., *Prognostic Impact of pT Stage and Peritoneal Invasion in Locally Advanced Colon Cancer*. *Dis Colon Rectum*, 2019. **62**(6): p. 684-693.
62. Kuhlmann, K., et al., *Management of disappearing colorectal liver metastases*. *Eur J Surg Oncol*, 2016. **42**(12): p. 1798-1805.
63. Heinemann, V., et al., *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(10): p. 1065-75.
64. Wrobel, P. and S. Ahmed, *Current status of immunotherapy in metastatic colorectal cancer*. *Int J Colorectal Dis*, 2019. **34**(1): p. 13-25.
65. Modest, D.P., S. Pant, and A. Sartore-Bianchi, *Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer*. *Eur J Cancer*, 2019. **109**: p. 70-83.
66. Tsang, H.F., et al., *NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(1): p. 95-103.
67. Siemens, H., et al., *Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and  $\beta$ -catenin predicts distant metastasis of colon cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(3): p. 710-20.
68. Nagtegaal, I.D., et al., *The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system*. *Histopathology*, 2020. **76**(2): p. 182-188.
69. Bertero, L., et al., *Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why?* *Virchows Arch*, 2018. **472**(4): p. 519-531.



70. Heinrich, S. and H. Lang, *Liver metastases from colorectal cancer: technique of liver resection*. J Surg Oncol, 2013. **107**(6): p. 579-84.
71. Vassos, N. and P. Piso, *Metastatic Colorectal Cancer to the Peritoneum: Current Treatment Options*. Curr Treat Options Oncol, 2018. **19**(10): p. 49.
72. Li, X.M., et al., *A novel inflammatory regulator TIPE2 inhibits TLR4-mediated development of colon cancer via caspase-8*. Cancer Biomark, 2014. **14**(4): p. 233-40.
73. Prior, I.A., P.D. Lewis, and C. Mattos, *A comprehensive survey of Ras mutations in cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(10): p. 2457-67.
74. Xia, P., et al., *An oncogenic role of sphingosine kinase*. Curr Biol, 2000. **10**(23): p. 1527-30.
75. Gao, Y., et al., *Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 3239-45.
76. Ponnusamy, S., et al., *Communication between host organism and cancer cells is transduced by systemic sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signalling to regulate tumour metastasis*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(8): p. 761-75.
77. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

5JÜ	5-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
AKS	Adenom-Karzinom-Sequenz
APC	Adenomatöses polyposis coli Gen
APC-M	<i>Aberrant crypt focus-Mutation</i>
CED	Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen
CIB1	Calcium und Integrine-bindende Protein 1
<i>CIMP</i>	<i>CpG-Island-Methylation-Phänotyp</i>
CME	Komplette mesokolische Exzision
TME	TOTALE MESOREKTALE EZISION
CT	Computertomographie
Dh	Protein Dishevelled
DRU	Digital-Rektalen Untersuchung
ED	Erstdiagnose
EGFR	<i>Endothelial growth-factor</i> Rezeptor
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent essays</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell-adhesion molecule</i>
EZM	Extrazellulären Matrix
FAP	Familiären adenomatösen Polyposis
FFPE	in Formalin fixiertes und in Parrafin eingebettetes Gewebe
Fz	Transmembranrezeptor Frizzled
HCC	Hepatozelluläre Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEP	Befall der Leber
HEP/PER	Leber als auch das Peritoneum befallen
HIPEC	hypertherme, intraperitoneale Chemotherapie
HNPCC	Lynch-Syndrom (Hereditary non polyposis colon cancer)
IL-1b	Interleukin 1b
IL6	Interleukin 6
JN	Prof. Neumann
KRK	Kolorektales Karzinom
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>

---

LGR5	<i>Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled-receptor 5</i>
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein-Rezeptor</i>
M0	Keine Fernmetastasierung
MAP	Mitogen-activated protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatteliteninstabilität
MSI-h	Mikrosatteliteninstabilität hoch
MSI-n	Mikrosatteliteninstabilität niedrig
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
OS	Gesamtüberleben
PCA	Principal Component Analyse
PDK-1	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase-1</i>
PDK-2	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase-2</i>
PER	Invasion des Peritoneums
PK	Peritoneale Karzinomatose
PKD2	Protein Kinase D2
PLK3	Polo-like Kinase 3
PT	Primärtumors
RNA	Ribonukleinsäure
SK1	Sphingosein Kinase 1
SKW	Serratierte Karzinogenese
<i>StDev</i>	Standardfehler
Tcf/Lef	<i>T-cell-specific transcription factor/ lymphoid enhancer-binding factor</i>
TGF- $\beta$	Tumor growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
UICC	Union Internationale contre le cancer
VEGF	<i>Vascular-endothelial growth-factor-Rezeptor</i>
WHO	World Health Organization

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	TNM-Klassifikation des KRK – Stand 2017
<b>Tabelle 2</b>	Stadieneinteilung des KRK anhand der UICC-Klassifikation aus 2010.
<b>Tabelle 3</b>	Stadiengerechte Therapie des Kolonkarzinoms. Modifiziert nach [38]. TIS= carcinoma in situ.
<b>Tabelle 4</b>	Stadiengerechte Therapie des Rektumkarzinoms. Modifiziert nach [38]. Ctx= Chemotherapie, RCtx= Radiochemotherapie.
<b>Tabelle 5</b>	Chirurgisches Therapieausmaß abhängig von der Tumorlokalisierung
<b>Tabelle 6</b>	Klinisch-pathologische Patienteninformation. (PT=Primärtumor; UICC= union for international cancer control, G=grading; T=Tumorgröße; N=Lymphknotenstatus; n.a.=nicht anzuwenden).
<b>Tabelle 7</b>	Darstellung aller gebrauchten Materialien und Chemikalien.
<b>Tabelle 8</b>	Darstellung aller verwendeten Geräte.
<b>Tabelle 9</b>	Zusammenfassung der statistisch-deskriptiven Auswertung der Immunhistochemie.
<b>Tabelle 10</b>	Zusammenfassung der statistisch-deskriptiven Auswertung der H-score Klassifikation high vs. low.
<b>Tabelle 11</b>	Korrelation zwischen CIB1 nach Klassifikation in high und low mit klinisch-pathologischen Parametern.

<b>Tabelle 12</b>	Zusammenfassung der Überlebensanalyse von M0, HEP, PER und HEP/PER.
-------------------	---

## 10. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Darstellung der Kolonschleimhaut. Links: normale Kolonschleimhaut mit 1) Tunica mukosa, 2) Tela submukosa, 3) Tunica muskularis, 4) Tela subserosa. Rechts: tubuläres Adenom des Dickdarms.
- Abb. 2** Die unterschiedlichen Subtypen des KRK definiert nach WHO: a= Adenokarzinom mit glandulärer Struktur; b= medulläres Karzinom mit solidem Wachstum; c= muzinöses Karzinom; d) Siegelringzell-Karzinom.
- Abb. 3** Überblick über die verschiedenen Karzinogenesewege. Differenzierung der Tumorentstehung abhängig von Veränderung im APC-Gen, mismatch-repair-Genen, BRaf- und KRas Mutationen.
- Abb. 4** Darstellung des Wnt-Signalweg.
- Abb. 5** Darstellung des KRas-Signalweg.
- Abb. 6** Vereinfachter Überblick über die durchlaufenden Sequenzen vom Primärtumor hin zur Metastase. Genetische Tumorunterschiede entsprechen unterschiedlichen Farben. Schwarze Pfeile spiegeln von links nach rechts Invasion, Zirkulation, Extravasion und Kolonisation wieder.
- Abb. 7** Darstellung ichtiger Interaktionspartner von CIB1. Grün=Verstärkung durch CIB1, grau= unbekannter Mechanismus, rot=Inhibierung. BCL2=B-cell lymphoma 2, hTERT= human telomerase reverse transcriptase, WASP=Wiskott-Aldrich syndrome protein, Casp2s=caspase 2S, ER=endoplasmic reticulum, DNA-PKCS=DNA-protein kinase catalytic subunit, FAK=focal adhesion kinase.

- Abb. 8** CONSORT-flow chart. Von Erstellung der Datenbank bis zum finalen Kollektiv.
- Abb. 9** Immunhistochemische Färbung von CIB1: Adenokarzinom des Kolos mit (A) abwesender, (B) schwacher, (C) moderater und (D) starker Färbung (Vergrößerung 200-fach).
- Abb. 10** Genexpressionsanalyse aller vier Subgruppen präsentiert in (A) einer Principal Component Analyse, (B) Vulcanoplots mit allen Genen inklusive Signifikanz und fold-change und (C) heat-maps aller signifikanten Gene: dunkle Rot=starke Expression, Orange=semi-starke Expression, Weiß=schwache Expression. CIB1 ist mit einem roten Pfeil markiert.
- Abb. 11** Verteilungsmuster der CIB1-Expression in allen vier KRK-Subgruppen. kennzeichnet den jeweiligen Mittelwert. \*\*p-value<0.001. Initiale Berechnung via one-way ANOVA gefolgt von Subgruppenanalysen mit student's t-Test.
- Abb. 12** Verteilungsmuster der CIB1-Expression nach Klassifikation in high vs. \*\*p-value<0.001. Initiale Berechnung via one-way ANOVA gefolgt von Subgruppenanalysen mit student's t-Test.
- Abb. 13** Überlebensanalysen aller vier Subgruppen anhand der CIB1-Expression. Einteilung nach CIB1-Median jeder Subgruppe M0, HEP, PER, HEP/PER.

## 10. Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich sowohl bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Martin Angele, als auch meinem Betreuer, PD Dr. Florian Bösch ganz herzlich bedanken. Ich wurde nicht nur mit Begeisterung in die Forschungsgruppe aufgenommen, sondern auch im Verlauf meiner gesamten Karriere und insbesondere während dieser Promotionsarbeit außergewöhnlich unterstützt. Bei Herrn Prof. Angele möchte ich mich zudem für seine kontinuierliche, ideenreiche Unterstützung, die Finanzierung der Experimente und die Herstellung interdisziplinärer Kontakte, vor allem in das Institut für Pathologie, bedanken.

Herrn PD Dr. Bösch gilt an dieser Stelle ebenso ein ganz besonderer Dank. Zum einen für die Überlassung dieser sehr interessanten Themen, zum anderen für die unermüdlich Unterstützung sowohl in der Durchführung des experimentellen Teils von diesem Projekt als auch in der Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Jens Neumann, Stellvertretend für das gesamte Institut der Pathologie, bedanken. Herr Prof. Neumann hat mich in der alltäglichen Arbeit im Labor zu jederzeit maßgeblich unterstützt und war immer für Fragen offen. Zudem hat er mir gemeinsam mit allen Kollegen der Pathologie hervorragend Arbeitsbedingungen zur Verfügung gestellt, dieses Projekt vollenden zu können.

Nun möchte ich mich bei Prof. Werner und dem gesamten Team der Allgemein, Viszeral- und Transplantationschirurgie für ein äußerst angenehmes Arbeitsumfeld und sowohl praktische als auch intellektuelle Unterstützung bedanken.

Abschließend gilt meiner Freundin Alaleh und meiner gesamten Familie, besonders aber meinen Eltern und meinem Bruder ein ganz besonderer Dank. Nicht nur für die Ermöglichung meines Studiums, sondern auch für die unermüdliche Unterstützung und Motivation, vor allem in schwierigeren Zeiten. Ihr ward immer für mich da, hattet zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich und habt den Glauben an mich nie verloren. Das werde ich für immer zu schätzen wissen.









