

Aus dem Pathologischen Institut  
Institut der Universität München

Direktor:  
Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

**VALIDIERUNG NODALS ALS BIOMARKER FÜR DAS  
PULMONAL METASTASIERTE KOLOREKTALE  
KARZINOM**

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

vorgelegt von  
Thomas Schneider  
aus Karlsruhe  
2022

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Lucie Heinzerling

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Marlies Michl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudemann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	iii
Tabellenverzeichnis .....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	vii
1 Zusammenfassung .....	1
2 Einleitung .....	3
2.1 Epidemiologie und Prognose des kolorektalen Karzinoms .....	3
2.2 Klinische Relevanz der verschiedenen Metastasierungsmuster - Unterschiede in Prognose und Verlauf .....	4
2.3 Das Zytokin Nodal .....	13
2.3.1 Relevanz Nodals für Krebserkrankungen .....	14
2.3.1.1 Die epithelial-mesenchymale Transition	16
2.3.1.2 Krebsstammzellen .....	17
2.3.2 Relevanz Nodals für das kolorektale Karzinom .....	21
2.3.3 Der Nodal Signalweg und der Wnt/ $\beta$ - Catenin Signalweg .....	21
3 Zielsetzung .....	25
4 Material und Methoden .....	27
4.1 Kollektiv .....	27
4.2 Methodik .....	29
4.2.1 Immunhistochemie .....	29

4.3	Statistische Methoden .....	32
5	Ergebnisse .....	33
5.1	Überlebenszeit-Analysen .....	33
5.2	Kategorie Nodal und klinisch-pathologische Patientendaten .....	38
5.3	Kategorie Nodal und Metastasierungsstatus .....	40
6	Diskussion .....	43
7	Zusammenfassung .....	67
8	Literaturverzeichnis .....	69
9	Danksagung .....	83
10	Eidesstattliche Versicherung .....	87

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1 nach [2]. Szenarien die Krebsstammzellen beinhalten.....</b>	<b>18</b>
<b>Abbildung 2 nach [3]. Förderung von Krebsstammzellen durch aberrante Nodal-Expression.....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 3 immunhistochemische Färbung von Nodal (200fache Vergrößerung). ....</b>	<b>31</b>
<b>Abbildung 4. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum jeweils für pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome. ....</b>	<b>33</b>
<b>Abbildung 5. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum jeweils für pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome. ....</b>	<b>34</b>
<b>Abbildung 6. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für jeweils pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 7. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungszeitraum für pulmonal metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.....</b>	<b>36</b>
<b>Abbildung 8. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungszeitraum für hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression. ....</b>	<b>36</b>

**Abbildung 9. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für jeweils pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression. ....37**

**Abbildung 10. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für pulmonal metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression. ....37**

**Abbildung 11. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression. ....38**

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Klinisch-pathologische Patientendaten in Korrelation zum Metastasierungsstatus.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 2: Klinisch-pathologische Patientendaten in Korrelation zur Kategorie Nodal .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 3: Kategorie Nodal in Korrelation zum Metastasierungsstatus .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 4: Kategorie Nodal in Korrelation zu verschiedenen Metastasierungssubgruppen .....</b>	<b>41</b>





# Abkürzungsverzeichnis

ALK	activin receptor-like kinase
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CEA	carcinoembryonales Antigen
EMT	epithelio-mesenchymale Transition
HEP	kolorektale Karzinome mit isolierter hepatischer Metastasierung
KRK	kolorektales Karzinom
KRAS	Kirsten rat sarcoma
M0	kolorektale Karzinome ohne Metastasierung über einen fünfjährigen Beobachtungszeitraum
M1	metastasierte kolorektale Karzinome (bestehend aus der Gruppe der pulmonal und der hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinome)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität

## | Abkürzungsverzeichnis

Oct-4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
pN Status	postoperative histopathologische Klassifikation des Lymphknoten Status des Tumors
pT Stadium	postoperative histopathologische Klassifikation des Stadiums des Primärtumors
PUL	kolorektale Karzinome mit isolierter pulmonaler Metastasierung
Smad2	Mothers against decapentaplegic homolog 2
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den weltweit häufigsten Malignomen und zeigt einen oft tödlichen Verlauf. Das Auftreten von Metastasen ist nach wie vor ein entscheidender Einflussfaktor für den Krankheitsverlauf, wobei sich die Prognose je nach Ort der Metastasierung unterscheidet. Je nach Lokalisation der Metastasen kommen zudem unterschiedliche Therapiekonzepte infrage, was es notwendig macht, die jeweiligen Metastasierungsmuster frühzeitig zu erkennen, um rechtzeitig intervenieren zu können. Bislang existieren in der Literatur noch keine validierten Biomarker, die mit einer Metastasen-Lokalisation in der Lunge korrelieren. Aus diesem Grund hatte sich unsere Arbeit zum Ziel gesetzt einen Biomarker zu identifizieren, der mit der organotropen pulmonalen Metastasierung korreliert und diese potenziell vorhersagt. Es wurde durch Genexpressionsanalysen das Zytokin Nodal identifiziert, das auf RNA-Ebene möglicherweise differenziell bei KRK und ihren zugehörigen pulmonalen Metastasen exprimiert werden könnte. In mehreren Studien ist Nodal mit der malignen Progression und Metastasierung von Tumoren assozii-

## | Zusammenfassung

iert. Die Nodal-Expression wurde im Design einer Fall-Kontroll-Studie innerhalb eines 222 KRK umfassenden Kollektivs untersucht, wovon n=74 eine isolierte pulmonale Metastasierung, n=74 eine isolierte hepatische Metastasierung und n=74 keine Metastasen über einen fünfjährigen Beobachtungszeitraum aufwiesen. Nodal korrelierte in unserer Studie nicht mit dem Ort der Metastasierung. Es konnte jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen Nodal und den aus einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Daten zum  $\beta$ -Catenin-Score bei KRK festgestellt werden [1].

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Prognose des kolorektalen Karzinoms

Das KRK ist weltweit die dritthäufigste Krebsart [4]. 2013 erkrankten in Deutschland 28.360 Frauen und 34.050 Männer an dieser Krankheit [5]. Jedoch wird seit einigen Jahren, vermutlich aufgrund der Einführung der Koloskopie als Vorsorgeuntersuchung, ein Rückgang der Inzidenz beobachtet [5, 6]. Das KRK geht mit einer hohen Mortalität einher. Ca. 56% der KRK Patienten versterben unmittelbar durch ihre Erkrankung [7]. Das Auftreten von Fernmetastasen ist hierbei nach wie vor prognosebestimmend. Wenn Darmkrebs in einem lokalisierten Stadium nachgewiesen wird, beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate 90,3%. Wenn sich die Krankheit jedoch auf entfernte Organe ausgebreitet hat, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 12,5% [8]. mKRK stellen bei den meisten Patienten eine unheilbare Erkrankung dar. Jedoch konnte durch neuere medikamentöse Therapien das mediane Überleben von 10 Monaten mit „best supportive Care“ auf 14 Monate mit Fluoropyrimidin-Therapie und auf mehr als zwei Jahre mit einer

Kombination aus vielfältigen zytotoxischen und biologischen Therapeutika verbessert werden [\[9\]](#).

## 2.2 Klinische Relevanz der verschiedenen Metastasierungsmuster - Unterschiede in Prognose und Verlauf

Metastasierung ist die häufigste Todesursache bei Krebspatienten und die Fähigkeit zur Metastasierung ist kennzeichnend für maligne Tumoren [\[8, 10\]](#). Beim KRK ist die Metastasierung ein häufiges Phänomen. Bei 20-25 % der Patienten bestehen bei der Diagnose bereits Metastasen, bei weiteren 25 % entwickeln sich diese im Laufe der Krankheit [\[11\]](#). Die häufigsten Metastasierungslokalisationen sind: Leber (70%), Thorax (30 bis 50%), Peritoneum (20%) und Knochen (10%), Metastasen im zentralen Nervensystem betragen 5 bis 10% [\[12\]](#).

Die Metastasierungs-Lokalisation beeinflusst die infrage kommenden Therapieformen. Während ehemals bei mKRK lediglich ein palliatives Therapiekonzept möglich war, können durch die Entwicklung neuer Therapien inzwischen je nach Metastasierungslokalisation viele Patienten mit einem kurativen Therapieziel behandelt werden. Hierfür sind im Rahmen multidisziplinärer Konzepte chirurgische Eingriffe die wichtigste Komponente [\[13-15\]](#). Darüber

hinaus kommen auch die selektive interne Radiotherapie (SIRT) und die Radiofrequenzablation (RFA) zur Bekämpfung metastasierter Tumoren zum Einsatz [16]. Außerdem können Hirnmetastasen je nach Anzahl und Größe durch eine Strahlentherapie behandelt werden [17]. Aufgrund dieser durch unterschiedliche Metastasierungsmuster bedingten verschiedenen therapeutischen Ansätze sind Biomarker, die mit speziellen Metastasierungsmustern korrelieren von großer klinischer Bedeutung für die Planung und auch Durchführung von Therapien.

In unserer Studie haben wir mit dem Ziel einen Biomarker, der mit Metastasierungsmustern korreliert die Nodal-Expression in KRK mit einer isolierten pulmonalen oder hepatischen Metastasierung untersucht. In der Literatur sind in der Gruppe KRK, deren Metastasen auf ein Organ beschränkt sind, die Leber und/oder die Lunge am häufigsten betroffen [9]. Tumoren mit isolierten Metastasen in ein bis zwei Organen entsprechen laut der Theorie der Oligometastasen einem Krankheitsstadium zwischen örtlich begrenzter und weit ausgebreiteter Krankheit, in dem potenziell kurative Therapien noch möglich sind [18]. Die Tumoren, die dieser Untergruppe angehören, weisen spezifische biologische und klinische Charakteristika auf. Es gibt in dieser Gruppe außerdem unterschiedliche Prognosen. Wenn

die Metastasierung auf ein Organ beschränkt ist, wird die Prognose, bei kontrollierbarem Primarius, maßgeblich durch die Resektabilität der Metastasen bestimmt. Primär resezierbare oder durch Chemotherapie resezierbar gemachte Metastasen können mit kurativem Therapieziel behandelt werden, in den übrigen Fällen ist die Prognose schlecht [9].

Isolierte hepatische Metastasen sind die häufigste Metastasierungslokalisation in der Gruppe der Oligometastasen. In einem Drittel der mKRK-Fälle ist die Leber der einzige Ort der Metastasierung. Das mediane Überleben von KRK-Patienten mit einer isolierten hepatischen Metastasierung beträgt 22,6 Monate. Eine isolierte pulmonale Metastasierung kommt seltener vor. 2,8 bis 7,4 % der KRK-Patienten entwickeln eine isolierte pulmonale Metastasierung [9]. Patienten mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung weisen verglichen mit anderen isolierten Metastasierungsorten das beste Gesamtüberleben auf (41,1 Monate) [19]. Patienten mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung haben außerdem eine signifikant bessere Prognose als Patienten mit einer pulmonalen Metastasierung und Metastasen in einem weiteren zusätzlichen Organ. Die Prognosen anderer, seltener isoliert vorkommenden Metastasierungsmuster sind außer bei der Peritonealkarzinose



schlecht. Das mediane Überleben von Patienten mit einer Peritonealkarzinose konnte durch die Entwicklung der intraperitonealen Chemotherapie von 6 – 8 Monaten auf bis zu 30,1 Monate verbessert werden [9, 20]. Das mediane Überleben für Patienten mit Gehirnmetastasen beträgt 3 bis 6 Monate und für Patienten mit Knochenmetastasen 5 bis 7 Monate ab Entdeckung der Knochenmetastasen [9].

Die bessere Prognose von Patienten mit resektablen Metastasen, die nur auf ein Organ beschränkt sind, ist auf vielfältige Faktoren zurückzuführen: Diese Gruppe KRK befindet sich in einem früheren Krankheitsstadium und hat eine geringere Metastasierungslast. Außerdem sind die entsprechenden Patienten in einem Gesundheitszustand, in dem sie eine solche Operation tolerieren können. Somit kann das verbesserte Überleben nicht eindeutig auf einen Faktor zurückgeführt werden, eine gutartigere Tumorbiologie ist in dieser Subgruppe jedoch anzunehmen [9].

Die mit dem jeweiligen Metastasierungsmuster einhergehenden unterschiedlichen Prognosen lassen sich über die „Seed and Soil“-Hypothese erklären, wonach Tumoren bestimmter Tumorbiologie („Seed“, also Samen) nur in bestimmten Organen Metastasen bilden können („Soil“, also Boden). Dies wird durch Interaktionen der Tumorzellen mit

der Mikroumgebung des jeweiligen Organs erklärt [9, 21]. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Tumorzellen die Metastasierung in ein bestimmtes Organ stark beeinflusst. Eine solche veränderte Tumorbio­logie könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose haben. Auch das Zielorgan scheint einen Einfluss auf die Metastasenbildung und -aufrechterhaltung zu haben, da die Mikroumgebung im Organ die Genexpression der Krebszellen, deren Verhalten und deren Therapieansprechen beeinflusst. Daneben gibt es weitere Faktoren, die die Prognose beeinflussen. Hierzu zählt unter anderem eine Beeinträchtigung lebenswichtiger Organe, wie es beispielsweise bei Hirnmetastasen der Fall ist. Auch die metastatische Last sowie das Tumolvolumen insgesamt sind Einflussfaktoren [9].

Aufgrund der unterschiedlichen Prognose, welche mit der Lokalisation der Metastasen einhergeht, kann man über einen Biomarker, der mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung korreliert, potenziell Krankheitsverläufe vorher­ sagen. Außerdem kann ein solcher Biomarker Hinweise auf die Tumorbio­logie geben, welche wiederum wichtig für eine optimale Therapie sein können [9].

Bei einigen KRK-Fällen kann man den Ort der Metastasierung hauptsächlich auf anatomische Gegebenheiten zurückzuführen. Z.B. umgehen distale Rektumkarzinome über den Blutfluss die Leber und erreichen dadurch als erstes Organ die Lunge [12]. Diese Untergruppe KRK metastasiert, verglichen mit anderen Metastasierungsorten, bevorzugt in die Lunge und den Knochen [12, 22], während Kolonkarzinome aufgrund des Blutabflusses über die Pfortader eher in die Leber metastasieren [22]. Aufgrund der Größe der Tumorzellen und der Kapillaren wird ein Großteil der zirkulierenden Tumorzellen im Kapillarbett des ersten Organs, das sie erreichen zurückgehalten. Ob sich im entsprechenden Organ Metastasen bilden entscheidet sich wahrscheinlich über die „Seed and Soil“-Hypothese und folglich über die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und der Mikroumgebung im Organ [23].

Es konnte gezeigt werden, dass auch die Lokalisation des Primarius bei mKRK Einfluss auf die Prognose, den Krankheitsverlauf und die Therapieeignung hat. Die embryonale Herkunft von links- und rechtsseitigem Kolon sowie des Rektums ist ebenfalls verschieden. Man vermutet deshalb, dass es auch Unterschiede in der Tumorbilogie von Karzinomen der jeweiligen Darmabschnitte gibt. Das linkssei-

tige Kolon ist definiert als der Abschnitt von der splenischen Flexur bis zum Rektum, das rechtsseitige als der Abschnitt vom Zökum bis einschließlich des Kolon transversum [24-29].

Die Annahme, dass es sich bei den unterschiedlichen Metastasierungsmustern ebenfalls um separate Entitäten mit individueller Tumorbiologie handeln könnte, die eine individualisierte Therapie erfordern, wird durch mehrere Studien gestützt [30]. Z.B. wirkt sich der Mismatch-Reparatur-Status bei KRK auf die Fähigkeit zu metastasieren aus. Bei defekter DNA-Reparatur kommt es zu einem mikrosatelliteninstabilen (MSI) Genotyp, der im Gegensatz zum mikrosatellitenstabilen (MSS) Genotyp Mutationen in Mikrosatelliten aufweist. Mikrosatelliten sind repetitive, nichtkodierende Genabschnitte [31]. Der Status des Mismatch-Reparatur-Systems in Tumoren hat Auswirkungen auf die Fähigkeit KRK zu metastasieren. KRK mit MSI weisen ein geringes Metastasierungsrisiko auf [16, 32].

Bei KRK vom MSS-Typ scheint die Aktivierung verschiedener Stammzellen-assoziiierter Signalwege bestimmte Metastasierungsmuster zu bedingen. KRK vom MSS-Typ mit starker  $\beta$ -Catenin- und Stammzellmarker-Expression metastasieren häufiger in die Leber und seltener in das ZNS

oder das Peritoneum [11, 16, 33]. Darüber hinaus scheint bereits die Expression des Stammzellmarkers CD133 mit der Entwicklung einer hepatischen Metastasierung zu korrelieren [1]. KRK vom MSS-Typ mit niedriger  $\beta$ -Catenin- und Stammzellmarker-Expression korrelieren mit abschließlicher peritonealer Metastasierung [16].

KRK vom MSS-Typ bei denen der mit Krebsstammzellen assoziierte MAPK-Signalweg, im Sinne einer *KRAS*- oder *BRAF*-Mutation, aktiviert ist und die eine niedrige  $\beta$ -Catenin-Expression aufweisen, korrelieren mit ZNS-Metastasierung [16]. Eine Mutation des Onkogens *KRAS* ist außerdem mit einer verminderten hepatischen Metastasierung und einer erhöhten pulmonalen, zentralnervösen und ossären Metastasierung verbunden. Patienten, die sich einer operativen Entfernung hepatischer Metastasen unterziehen und bei denen eine *KRAS*-Mutation festgestellt wurde, weisen ein erhöhtes Risiko für ein erneutes Auftreten von Metastasen auf. Die Metastasen treten vor allem in der Lunge, aber auch im ZNS und in den Knochen auf [34-36]. Eine Mutation des Onkogens *BRAF* führt zu einer schlechten Prognose und ist mit einer verminderten hepatischen Metastasierung sowie einer vermehrten peritonealen Metastasierung und entfernten Lymphknotenmetasta-

sen assoziiert [34]. Eine Studie fand außerdem eine Korrelation von Mutationen im MAPK-Signalweg (*KRAS*, *NRAS* oder *BRAF*-Onkogen) mit dem Auftreten von einer pulmonalen Metastasierung. In Kombination mit hoher  $\beta$ -Catenin Expression konnte zusätzlich zur Assoziation mit einer pulmonalen Metastasierung eine verminderte Wahrscheinlichkeit für eine hepatische Metastasierung festgestellt werden [1].

Die vorliegende Dissertation beruht auf den geschilderten Erkenntnissen über die verschiedenen Metastasierungsmuster und die damit einhergehenden unterschiedlichen molekulargenetischen Subtypen. Für pulmonal mKRK gibt es bislang keinen etablierten Biomarker. Die Entdeckung eines solchen Biomarkers ist von großer klinischer Relevanz, da somit die Nachsorge risikoadaptiert angepasst werden kann. Korreliert ein Biomarker mit einer pulmonalen Metastasierung, können, z.B. durch häufigere Anwendung von Thorax-CT-Untersuchungen, Metastasen frühzeitig identifiziert werden. Dies ist wichtig, da in frühen Stadien noch lokal-ablative oder minimalinvasive Therapien infrage kommen. Eine lokale Ablation pulmonaler Metastasen kann ausgewählten Patienten einen Überlebensvorteil gegenüber keiner Therapie oder alleiniger Systemtherapie verschaffen [37]. Minimalinvasive Eingriffe zur Entfernung

von pulmonalen Metastasen weisen ein der offenen Operation gleichwertiges 5-Jahres Gesamtüberleben auf. Potenzielle Vorteile des minimalinvasiven Ansatzes sind unter anderem kleinere Operationstraumata, weniger postoperative Schmerzen, kürzere Krankenhausaufenthalte, sowie weniger Adhäsionen im Falle einer Reoperation [38].

## 2.3 Das Zytokin Nodal

„Nodal“ hat in der Medizin verschiedene Bedeutungen. Der Begriff „Nodal“ leitet sich von dem lateinischen Wort „Nodus“ ab, welches mit „Knoten“ übersetzt werden kann und steht in der Medizin neben der Bedeutung als Adjektiv „einen Knoten (z.B. Lymphknoten) betreffend“ auch für das Zytokin Nodal. Die Expression dieses Zytokins wurde erstmalig im Primitivknoten von Säugetieren nachgewiesen [39]. Der Primitivknoten erfüllt die Funktion eines Organizers und ist an der Musterbildung während der Embryonalzeit beteiligt [40]. Die Gruppe der Zytokine, zu denen auch Nodal gehört, sind extrazelluläre lösliche Proteine oder Glykoproteine, welche wichtige Funktionen bei der intrazellulären Regulation und der zellulären Mobilisation ausüben. Sie sind an vielfältigen Prozessen beteiligt, darunter sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr, das Zellwachstum, die Differenzierung, der

Zelltod, die Angiogenese, sowie Entwicklungs- und Reparaturprozesse mit dem Ziel der Wiederherstellung der Homöostase. Obwohl Zytokine nur vereinzelt konstitutiv produziert werden, werden sie im Normalfall in praktisch jedem kernhaltigen Zelltyp als Reaktion auf Noxen gebildet [41]. Zytokine können darüber hinaus auch Eigenschaften maligner Tumoren unterstützen und aufrechterhalten. Wirtseigene Zytokine können die Metastasierung und Apoptose-Resistenz von Tumoren fördern [42].

Das Protein Nodal wird durch das Gen *NODAL* kodiert und dient als Signalprotein der Informationsübermittlung. Es gehört zur transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie, welche verschiedene Zytokine beinhaltet, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen regulieren [43]. Normalerweise wird Nodal hauptsächlich während der embryonalen Entwicklung exprimiert, ist essenzieller Bestandteil bei der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustands embryonaler Stammzellen und ist darüber hinaus unter anderem für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in diesem Entwicklungsstadium zuständig [43, 44].

### 2.3.1 Relevanz Nodals für Krebserkrankungen

In zahlreichen Krebsarten werden Zytokine der TGF- $\beta$  Superfamilie vermehrt exprimiert [45, 46]. Diese hohe TGF- $\beta$



Expression korreliert positiv mit der malignen Progression sowie mit einem schlechteren Überleben [45]. Als Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie vermittelt Nodal sehr ähnliche Funktionen im Kontext maligner Tumoren. Das Zytokin ist in adulten Geweben kaum zu finden, wird aber in vielen Krebsarten überexprimiert [44]. Nodal scheint hierbei zur malignen Progression von Tumoren beizutragen. Seine Expression ist bei fast jeder erforschten Krebsart mit vermehrter Tumorentstehung, Invasion und Metastasierung assoziiert [47-56]. Die Inhibition Nodals ist kommt folglich als neuer Therapieansatz infrage. In Melanomzellen führt die Hemmung Nodals zu einer verminderten Fähigkeit der Krebszellen, Tumoren zu bilden, sowie zu deren Apoptose [44]. Es gibt außerdem eine zunehmende Evidenz für den Therapieansatz, Nodal zusätzlich zur Krebstherapie, wie sie bereits angewandt wird, als therapeutischen Angriffspunkt anzuvisieren [57].

Aufgrund seiner Wirkung auf Tumorzellen ist Nodal von hoher Relevanz für Krebserkrankungen. Man führt die Wirkung Nodals in malignen Tumoren vor allem auf zwei Mechanismen zurück, die beide durch die Expression Nodals durch Tumorzellen gefördert werden. Hierunter fällt zum einen die epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und

zum anderen die Förderung von Krebsstammzellen [58-60]. Diese Mechanismen werden im Folgenden erläutert.

### 2.3.1.1 Die epithelial-mesenchymale Transition

Die Bildung von Metastasen ist eine definierende Eigenschaft maligner Tumoren. Voraussetzungen für die Metastasenbildung sind ein invasives Wachstum und das Überleben der Tumorzellen im Gefäßsystem [61]. Ähnliche Eigenschaften werden bestimmten embryonalen Zellen zugeschrieben. Man beobachtet bei malignen Tumoren bei der Tumorprogression und Metastasierung häufig eine Reaktivierung eines embryonalen Entwicklungsprogramms, der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) [62-64]. Die EMT verleiht einer Epithelzelle Eigenschaften einer speziellen Bindegewebszellart, der mesenchymalen Zellen [65-67]. Dazu zählen unter anderem eine erhöhte Migrationskapazität, Fähigkeit zu invasivem Wachstum und eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose, Eigenschaften, wie sie auch bei malignen Tumoren beobachtet werden [68]. Die EMT befähigt Tumorzellen sich vom Primärtumor loszulösen und in sekundäre Gewebe einzudringen [54]. Diese Eigenschaften sind grundlegend für den Metastasierungsprozess [66]. Es gibt des Weiteren Hinweise darauf, dass die Tumorzellen, sobald sie ihr Zielorgan erreichen, z.B.

durch den reziproken Vorgang der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) wieder in eine epitheliale Morphologie zurückkehren. Man geht davon aus, dass der EMT-Vorgang dynamisch während der Metastasierung reguliert wird [61]. Darüber hinaus scheinen die EMT und Stammzelleigenschaften von Tumoren eng zusammenzugehören. Aktuelle Studien zeigen, dass eine EMT-Aktivierung Zellen mit Stammzelleigenschaften sowie Zellen mit der Fähigkeit Tumoren zu initiieren erzeugen kann [61, 64]. Darüber hinaus, verleiht die EMT Zellen offenbar auch eine Resistenz gegen medikamentöse Therapien [61]. Ob Stammzellen durch EMT entstehen oder umgekehrt ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht [69]. Zusammengefasst ist die EMT wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus, welcher einen malignen Tumorphänotyp fördert.

### 2.3.1.2 Krebsstammzellen

Die Krebsstammzelltheorie bietet einen weiteren Erklärungsansatz für die maligne Progression von Tumoren. Wie beschrieben, ist bei vielen Krebsarten die zelluläre Invasion und EMT mit der Überexpression mit embryonalen Stammzellen assoziierter Gene verbunden [62, 70]. Dieses Stammzellen ähnliche Expressionsprofil ist mit Metastasen und Therapieresistenz, sowie einer schlechten Prognose assoziiert [2, 50, 54, 60, 71, 72].

Die Krebsstammzelltheorie geht von einer Inhomogenität der Zelltypen innerhalb eines Tumors aus, dahingehend, dass Tumoren sowohl aus einer Population von Krebs-

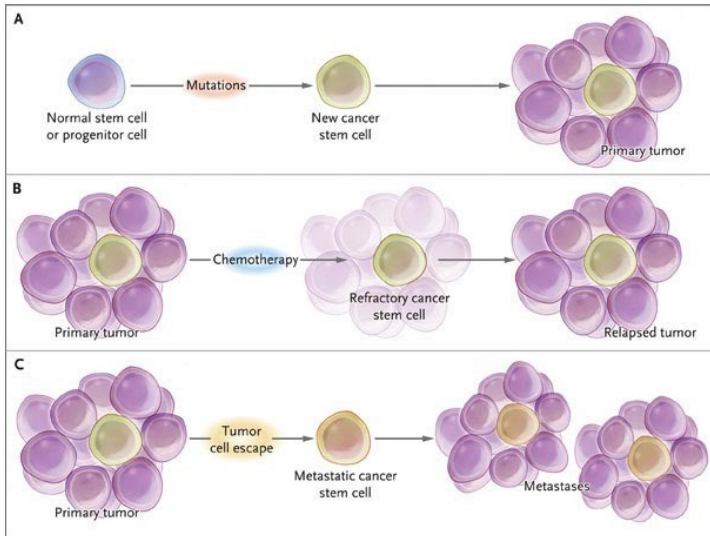


Abbildung 1 nach [2]. Szenarien die Krebsstammzellen beinhalten.

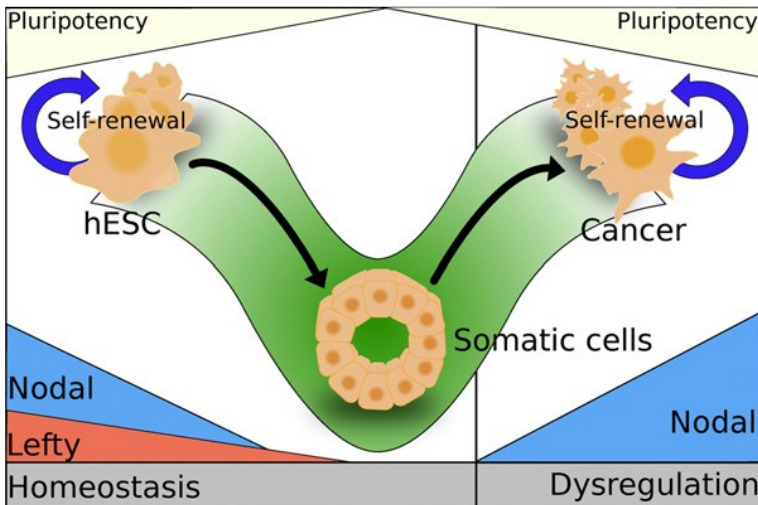
Es sind bei Tumoren bei denen Krebsstammzellen eine Rolle spielen mindestens drei Szenarien möglich. Erstens kann die Mutation einer normalen Stammzelle oder Vorläuferzelle eine Krebsstammzelle erzeugen, die dann einen Primärtumor bildet (Panel A). Zweitens kann es sein, dass durch eine Chemotherapie zwar der Großteil der Zellen des Primärtumors zerstört werden, doch wenn die Stammzellen nicht eliminiert werden, kann der Tumor erneut wachsen und ein Rezidiv verursachen (Panel B). Drittens können Krebsstammzellen, die aus einem Primärtumor entstehen in distale Gewebe auswandern und dort Metastasen bilden (Panel C).

stammzellen mit großem proliferativem Potenzial als auch aus „normalen“ Krebszellen mit nur beschränktem proliferativem Potenzial bestehen [73]. Krebsstammzellen stellen

laut der Krebsstammzelltheorie durch ihre spezifischen Eigenschaften einen wichtigen Antrieb des Krankheitsgeschehens dar. Sie bilden durch Selbsterneuerung, also den Vorgang, bei dem bei der Zellteilung aus einer Vorläuferzelle entweder eine oder zwei Tochterzellen mit den Eigenschaften der Vorläuferzelle entstehen, sowohl neue Krebsstammzellen als auch normale Krebszellen [73]. Krebsstammzellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, nach Transplantation in immundefiziente Mäuse neue Tumoren zu bilden und sind durch verschiedene Mechanismen resistenter gegen Therapien und Apoptose-Induktion, Eigenschaften, die sie für Metastasen und Rezidive verantwortlich machen können [2, 73]. Die neoplastische Proliferation der Krebsstammzellen scheint durch Signalwege, die in gesunden Zellen die Selbsterneuerung antreiben, gefördert zu werden. Somit könnten Selbsterneuerungssignalwege im Kontext eines Malignoms in fehlregulierter Weise dessen Proliferation fördern. Ein Beispiel für einen solchen Signalweg der in Krebsstammzellen dereguliert aktiviert wird ist der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der in gesunden Geweben die Selbsterneuerung fördert [73].

Aufgrund der Eigenschaften von Krebsstammzellen vermutet man, dass sich ein maligner Tumor nach Elimination

seiner Krebsstammzellen in einen benignen Tumor verwandeln müsste. Laut der Krebsstammzellentheorie ist es folglich notwendig, die Krebsstammzellen zu eliminieren, um Krebs heilen zu können. Somit kommen Krebsstammzellen auch als neues Therapieziel infrage [73].



**Abbildung 2 nach [3]. Förderung von Krebsstammzellen durch abnormale Nodal-Expression**

Dargestellt ist die Reaktivierung des Nodal-Signalwegs in malignen Tumoren. Durch diesen Prozess entdifferenzieren die betroffenen Zellen und erwerben einen stammzellähnlichen Phänotyp. In normalen Stammzellen wird ein Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren aufrechterhalten, damit als Reaktion auf bestimmte Signale eine Differenzierung ermöglicht wird. Hier sind Nodal und sein Inhibitor Lefty hervorgehoben. Krebszellen nutzen solche Signalwege für sich und erlangen in Abwesenheit der Inhibitoren einen Status des unkontrollierten Wachstums. In diesem Beispiel exprimieren Krebszellen Nodal in der Abwesenheit von Lefty.

### 2.3.2 Relevanz Nodals für das kolorektale Karzinom

Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie sind häufig in sporadischen KRK mutiert und Keimbahnmutationen dieser Signalwege verursachen ein hereditäres KRK-Syndrom, das juvenile Polyposis-Syndrom [74]. Das Lebenszeitrisiko für Karzinome des Gastrointestinaltrakts beträgt für vom juvenilen Polyposis-Syndrom Betroffene ca. 50 % [75, 76]. Darüber hinaus korreliert die aberrante Aktivierung von TGF- $\beta$  Signalwegen mit aggressiveren Formen KRK [74]. Als Mitglied dieser Gruppe von Zytokinen könnte Nodal für die maligne Progression KRK von großer Relevanz sein. Es wurde gezeigt, dass Nodal die Selbsterneuerung menschlicher Darmkrebsstammzellen fördert, und die Karzinogenese KRK auf autokrine Weise vermittelt [60]. Nodal scheint somit verantwortlich für wichtige Merkmale des malignen Phänotyps KRK zu sein [73, 77].

### 2.3.3 Der Nodal Signalweg und der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist eine Familie von Proteinen, die in viele lebenswichtige zelluläre Funktionen wie die Selbsterneuerung von Stammzellen und die Organogenese involviert ist. Neben KRK wurde eine Wnt-Aktivierung auch in Mammakarzinomen, Lungenkarzinomen und bei

der chronisch myeloischen Leukämie beobachtet und scheint hier Tumorrezidive zu fördern [78]. Wnt/ $\beta$ -Catenin trägt außerdem zur Tumorentstehung bei, indem es den Tumorzellen durch die Förderung von Krebsstammzellen einen Überlebensvorteil schafft. Bei der großen Mehrheit sporadischer KRK-Fälle beim Menschen ist der geschwindigkeitsbestimmende und initiierende Schritt die konstitutive Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs [79]. Der Signalweg trägt außerdem zur malignen Progression von Tumoren bei. Kernständiges  $\beta$ -Catenin fördert durch Bindung an Transkriptionsfaktoren und konsekutive Genexpression die Entstehung sogenannter „migrierender Krebsstammzellen“, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung besitzen [80-83]. Durch Transdifferenzierung und folglich EMT können migrierende Krebsstammzellen effizienter in das umliegende Gewebe eindringen und über den reziproken Vorgang, der mesenchymal-epithelialen Transition (MET), Metastasen in entfernten Organen bilden [80, 81].

Es scheint eine Verbindung zwischen dem Nodal Signalweg und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg im Kontext maligner Tumoren zu geben. Ergebnisse von Qi et al. zeigen, dass exogenes Nodal die maligne Progression menschlicher Krebszellen in einem Zellkulturexperiment über den



## | Einleitung

Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg aktivieren könnte, indem es die Translokation  $\beta$ -Catenins in den Zellkern bewirkt. Im Zellkern der Tumorzellen könnte  $\beta$ -Catenin die Transkription von Genen fördern, die dem Tumor Stammzeleigenschaften verleihen [84].



### 3 Zielsetzung

Diese Studie wurde in der Absicht durchgeführt retrospektiv einen Biomarker zu identifizieren, der bei KRK mit der organotropen pulmonalen Metastasierung korreliert. Es war insbesondere unsere Absicht Unterschiede zwischen KRK die in die Lunge und die Leber metastasieren zu identifizieren.

Bislang wurde der Zusammenhang zwischen Nodal und einer organotropen pulmonalen Metastasierung KRK noch nicht untersucht. Unsere Studie sollte durch die Validierung Nodals im Patientenkollektiv einen Beitrag zur Einschätzung der Prognose, sowie zur individuellen Nachsorge- und Therapieplanung leisten. Wir konnten in unserer Studie eine Korrelation der Ergebnisse mit  $\beta$ -Catenin nachweisen.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Kollektiv

In Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik III des LMU-Klinikums und dem Tumorregister München wurde ein Patientenkollektiv aus KRK-Patienten mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung (n=74), mit einer isolierten hepatischen Metastasierung (n=74) und KRK ohne Metastasen über einen fünfjährigen Beobachtungszeitraum (n=74) erstellt.

Es wurden im Tumorregister München gemeldete Patienten in die Studie eingeschlossen, die sich innerhalb von 1998 bis 2013 einer chirurgischen Tumorresektion unterzogen hatten. Biopsien wurden aus dem Patientenkollektiv ausgeschlossen.

Um eine Homogenität der Vergleichsgruppen zu gewährleisten und eventuelle Störfaktoren zu minimieren wurden die drei Gruppen jeweils im Hinblick auf das T-Stadium, Differenzierungsgrad und Geschlecht abgestimmt.

**Tabelle 1: Klinisch-pathologische Patientendaten in Korrelation zum Metastasierungsstatus**

<b>Merkmal</b>	<b>Gesamt</b>	<b>PUL</b>	<b>M0</b>	<b>HEP</b>	<b>p</b>
Gesamt	222 (100,0)	74 (33,3)	74 (33,3)	74 (33,3)	
Geschlecht					
weiblich	89 (40,1)	24 (10,8)	37 (16,7)	28 (12,6)	0,083
männlich	133 (59,9)	50 (22,5)	37 (16,7)	46 (20,7)	
Alter bei Erstdiagnose des KRK					
Median	66,8	64	72,3	62,9	
≥ 70	90 (40,5)	26 (11,7)	43 (19,4)	21 (9,5)	<b>&lt; 0,001</b>
≥ 65 < 70	33 (14,9)	9 (4,1)	14 (6,3)	10 (4,5)	
< 65	99 (44,6)	39 (17,6)	17 (7,7)	43 (19,4)	
Lokalisation Primarius (I)					
Kolon	94 (42,3)	22 (9,9)	45 (20,3)	27 (12,2)	<b>0,001</b>
Rektosigmoid	22 (9,9)	6 (2,7)	6 (2,7)	10 (4,5)	
Rektum	106 (47,7)	46 (20,7)	23 (10,4)	37 (16,7)	
Lokalisation Primarius (II)					
rechtsseitig	27 (12,2)	9 (4,1)	9 (4,1)	9 (4,1)	1,000
linksseitig	195 (87,8)	65 (29,3)	65 (29,3)	65 (29,3)	
Differenzierungsgrad (WHO)					
G2	149 (67,1)	49 (22,1)	50 (22,5)	50 (22,5)	0,980
G3	73 (32,9)	25 (11,3)	24 (10,8)	24 (10,8)	
pT Stadium (UICC)					
T0	2 (0,9)	2 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,755
T1	8 (3,6)	2 (0,9)	3 (1,4)	3 (1,4)	
T2	29 (13,1)	10 (4,5)	8 (3,6)	11 (5,0)	
T3	159 (71,6)	53 (23,9)	54 (24,3)	52 (23,4)	
T4	21 (9,5)	6 (2,7)	7 (3,2)	8 (3,6)	
unbekannt	3 (1,4)	1 (0,5)	2 (0,9)	0 (0,0)	
pN Status					
N0	105 (47,3)	29 (13,1)	48 (21,6)	28 (12,6)	<b>0,001</b>
N+	112 (50,5)	41 (18,5)	25 (11,3)	46 (20,7)	
unbekannt	5 (2,3)	4 (1,8)	1 (0,5)	0 (0,0)	

Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant. PUL steht für KRK mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung, HEP für KRK mit einer isolierten hepatischen Metastasierung, M0 für KRK ohne Metastasen über einen 5-jährigen Beobachtungszeitraum.

Eine Übersicht über die wichtigsten Patienten- und Tu-

morcharakteristika unseres Kollektivs sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Die in unsere Studie aufgenommenen molekularpathologischen Parameter, wie die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs (Immunhistochemie für  $\beta$ -Catenin), lagen aus einem anderen, von Michl et al. publizierten, Projekt unserer Arbeitsgruppe vor [1]. Es handelte sich bei unserem und bei Michl et al.s Kollektiv um dieselbe Kohorte. Michl et al.s Daten wurden jedoch im Rahmen eines anderen Projekts generiert und publiziert.

## 4.2 Methodik

### 4.2.1 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden Primär-Antikörper für Nodal (Firma: Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Cat. No.: PA5-28486) verwendet, das genutzte Detektionssystem war ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit (Fa. Vector, MP-7401).

Zunächst wurden die Proben entparaffiniert. Als Vorbehandlung wurden die Proben in der Mikrowelle (750 W, Antigen Retrieval AR-10 (Fa. DCS, HK057-5KE)) 2x15 min gekocht und 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Proben

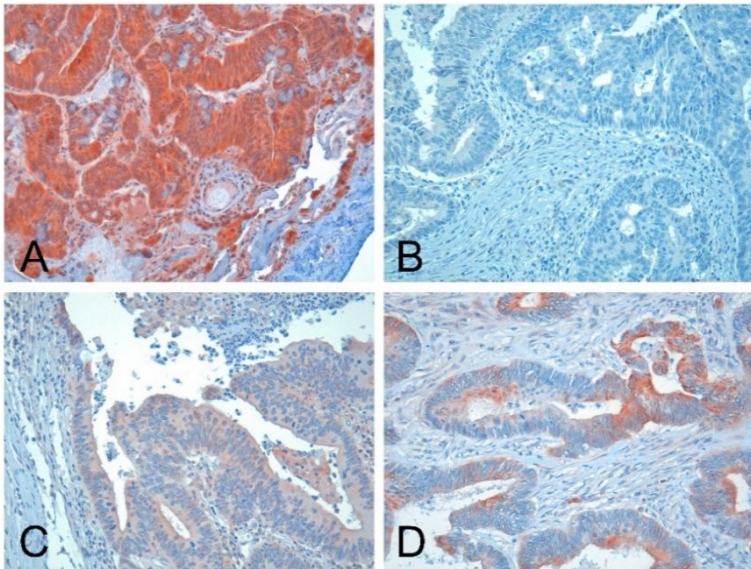
bei Raumtemperatur 10 min 7,5% wässrigem Wasserstoffperoxid ausgesetzt. Daraufgehend wurde für 20 min das Serum geblockt (Kit siehe oben) und der Überstand abgekippt. Als Primär-Antikörper wurden Antikörper gegen Nodal (1:100) dazugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Anti-Rabbit IgG (Kit siehe oben) für 30 min zur Probe hinzugegeben. Als Chromogen wurde für 3 min DAB+ (Fa. Agilent Technologies, K3467) hinzugegeben. Zur Gegenfärbung wurde für 10 sec. mit Hematoxylin Gill's Formula (Fa. Vector, H-3401) gefärbt. Zur Eindeckung wurde Aquatex (Fa. Merck, 1.08562.0050) verwendet.

Zwischen den erläuterten Schritten wurde je 2x5 Minuten mit TRIS-Puffer gespült und/oder 10 Minuten fließend gewässert.

Insgesamt waren 222 immunhistochemisch gefärbte Schnitte auswertbar. Die Färbungen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (TS und JN) ausgewertet. Diskrepante Fälle wurden gemeinsam mikroskopiert, um einen Konsens zu finden. Zur Anwendung kam dabei der sog. H-Score. Es wurde jeweils die Stärke der Färbung (0 = nicht angefärbt, 1+ = leicht angefärbt, 2+ = mäßig ange-



färbt, 3+ = stark angefärbt) und prozentuale Anteil des angefärbten Tumorgewebes (5, 10, 20, ..., 90, 100%) erhoben. Hierbei wurde die Prozentzahl des angefärbten Tumorgewebes mit der jeweiligen, die Stärke der Färbung repräsentierenden Zahl multipliziert, um den H-Score zu erhalten. Es wurden 222 gefärbte Schnitte ausgewertet und die Ergebnisse wurden mit dem Programm Microsoft® Office Excel 2016 und 2019 festgehalten.



**Abbildung 3** immunhistochemische Färbung von Nodal (200fache Vergrößerung).

Stark angefärbte Zellen (A) wurden als stark Nodal positiv gewertet, nicht angefärbte Zellen (B) als Nodal negativ. Insgesamt waren die Tumorzellen heterogen angefärbt, mit sowohl homogenen (C) als auch heterogen angefärbten Abschnitten (D).

## 4.3 Statistische Methoden

Für die statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS® Version 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Für alle durchgeführten Tests wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

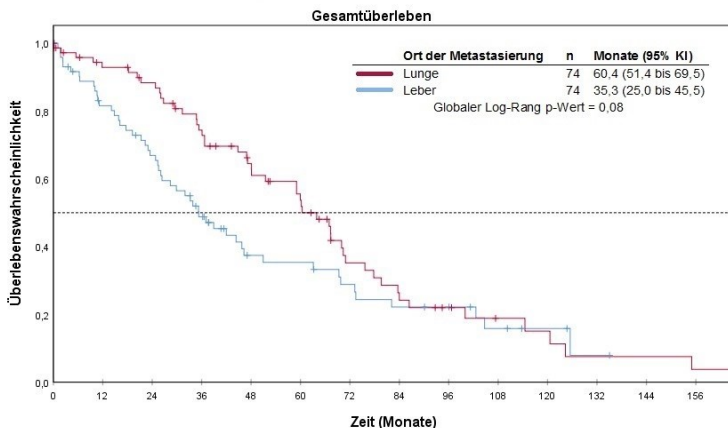
Die Überlebenszeitdaten wurden über Kaplan-Meier-Analysen ausgewertet. Es wurde jeweils das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben von KRK-Patienten mit einer isolierten pulmonalen im Vergleich zu einer isolierten hepatischen Metastasierung, sowie einer isolierten pulmonalen und hepatischen Metastasierung mit jeweils niedrigem oder hohem H-Score für Nodal, dargestellt. Zur Überprüfung auf Unterschiede der Kurven wurde der Log-Rang Test durchgeführt. Es wurde außerdem die mediane Überlebenszeit inklusive 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Die Patienten- und Tumorcharakteristika wurden über Chi-Quadrat-Tests auf Unabhängigkeit und über Risikoschätzer auf Unterschiede in den Chancen geprüft.

# 5 Ergebnisse

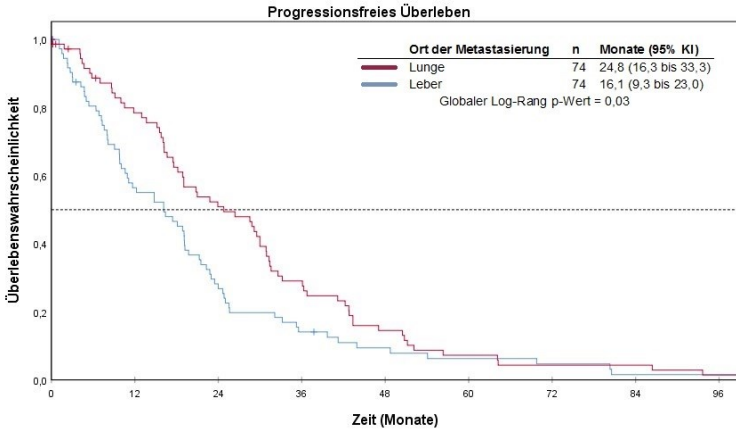
## 5.1 Überlebenszeit-Analysen

Für das Gesamtüberleben konnte man ein längeres Überleben für Patienten mit einer pulmonalen Metastasierung erkennen, welches jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (**Abbildung 4**). Für das progressionsfreie Überleben lässt sich der gleiche Trend erkennen, hierbei konnte die statistische Signifikanz erreicht werden ( $p = 0,03$ , **Abbildung 5**), jedoch war aufgrund der sich kreuzenden Kurven keine proportional Hazards Annahme möglich.



**Abbildung 4.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum jeweils für pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome.

## Ergebnisse

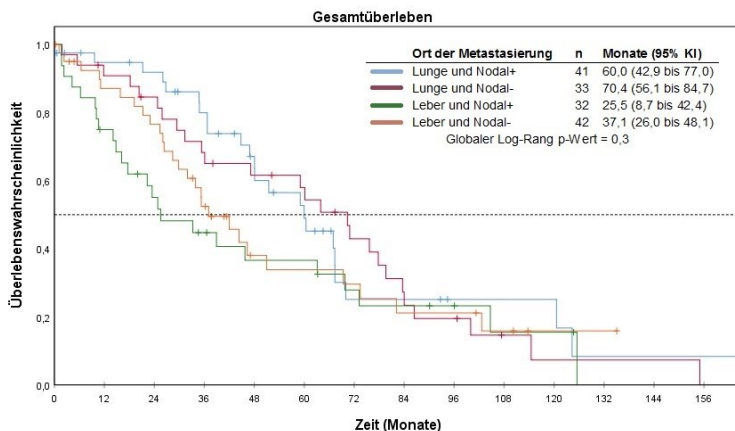


**Abbildung 5.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum jeweils für pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome.

Für die Kurven mit Unterscheidung zwischen hohem und niedrigem H-Score für Nodal konnte für den Log-Rang-Test keine statistische Signifikanz erreicht werden.

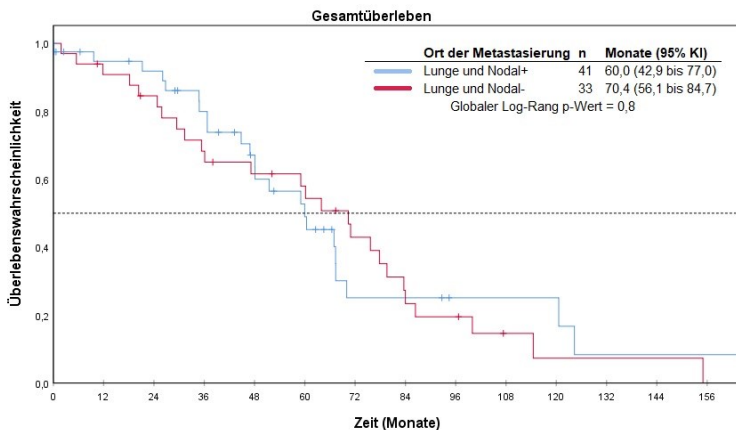
Als Trend ließ sich auch hier erkennen, dass KRK-Patienten mit einer pulmonalen Metastasierung ein besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben aufwiesen als Patienten mit einer isolierten hepatischen Metastasierung (**Abbildung 6, Abbildung 9**). Außerdem wiesen in der Gruppe der hepatisch mKRK Nodal-exprimierende Tumoren eine schlechtere Überlebenszeit auf im Gegensatz zu KRK mit geringer Nodal-Expression (**Abbildung 8, Abbil-**

**ung 11).** Für die pulmonal mKRK war kein klarer Unterschied zwischen KRK-Patienten mit hoher und niedriger Nodal Expression erkenntlich (**Abbildung 7, Abbildung 10).**

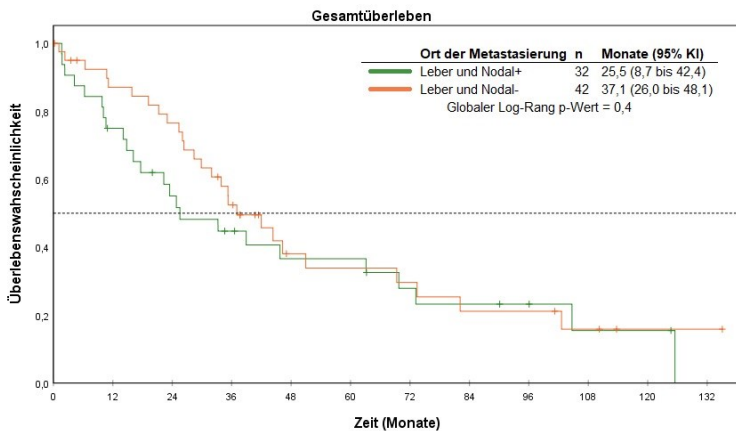


**Abbildung 6.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für jeweils pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.

## Ergebnisse

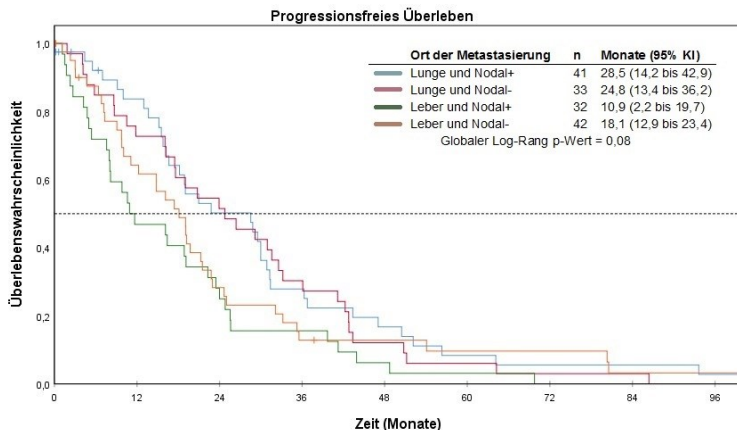


**Abbildung 7. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungszeitraum für pulmonal metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.**

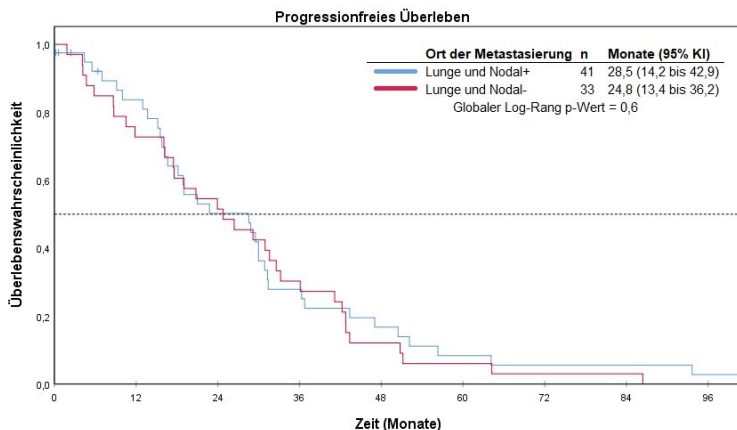


**Abbildung 8. Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungszeitraum für hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.**

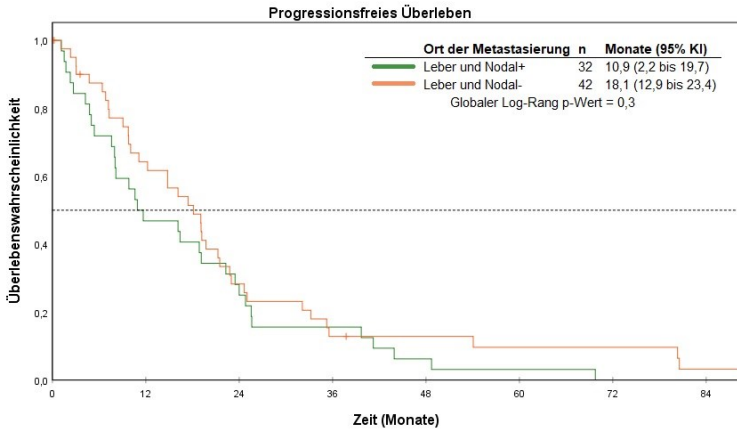
## Ergebnisse



**Abbildung 9.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für jeweils pulmonal oder hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.



**Abbildung 10.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für pulmonal metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.



**Abbildung 11.** Kaplan-Meier-Kurven des ersten bestätigten Progressions- oder Mortalitätsereignisses bis zum letzten Beobachtungsdatum für hepatisch metastasierte kolorektale Karzinome mit jeweils hoher oder niedriger Nodal-Expression.

## 5.2 Kategorie Nodal und klinisch-pathologische Patientendaten

Eine hohe Nodal Expression korrelierte mit einer rechtsseitigen Tumorlokalisation ( $p=0,028$ ;  $OR=0,39$  (0,17 – 0,92), **Tabelle 2**). Für den Differenzierungsgrad, das pT Stadium und den pN Status konnte keine signifikante Korrelation mit der Kategorie Nodal gefunden werden. Es konnte eine signifikante Korrelation einer hohen Nodal Expression mit einem erhöhten nukleären  $\beta$ -Catenin Wert ( $p=0,002$ ;  $OR=2,29$  (1,33 – 3,92), **Tabelle 2**) festgestellt werden.



**Tabelle 2: Klinisch-pathologische Patientendaten in Korrelation zur Kategorie Nodal**

Merkmal	Gesamt	Nodal		p	OR (95% KI)
		low	high		
Gesamt	222 (100,0)	118 (53,2)	104 (46,8)		
Geschlecht					
weiblich	89 (40,1)	51 (23,0)	38 (17,1)	0,311	0,76 (0,44 - 1,30)
männlich	133 (59,9)	67 (30,2)	66 (29,7)		
Alter bei Erstdiagnose des KRK					
Median	66,8	67,5	66,6		
≥ 70	90 (40,5)	48 (21,6)	42 (18,9)	0,979	
≥ 65 < 70	33 (14,9)	18 (8,1)	15 (6,8)		
< 65	99 (44,6)	52 (23,4)	47 (21,2)		
Lokalisation Primarius (I)					
Kolon	94 (42,3)	52 (23,4)	42 (18,9)	0,634	
Rektosigmoid	22 (9,9)	13 (5,9)	9 (4,1)		
Rektum	106 (47,7)	53 (23,9)	53 (23,9)		
Lokalisation Primarius (II)					
rechtsseitig	27 (12,2)	9 (4,1)	18 (8,1)	<b>0,028</b>	<b>0,39 (0,17 - 0,92)</b>
linksseitig	195 (87,8)	109 (49,1)	86 (38,7)		
Differenzierungsgrad (WHO)					
G2	149 (67,1)	79 (35,6)	70 (31,5)	0,955	0,98 (0,56 - 1,73)
G3	73 (32,9)	39 (17,6)	34 (15,3)		
pT Stadium (UICC)					
T0	2 (0,9)	0 (0,0)	2 (0,9)	0,388	
T1	8 (3,6)	6 (2,7)	2 (0,9)		
T2	29 (13,1)	16 (7,2)	13 (5,9)		
T3	159 (71,6)	82 (36,9)	77 (34,7)		
T4	21 (9,5)	12 (5,4)	9 (4,1)		
unbekannt	3 (1,4)	2 (0,9)	1 (0,5)		
pN Status					
N0	105 (47,3)	58 (26,1)	47 (21,2)	0,610	1,15 (0,67 - 1,96)
N+	112 (50,5)	58 (26,1)	54 (24,3)		
unbekannt	5 (2,3)	2 (0,9)	3 (1,4)		
β-Catenin*					
<30%	120 (54,1)	75 (33,8)	45 (20,3)	<b>0,002</b>	<b>2,29 (1,33 - 3,92)</b>
>30%	102 (45,9)	43 (19,4)	59 (26,6)		

Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant. \*die Daten zur β-Catenin-Expression allein wurden aus einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe erhoben [1].

### 5.3 Kategorie Nodal und Metastasierungsstatus

Es ließ sich hierbei für die Korrelation zwischen Nodal und einer pulmonalen Metastasierung ein leichter Trend erkennen, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (**Tabelle 3**).

**Tabelle 3: Kategorie Nodal in Korrelation zum Metastasierungsstatus**

Merkmal	Gesamt	PUL	M0	HEP	p
Gesamt	222 (100,0)	74 (33,3)	74 (33,3)	74 (33,3)	
Kategorie Nodal					
low	118 (53,2)	33 (14,9)	43 (19,4)	42 (18,9)	0,193
high	104 (46,8)	41 (18,5)	31 (14,0)	32 (14,4)	

Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant. PUL steht für KRK mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung, HEP für KRK mit einer isolierten hepatischen Metastasierung, M0 für KRK ohne Metastasen über einen 5-jährigen Beobachtungszeitraum.

Es konnte keine signifikante Korrelation für die Kategorie Nodal mit den unterschiedlichen Metastasierungsgruppen erwiesen werden (**Tabelle 4**).

**Tabelle 4: Kategorie Nodal in Korrelation zu verschiedenen Metastasierungssubgruppen**

<b>Merkmal</b>	<b>M0 ↔ M1</b>	<b>HEP ↔ PUL</b>	<b>PUL ↔ M0</b>	<b>HEP ↔ M0</b>
Kategorie Nodal low high	0,295	0,139	0,100	0,868

Fett gedruckte Werte sind statistisch signifikant. Angegeben sind die p-Werte. PUL steht für KRK mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung, HEP für KRK mit einer isolierten hepatischen Metastasierung, M0 für KRK ohne Metastasen über einen 5-jährigen Beobachtungszeitraum, M1 ist aus den Untergruppen PUL und HEP zusammengesetzt.



## 6 Diskussion

KRK stellen eine heterogene Erkrankung dar und die Tumorbilologie hat einen wesentlichen Einfluss auf das Therapieansprechen und die Prognose [\[85-87\]](#).

Unsere Studie basiert auf der Annahme, dass es Biomarker für bestimmte biologische Tumorsubtypen gibt, die mit einem spezifischen Metastasierungsmuster einhergehen. Solche Biomarker sind von hoher klinischer Relevanz, da sie zur Risikostratifizierung dienen können. Bei einem erhöhten Risiko einer Metastasierung in ein bestimmtes Organ können durch intensiverte Vorsorge Metastasen in einem frühen Stadium entdeckt werden, in dem lokal-ablative oder minimalinvasive Therapien und die damit verbundenen (Überlebens)-Vorteile noch möglich sind.

Der neuartige Ansatz unserer Studie ist ihr Endpunkt, da wir nicht wie viele bisherige Studien das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben untersuchten, sondern die Studie auf den Vergleich verschiedener organotroper Metastasierungsmuster bzw. Metastasierungslokalisationen gepowert war. Dadurch konnten wir Unterschiede zwi-

schen den einzelnen Metastasierungsmustern ausmachen, wie es durch eine konventionelle klinische Studie nicht möglich gewesen wäre.

Durch das Fall-Kontroll-Design können für seltene Metastasierungsmuster ausreichend große Gruppen formiert werden. Somit macht dieses Studiendesign es möglich, für das selten auftretende KRK mit isolierter pulmonaler Metastasierung neue potenzielle Biomarker zu identifizieren [9]. Es können im Vergleich zu größer angelegten Studien schnell Ergebnisse erhalten werden, welche hypothesengenerierend und Ausgang für weitere Studien sein können. Durch das Fall-Kontroll-Design wird trotz einer kleineren Fallzahl eine gute Aussagekraft gewährleistet. Je nach Ergebnis ist eine Überprüfung in größer angelegten Studien notwendig [88]. Außerdem kann bei retrospektiven Studien unter anderem ein Recall-Bias auftreten. Durch das in unserer Arbeit gewählte Studiendesign können Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Risikofaktor und Erkrankung gemacht werden, kausale Beziehungen müssen über Laborstudien überprüft werden. Über den Zeitraum vom Auftreten des Risikofaktors bis zur Entwicklung der Krankheit können über Fall-Kontroll-Studien keine Aussagen gemacht werden.

Es wurde für die Validierung des Zytokins Nodal als Biomarker für das pulmonal mKRC im Design einer Fall-Kontroll-Studie ein Kollektiv aus 222 Patienten mit Erstdiagnose des KRC zwischen 1998 und 2013 zusammengestellt. Die aus dem Kollektiv gewonnenen histologischen Schnitte wurden immunhistochemisch für Nodal gefärbt. Die Färbungen wurden über den semiquantitativen H-Score ausgewertet. Da die Tumoren eine heterogene Nodal Expression aufwiesen, konnte über den H-Score, welcher sowohl die Intensität der Färbung als auch die Prozentzahl der angefärbten Zellen berücksichtigt, eine gute Einschätzung der Nodal-Expression erfolgen.

Aufgrund der Assoziation Nodals mit Krebsstammzellen und EMT gibt es Anlass zur Vermutung, dass Nodal vor allem an der Invasionsfront der Tumoren lokalisiert ist [58-60, 89, 90]. Nodal war in unserer Studie jedoch eher heterogen im gesamten Tumor verbreitet. Die Gründe für die Verteilung Nodals in KRC bleiben noch zu klären. Des Weiteren war das Nodal-Protein in den immunhistochemischen Färbungen hauptsächlich zytoplasmatisch exprimiert, was sich mit Ergebnissen anderer Studien deckt [90, 91]. Nodal wirkt über membranständige Rezeptoren und somit könnte man vermuten, dass Nodal in KRC vermehrt im Extrazellulärraum lokalisiert sein sollte, sofern Nodal eine Wirkung

auf die Tumorzellen hat. Wieso Nodal bei vielen Tumoren vor allem zytoplasmatisch lokalisiert ist und ob Nodal eventuell auch intrazellulär Funktionen erfüllt, bleibt durch weitere Studien zu klären.

Die Lokalisation des Primarius korrelierte in unserer Studie mit dem Metastasierungsmuster. Wir konnten zeigen, dass die Lokalisation des Primarius im Rektum mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung und an zweiter Stelle mit einer isolierten hepatischen Metastasierung korrelierte. Unsere Ergebnisse zur isolierten pulmonalen Metastasierung decken sich mit einer bereits veröffentlichten Studie, welche ein erhöhtes Risiko für isolierte pulmonale Metastasierung bei Patienten mit rektalen Adenokarzinomen im Vergleich zu Patienten mit Adenokarzinomen des Dickdarms zeigte [92]. In unserem Kollektiv handelte es sich bei 99 % der Fälle um Adenokarzinome und deren Unterformen (die Daten hierzu sind nicht aufgeführt). Die von uns gefundene Korrelation mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung erklärt sich wahrscheinlich durch anatomische Gegebenheiten, da distale Rektumkarzinome im Gegensatz zu Kolonkarzinomen über den Blutabfluss die Leber umgehen können und als erstes Organ die Lunge antreffen [12]. Der venöse Abfluss des Dickdarms wird größ-



tenteils über die Pfortader gewährleistet, wodurch die Tumorzellen zuerst die Leber antreffen, welche bei KRK auch den ersten Ort der Metastasierung darstellt, gefolgt von den Lungen und anderen Lokalisationen [23, 92]. Distale Rektumkarzinome können jedoch initial in die Lunge metastasieren, da die mittlere und die untere Rektalvene in die Vena cava und nicht über die Pfortader abfließen [92]. Forschungsergebnisse zeigten außerdem, dass neben dem Blutfluss auch andere Faktoren die Ausbildung von Metastasen in bestimmten Organen beeinflussen. Man kann bei vielen Krebsarten, wie in unserer Studie beobachtet, ein bestimmtes Metastasierungsmuster erkennen, dahingehend, dass die Karzinome bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren und/oder in manche Organe seltener metastasieren. Dies wird aufgrund von Studienergebnissen über die „Seed and Soil“-Hypothese erklärt. Man geht hierbei davon aus, dass molekulare Interaktionen zwischen der jeweiligen Tumorzelle und der Mikroumgebung im Organ für das spezifische Metastasierungsmuster verantwortlich sind. Es gibt darüber hinaus Hinweise darauf, dass der Blutfluss gemeinsam mit der „Seed and Soil“-Hypothese das Metastasierungsmuster von Tumoren erklären könnte. In vielen Fällen kann das Metastasierungsverhalten vorrangig durch den Blutfluss erklärt werden, da Tumorzellen

aufgrund ihrer Größe meistens im Kapillarbett des ersten Organs, das sie antreffen zurückgehalten werden. Ob sich in dem Organ, das über den Blutfluss erreicht wird, Metastasen ausbilden, scheint dann entsprechend der „Seed and Soil“-Hypothese von den Interaktionen der Tumorzelle mit der Mikroumgebung im Organ abzuhängen [23]. Somit könnte Korrelation von Rektumkarzinomen mit isolierten pulmonalen Metastasen darin begründet sein, dass distale Rektumkarzinome über den venösen Blutabfluss als erstes Organ die Lunge antreffen und die Tumorzellen die biologischen Charakteristika besitzen, die für eine isolierte pulmonale Metastasierung notwendig sind. Man geht bei einer isolierten Metastasierung in ein Organ entsprechend der Theorie der Oligometastasen von einer gutartigen Tumorbilologie aus als bei einer weit ausgedehnten Metastasierung [9].

Auch die in unserer Studie festgestellte Tendenz von Rektumkarzinomen isoliert hepatisch zu Metastasieren lässt sich maßgeblich über den Blutfluss erklären. So ist entsprechend einer eher proximalen oder distalen Lage des Rektumkarzinoms der Abfluss über die mittlere und untere Rektalvene in manchen Fällen nicht gewährleistet und proximale Rektumkarzinome metastasieren somit primär in die Leber. In einer Autopsie-Studie, die 1238 Patienten mit

metastasierten Kolon- und 441 Patienten mit metastasierten Rektumkarzinomen beinhaltetete, konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens einer hepatischen Metastasierung hinsichtlich der Lokalisation des Primärtumors gefunden werden [92]. In unserer Studie waren hingegen 28,7 % der Kolon- und 34,9 % der Rektumkarzinome hepatisch metastasiert und der Zusammenhang war statistisch signifikant. Es ist zu beachten, dass unsere Studie sich auf die Subgruppe der isolierten hepatischen Metastasierung konzentrierte. Somit könnten unserer Ergebnisse bedeuten, dass manche Rektumkarzinome im Gegensatz zu Kolonkarzinomen dazu tendieren, ausschließlich in die Leber zu metastasieren. Eventuell könnte dies ein Hinweis auf unterschiedliche biologische Charakteristika von Kolon- und Rektumkarzinomen sein, welche entsprechend der „Seed and Soil“-Hypothese zu einem speziellen Metastasierungsmuster führen.

Für Karzinome des rektosigmoidalen Übergangs konnte die stärkste Korrelation zu einer isolierten hepatischen Metastasierung festgestellt werden. Dieser Zusammenhang hat jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl in dieser Gruppe eine eingeschränkte Aussagekraft (10 Tumoren mit einer hepatischen Metasierung von 22 rektosigmoidalen Karzi-

nomen insgesamt). Folgende Punkte könnten die festgestellte Korrelation erklären: Zum einen metastasieren Kolon- und Rektumkarzinome wie beschrieben beide isoliert in die Leber. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass bei der Gruppe der Rektumkarzinome aufgrund des venösen Blutabflusses über die Pfortader vor allem proximale Rektumkarzinome ein solches Metastasierungsverhalten zeigen. Da hauptsächlich Karzinome im proximalen Rektum und Karzinome im Kolon sigmoideum zur Gruppe der Karzinome des rektosigmoidalen Übergangs gerechnet werden, sind somit die Rektumkarzinome, die aufgrund anatomischer Gegebenheiten in die Lunge metastasieren würden, in diesem Fall tendenziell eher exkludiert. Dies könnte eine Erklärung für die starke Assoziation mit einer isolierten hepatischen Metastasierung bei Karzinomen des rektosigmoidalen Übergangs geben.

In unserer Studie waren außerdem Kolonkarzinompatienten signifikant größtenteils in der Gruppe, der nicht metastasierten Tumoren anzutreffen. Rektumkarzinome hingegen waren wie beschrieben primär pulmonal metastasiert, gefolgt von hepatischer Metastasierung. Da die Metastasierung ein entscheidender Faktor für das Überleben von Krebspatienten ist, könnte das Ergebnis unserer Studie

eventuell auf eine schlechtere Prognose von Rektumkarzinom-Patienten im Vergleich zu Kolonkarzinom-Patienten hindeuten. Es ist jedoch zu beachten, dass in unserer Studie lediglich eine isolierte Metastasierung in die Lunge und Leber untersucht wurde. Dennoch könnte dieses unterschiedliche Metastasierungsverhalten Hinweise auf unterschiedliche tumorbiologische Charakteristika von Kolon- und Rektumkarzinomen geben [9]. Eine schlechtere Prognose für Rektumkarzinome im Vergleich zu Kolonkarzinomen deckt sich mit den Ergebnissen weiterer Studien [93, 94]. Es konnte außerdem in Studien bei Rektumkarzinomen im Vergleich zu Kolonkarzinomen eine vermehrte Expression des Tumormarkers CEA, welcher mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, sowie nukleären  $\beta$ -Catenins und des Tumorproteins p53 festgestellt werden [93, 95-98]. Diese Ergebnisse könnten Hinweise auf eine unterschiedliche Tumorbiologie von Kolon- und Rektumkarzinomen sein [93]. Li et al. schlagen dementsprechend vor, KRK in proximale Kolonkarzinome, distale Kolonkarzinome und Rektumkarzinome einzuteilen. Unsere Ergebnisse geben ebenfalls Hinweise auf einen möglichen biologischen Unterschied zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen. Die Datenlage hierzu ist jedoch nicht eindeutig, weshalb weitere Forschung notwendig ist, die sich gezielt auf

die Unterschiede der einzelnen Subgruppen fokussiert. Eventuell könnten sich dadurch eine individuellere Versorgung und neue individualisierte Behandlungsmöglichkeiten ergeben [99]. Es ist jedoch noch unklar, ob es sinnvoll wäre für Kolon- und Rektumkarzinome unterschiedliche zielgerichtete Therapien anzuwenden [92]. Die Angriffspunkte für Medikamente sind vermutlich für Rektumkarzinome und distale Kolonkarzinome sehr ähnlich [92, 100-102].

Des Weiteren korrelierte das Alter bei der Erstdiagnose in unserer Studie signifikant positiv mit einem Metastasierungsstatus M0 und negativ mit dem Auftreten einer pulmonalen oder hepatischen Metastasierung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass metastasierte Tumoren durch die Metastasen und ein aggressiveres Wachstum früher zu Komplikationen führen, wodurch es bereits früher als bei nicht metastasierten Tumoren zu einer Diagnose kommen könnte. Welche Mechanismen für diese in unserer Studie festgestellte Korrelation verantwortlich sind, bleibt durch weitere Studien zu klären.

Für den Differenzierungsgrad und das pT-Stadium in Korrelation zum Metastasierungsstatus konnte in unserer Stu-

die das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Die Ergebnissen von Gabbert et al. unterscheiden sich von unseren Ergebnissen und zeigen als mögliche Erklärung für die schlechtere Prognose bei entdifferenzierten Tumoren, dass es eine erhöhte Invasivität bei diesen Tumoren im Gegensatz zu differenzierten Tumoren geben könnte [103]. Folglich neigen entdifferenzierte Tumoren vermehrt zu Metastasen. Das diskrepante Ergebnis unserer Studie lässt sich dadurch erklären, dass die jeweiligen Metastasierungskategorien, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, für die Parameter Differenzierungsgrad, T-Stadium und Geschlecht aufeinander abgestimmt wurden. Deshalb war per definitionem keine Korrelation für diese Parameter möglich.

Patienten mit dem Metastasierungsstatus M0 wiesen in unserer Studie signifikant seltener tumorpositive Lymphknoten auf. Dieses Ergebnis scheint jedoch eher zufällig zustande gekommen zu sein, da unser Kollektiv auf M0 vs. M1 und nicht auf N0 vs. N1 gepowert war.

Des Weiteren konnte die in den Genexpressionsanalysen angedeutete differenzielle Expression Nodals in unserem Patientenkollektiv nicht validiert werden. Obgleich sich ein

Trend andeutete, gab es keine signifikante Korrelation zwischen Nodal und KRK mit isolierter pulmonaler Metastasierung. Da in unserer Studie rechtsseitige KRK im Vergleich zu Linksseitigen vermehrt Nodal exprimierten, wäre es möglich, dass in der Gruppe mit niedriger Nodal-Expression aufgrund der häufigeren Tumorlokalisation im linken Kolon und Rektum vermehrt Tumoren mit pulmonaler Metastasierung vertreten waren. Diese Vermutung basiert darauf, dass distale Rektumkarzinome vermehrt zu einer pulmonalen Metastasierung neigen [12]. Möglicherweise konnte aus diesem Grund das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. In zukünftigen Studien könnte man aufgrund der in unserer Studie erkannten leicht vermehrten Nodal-Expression in rechtsseitigen Primären die Auswirkungen einer hohen Nodal Expression auf das Auftreten einer pulmonalen Metastasierung in Kolonkarzinomen allein überprüfen.

Entsprechend der Theorie der Oligometastasen stellt eine auf ein oder zwei Organe begrenzte Metastasierung ein Stadium zwischen einer örtlich begrenzten Krankheit und einer weit ausgedehnten Metastasierung dar [9, 18]. Möglicherweise befinden sich aufgrund der mit einer Nodal-Expression assoziierten schlechten Prognose Nodal exprimierende Tumoren nicht im Stadium der Oligometastasen,



sondern häufig bereits in einem Stadium der ausgedehnten Metastasierung. Nodal exprimierende Tumoren könnten theoretisch auch präferenziell in zwei Organe gleichzeitig metastasieren. Diese Formen der Metastasierung entsprechen ebenfalls der Oligometastasierung [18]. Jedoch legen die Ergebnisse unserer Studie nahe, dass mit der Leber und der Lunge die zwei häufigsten Lokalisationen isolierter Metastasierung nicht mit einer Nodal-Expression korrelieren [9].

Des Weiteren deutete sich in unserer Studie ein Trend für ein besseres Überleben von Patienten mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung im Vergleich zu Patienten mit einer isolierten hepatischen Metastasierung an. Für das progressionsfreie Überleben erreichte der Log-Rang-Test hierbei statistische Signifikanz, wenngleich sich die Kurven kreuzten. Diese festgestellten Trends stehen im Einklang mit den Ergebnissen einer vergleichbaren Studie von Michl et al [1]. Weitere Studien bestätigen ebenfalls unser Ergebnis [9, 19, 104].

Für die Überlebenszeitanalysen von pulmonal und hepatisch metastasierten Patienten unter Berücksichtigung der Kategorie Nodal konnte man vor allem bei der isolierten

hepatischen Metastasierung einen Trend erkennen. Tendenziell wiesen in dieser Gruppe Nodal exprimierende Tumoren eine schlechtere Prognose auf als Tumoren mit geringer Nodal-Expression. Es konnte jedoch hierfür in den Log-Rang-Tests keine statistische Signifikanz erreicht werden. Die in unserer Studie festgestellten Trends werden durch andere Studien bestätigt, in welchen Tumoren mit Nodal exprimierende Tumoren mit einer schlechten Prognose korrelierten [90, 105].

Dass das Signifikanzniveau in einigen Fällen nicht erreicht wurde, liegt vermutlich daran, dass unser Kollektiv nicht gezielt für Kaplan-Meier-Analysen designiert wurde. In der Regel werden Kaplan-Meier-Analysen in meist prospektiven Kohortenstudien angewandt [106]. Dementsprechend ist aufgrund des Fall-Kontroll-Designs die Fallzahl in unserer Studie eher klein für eine derartige Analyse. Das Überleben stellte auch nicht den primären Endpunkt unserer Studie dar. Bei der Auswahl der Patienten für unsere Studie wurde in erster Linie auf den Metastasierungsstatus, die Matching-Kriterien (T-Stadium, Differenzierungsgrad, Geschlecht) und die Verfügbarkeit von OP-Präparaten geachtet, um eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen Metastasierungsmuster zu gewährleisten.

Es konnte in unserer Studie des Weiteren eine signifikante Korrelation zwischen hoher Nodal Expression und einem rechtsseitig gelegenen Primarius nachgewiesen werden. Die Ergebnisse unserer Studie könnten Hinweise auf eine unterschiedliche Tumorbiologie rechts- und linksseitiger KRK geben, die sich auch im Nodal-Expressionsstatus widerspiegeln könnte. Studien geben ähnlich zu unseren Ergebnissen Anlass zur Vermutung, dass es sich bei links- und rechtsseitigen Primarien um verschiedene Krankheitsbilder mit unterschiedlicher Prognose und Therapieansprechen handeln könnte. Dies wird durch unterschiedliche biologische und klinische Charakteristika sowie unter anderem durch eine unterschiedliche embryologische Herkunft dieser Darmabschnitte begründet [24-29]. Die Grenze zwischen rechts- und linksseitig ist als unmittelbar oral der splenischen Flexur definiert [28]. In Anbetracht dessen, dass rechtsseitig gelegene Primarien vor allem in höheren Stadien scheinbar mit einer schlechteren Prognose einhergehen als linksseitige und Nodal ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, sollte in zukünftigen Studien der Einfluss Nodals auf die maligne Progression rechtsseitiger Primarien untersucht werden [28, 29, 107,

[108](#)]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Nodal ein potenzielles, zukünftiges therapeutisches Ziel vor allem für rechtsseitige Kolonkarzinome sein kann.

In unserer Studie konnte keine signifikante Korrelation zwischen Differenzierungsgrad, pT Stadium und pN Status mit der Kategorie Nodal festgestellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass Nodal die maligne Progression von Tumoren fördern kann, ist zu vermuten, dass Nodal positiv mit diesen Parametern korreliert [\[47-56\]](#). Li et al fanden hingegen eine höhere Nodal Expression in besser differenzierten KRK, sowie bei KRK mit prognostisch besseren TNM-Stadien [\[91\]](#). Da die Studienlage zu diesem Thema nicht eindeutig ist, werden in Zukunft weitere Studien benötigt, um mehr diese Frage weiter zu erforschen.

In unserer Studie korrelierte außerdem die Nodal-Expression signifikant mit dem  $\beta$ -Catenin-Score. Es ist bekannt, dass Nodal die Stammzeleigenschaften von Krebszellen fördert [\[60, 71, 84\]](#). Es ist jedoch noch unklar, welche Stammzellmarker in Krebszellen direkt durch Nodal reguliert werden.

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg übernimmt wichtige Funktionen in der embryonalen Entwicklung, der Gewebeent-

wicklung, der zellulären Differenzierung und in Krebsstammzellen [83, 109-114]. Des Weiteren wurden mehrere Stammzellmarker in humanen embryonalen Stammzellen als Ziele eines Multiproteinkomplexes beschrieben, welcher unter anderem  $\beta$ -Catenin beinhaltet [115]. Es ist jedoch noch nicht erforscht, wie exakt der Nodal-Signalweg und der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg interagieren.

Qi et al. konnten einen Crosstalk zwischen dem Nodal- und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in Nodal über-exprimierenden Zellkulturen zeigen, welcher sich auch in unseren Ergebnissen *in vivo* bestätigte. Entsprechend den Ergebnissen könnte dieser Crosstalk eine wichtige Rolle in der Regulierung des Stammzellmarkers Oct-4 in menschlichen Krebszelllinien spielen [84]. Mehrere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass Oct-4 das Fortschreiten von Krebs reguliert und bei vielen Krebsarten überexprimiert wird [116-120].

Qi et al. fanden in Zellkulturen mit erhöhter Nodal-Expression eine ebenfalls erhöhte Oct-4-Expression und nukleäre Akkumulation. Andere Stammzellmarker blieben unverändert oder waren leicht vermindert. Es kam außerdem zu einer verstärkten Proliferation Nodal exprimierender Tumoren. Der Transkriptionsfaktor Oct-4 könnte folglich über die

Genexpression die Proliferation von Tumoren fördern. Bei einer Nodal-Inhibition nahmen außerdem die Proliferation und die Oct-4-Expression der Zellen ab [84]. Der in den Überlebenszeitanalysen unserer Studie festgestellte Trend für ein schlechteres Überleben Nodal exprimierender, hepatisch mKRC könnte dementsprechend über eine Oct-4-Aktivierung vermittelt werden.

Qi et al. zeigten außerdem, dass Nodal die nukleäre Translokation  $\beta$ -Catenins fördert, während der Effekt auf dessen Expression nicht eindeutig war. Dies schien über einen nicht-kanonischen Signalweg zu geschehen, da Smad2, ein essenzielles Protein des kanonischen Nodal-Signalwegs, in den Nodal über-exprimierenden Zellen nicht erhöht war [84]. Des Weiteren führte ein Knockdown  $\beta$ -Catenins zu einer verminderten Multiplikationskapazität und zu einem verminderten intrazellulären Oct-4-Proteinlevel.  $\beta$ -Catenin schien folglich die durch Nodal induzierte maligne Progression und Nodals Effekt auf Oct-4 zu vermitteln. Bei einer erneuten Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs kam es zu einer Akkumulation  $\beta$ -Catenins im Zellkern und auch die Oct-4-Expression nahm erneut zu. Nodal könnte also die Stammzeleigenschaften von Krebszellen über einen Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg modulieren

[84]. Weitere Studien konnten darüber hinaus in Zellkulturen zeigen, dass  $\beta$ -Catenin Oct-4 aktivierte [121, 122]. Zusammengefasst aktivierte Nodal den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg über einen nicht kanonischen Signalweg. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg hielt in Krebszellen die Selbsterneuerung und Tumorigenität durch Aktivierung von Oct-4 aufrecht. Somit könnte Nodal für das Fortschreiten menschlicher Krebszellen von großer Bedeutung sein [84]. In unserer Studie korrelierte eine Nodal-Expression signifikant positiv mit dem nukleären  $\beta$ -Catenin-Level. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen somit, dass der Nodal/ $\beta$ -Signalweg nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* bestehen könnte. Unsere Ergebnisse können ein Anstoß für weitere Studien sein, die diesen Signalweg *in vivo* untersuchen und möglicherweise auch in größer angelegten Studien validieren.

Angenommen, dass Nodal hauptsächlich über Oct-4 wirkt, deckt sich die fehlende Korrelation Nodals mit dem pT-Status, mit dem pN-Status und mit dem Differenzierungsgrad in unserer Studie mit den Ergebnissen einer Studie von Hu et al. für die Korrelation von Oct-4 zu den klinisch-pathologischen Parametern [123]. Eine weitere Studie fand jedoch unter anderem eine Korrelation zwischen Oct-4 und den

klinisch-pathologischen Parametern [124]. Die Studienlage ist hier nicht eindeutig und bedarf weiterer Nachforschung.

Die schlechtere Prognose rechtsseitiger Kolonkarzinome könnte ebenfalls mit dem Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zusammenhängen. Mehrere Studien zeigten eine schlechtere Prognose und eine Tendenz zu Rezidiven und Metastasen bei rechtsseitigen im Vergleich zu linksseitigen Kolonkarzinomen. Diese klinischen Charakteristika rechtsseitiger Kolonkarzinome ähneln den biologischen Eigenschaften von Krebsstammzellen [28, 123]. Oct-4 ist ein als eindeutig Stammzellen fördernder Stammzellmarker beschrieben und ist bei vielzähligen Krebsarten mit einer schlechten Prognose verbunden [125-127]. In einer Studie zu rechtsseitigen Kolonkarzinomen und Oct-4 korrelierte eine Oct-4-Expression mit Rezidiven und mit einer schlechteren Prognose im Vergleich zu den Oct-4 negativen Kontrollen [123]. Wir fanden in unserer Studie eine Korrelation einer hohen Nodal-Expression mit einem rechtsseitigen Primarius. Möglich wäre, dass der Nodal/ $\beta$ -Catenin Signalweg die Stammzeleigenschaften rechtsseitiger Kolonkarzinome über Oct-4 fördert und dementsprechend zur schlechteren Prognose und zu Rezidiven dieser Subgruppe beiträgt. Unsere Ergebnisse geben demnach Hinweise darauf, dass der Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bei



KRK, insbesondere bei rechtsseitigen Kolonkarzinomen, ein potenzieller Kandidat für eine zielgerichtete Therapie und ein prognostischer Biomarker sein könnte. Bei rechtsseitigen Kolonkarzinomen mit aktiviertem Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg könnten außerdem intensivierete Nachsorgemaßnahmen in Betracht gezogen werden, um bei Rezidiven rechtzeitig intervenieren zu können [123].

Andere Studien legen außerdem nahe, dass der Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, als Crosstalk zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin- und dem Nodal-Signalweg, nicht nur für die Therapie, sondern auch in der Prävention bedeutsam sein könnte. So ist in der Mehrheit der sporadischen KRK-Fälle beim Menschen ist eine konstitutive Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs der geschwindigkeitsbestimmende und initiiierende Schritt [79].  $\beta$ -Catenin bildete außerdem in Zellkulturexperimenten einen Komplex mit Oct-4 und verstärkte dessen Wirkung [121, 122]. In einer weiteren Studie konnte darüber hinaus eine stufenweise Zunahme der Oct-4-Expression von normalem Gewebe hin zu gutartigen Polypen und von gutartigen Polypen hin zu KRK gezeigt werden, wobei Oct-4 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert war. Folglich könnte Oct-4 die Karzinogenese KRK antreiben [124]. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es möglich, dass der in unserer Studie in KRK gezeigte Nodal/ $\beta$ -Catenin-

Signalweg nicht nur Einfluss auf die Prognose KRK hat, sondern auch bei der Entstehung KRK eine wichtige Funktion erfüllt. Dies könnte durch einen Crosstalk zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin- und dem Nodal-Signalweg vermittelt werden, der zu einer Aktivierung des Oct-4-Transkriptionsfaktors führt. Durch die Oct-4-Aktivierung können KRK-Zellen Stammzeleigenschaften erlangen, was zu einem für die Tumorentstehung wichtigen Überlebensvorteil führt [79]. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wurde bereits als Therapieziel und als Ziel für die Chemo-Prävention KRK identifiziert [128]. Möglicherweise könnte man also auch durch eine Hemmung von Komponenten des von uns gezeigten Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs nicht nur die Prognose KRK verbessern, sondern auch deren Entstehung vorbeugen. Auch für die Diagnose KRK könnte der Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, eventuell in Kombination mit anderen Biomarkern, bestimmt werden.

Zusammengefasst könnte der durch unsere Studie in KRK *in vivo* nachgewiesene Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg durch eine Aktivierung des Stammzellmarkers Oct-4 eine entscheidende Relevanz für die Entstehung und die maligne Progression KRK haben [84]. Deshalb sollten zukünftige Studien die Mechanismen hinter dem in unserer Arbeit nachgewiesenen Signalweg weiter erforschen. Dadurch

könnten in der Prävention und der Diagnostik wichtige Fortschritte erzielt werden. Außerdem könnten neben einem besseren grundlegenden Verständnis dieses nicht-kanonischen Signalwegs ebenfalls neue Therapieansätze für z.B. Nodal exprimierende KRK gefunden werden, welche zukünftig deren Prognose verbessern könnten. Durch weitere Forschung auf diesem Gebiet könnte die individualisierte Therapie zukünftig auch mit kurativer Intention angewandt werden, wobei der durch unsere Studienergebnisse nachgewiesene Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ein potenzielles neues Therapieziel darstellt [[2](#), [57](#), [73](#), [129](#)].



## 7 Zusammenfassung

In unserer Arbeit konnten wir eine signifikante Korrelation der Lokalisation des Primarius im Kolon und/oder Rektum mit dem Metastasierungsmuster feststellen. Rektumkarzinome korrelierten am stärksten mit einer isolierten pulmonalen Metastasierung, Karzinome des rektosigmoidalen Übergangs korrelierten am stärksten mit einer isolierten hepatischen Metastasierung und Kolonkarzinome korrelierten mit keinen Metastasen über einen fünfjährigen Beobachtungszeitraum. Unsere Ergebnisse geben Hinweise auf unterschiedliche biologische Charakteristika von Kolon- und Rektumkarzinomen.

Es konnte keine Korrelation zwischen Nodal und dem Metastasierungsstatus festgestellt werden. Jedoch wiesen Nodal positive isolierte hepatische Metastasen KRK ein tendenziell schlechteres Überleben auf als die Nodal negative Gruppe. Außerdem korrelierte Nodal signifikant mit einem rechtsseitig gelegenen Primarius, was die Theorie einer unterschiedlichen Biologie links- und rechtsseitiger KRK unterstützt. Nodal förderte darüber hinaus signifikant die nukleäre Akkumulation  $\beta$ -Catenins. Somit könnte Nodal über den zuvor von Qi et al. in Zellkulturen identifizierten

Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg den Stammzellmarker Oct-4 aktivieren und so zur Entstehung und malignen Progression vor allem rechtsseitiger KRK beitragen. Wir weisen diesen nicht-kanonischen, möglicherweise für die maligne Progression vieler Krebsarten verantwortlichen Signalweg *in vivo* in KRK nach.

Unsere Ergebnisse geben Hinweise auf biologische Unterschiede zwischen rechts- und linksseitigen Kolonkarzinomen und Rektumkarzinomen und zeigen, dass der Nodal/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in KRK, insbesondere in rechtsseitigen Kolonkarzinomen, ein potenzieller Kandidat für die Therapie und die Prävention sowie für die Diagnostik und für prognostische Bewertungen ist.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Michl, M., et al., Biomarker alterations associated with distinct patterns of metastatic spread in colorectal cancer. *Virchows Arch*, 2021. **478**(4): S. 695-705.
2. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer Stem Cells*. *New England Journal of Medicine*, 2006. **355**(12): S. 1253-1261.
3. Quail, D.F., et al., *Nodal signalling in embryogenesis and tumorigenesis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(4): S. 885-98.
4. Parkin, D.M., et al., *Global Cancer Statistics, 2002*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2005. **55**(2): S. 74-108.
5. Barnes, B., et al., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Robert Koch-Institut. S. 28 -31.
6. Koch-Institut, R. and G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 2019.
7. Riihimäki, M., et al., *Colorectal cancer patients: what do they die of?* *Frontline Gastroenterology*, 2012. **3**(3): S. 143-149.
8. DeSantis, C.E., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(4): S. 252-71.
9. Vatandoust, S., T.J. Price, and C.S. Karapetis, *Colorectal cancer: Metastases to a single organ*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(41): S. 11767-76.
10. Siegel, R., C. Desantis, and A. Jemal, *Colorectal cancer statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*, 2014. **64**(2): S. 104-17.

11. Michl, M., et al., *Expression of cancer stem cell markers in metastatic colorectal cancer correlates with liver metastasis, but not with metastasis to the central nervous system*. *Pathol Res Pract*, 2015. **211**(8): S. 601-9.
12. Riihimaki, M., et al., *Patterns of metastasis in colon and rectal cancer*. *Sci Rep*, 2016. **6**: S. 29765.
13. Van Cutsem, E., et al., *Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases*. *European Journal of Cancer*, 2006. **42**(14): S. 2212-2221.
14. Sun, Z. and J.M. Thacker, *Contemporary surgical options for metastatic colorectal cancer*. *Curr Oncol Rep*, 2015. **17**(4): S. 13.
15. Tomlinson, J.S., et al., *Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(29): S. 4575-80.
16. Neumann, J.H., *[Prognostic biomarkers for metastatic colorectal cancer]*. *Pathologe*, 2016. **37**(Suppl 2): S. 180-185.
17. Narita, Y. and S. Shibui, *Strategy of surgery and radiation therapy for brain metastases*. *Int J Clin Oncol*, 2009. **14**(4): S. 275-80.
18. Weichselbaum, R. and S. Hellman, *Oligometastases*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(1): S. 8-10.
19. Khattak, M.A., et al., *Survival Differences in Patients With Metastatic Colorectal Cancer and With Single Site Metastatic Disease at Initial Presentation: Results From South Australian Clinical Registry for Advanced Colorectal Cancer*. *Clinical Colorectal Cancer*, 2012. **11**(4): S. 247-254.



20. Lemmens, V.E., et al., *Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study*. Int J Cancer, 2011. **128**(11): S. 2717-25.
21. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): S. 453-8.
22. Qiu, M., et al., *Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study*. Oncotarget, 2015. **6**(36): S. 38658-66.
23. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(8): S. 563-572.
24. Holch, J.W., et al., *The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials*. Eur J Cancer, 2017. **70**: S. 87-98.
25. Arnold, D., et al., *Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials*. Ann Oncol, 2017. **28**(8): S. 1713-1729.
26. Tejpar, S., et al., *Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials*. JAMA Oncol, 2017. **3**(2): S. 194-201.
27. Loupakis, F., et al., *Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(3).
28. Siegmund-Schultze, N., *Kolorektale Karzinome: Die Lage des Primarius zählt*. Dtsch Arztebl International, 2017. **114**(5): S. -20-.

29. Schrag, D., et al., *The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(15\_suppl): S. 3505-3505.
30. El-Deiry, W.S., et al., *Molecular profiling of 6,892 colorectal cancer samples suggests different possible treatment options specific to metastatic sites*. Cancer Biol Ther, 2015. **16**(12): S. 1726-37.
31. Bruns, C.J., et al., *Manual Gastrointestinale Tumoren*. 9. ed. 2013, München: Tumorzentrum München. 360.
32. Neumann, J., et al., *A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer*. Histopathology, 2012. **60**(3): S. 416-26.
33. Neumann, J., et al., *Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer*. Cancer Invest, 2015. **33**(8): S. 354-60.
34. Lipsyc, M. and R. Yaeger, *Impact of somatic mutations on patterns of metastasis in colorectal cancer*. J Gastrointest Oncol, 2015. **6**(6): S. 645-9.
35. Tie, J., et al., *KRAS mutation is associated with lung metastasis in patients with curatively resected colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(5): S. 1122-30.
36. Yaeger, R., et al., *RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer*. Cancer, 2015. **121**(8): S. 1195-203.
37. Prud'homme, C., et al., *Image-guided lung metastasis ablation: a literature review*. Int J Hyperthermia, 2019. **36**(2): S. 37-45.

38. Guerrini, G.P., et al., *The Role of Minimally Invasive Surgery in the Treatment of Lung Metastases*. J Invest Surg, 2017. **30**(2): S. 110-115.
39. Zhou, X., et al., *Nodal is a novel TGF- $\beta$ -like gene expressed in the mouse node during gastrulation*. Nature, 1993. **361**(6412): S. 543-547.
40. Viebahn, C., *Hensen's node*. genesis, 2001. **29**(2): S. 96-103.
41. Oppenheim, J.J., *Cytokines: Past, Present, and Future*. International Journal of Hematology, 2001. **74**(1): S. 3-8.
42. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): S. 11-22.
43. Shen, M.M., *Nodal signaling: developmental roles and regulation*. Development, 2007. **134**(6): S. 1023-34.
44. Strizzi, L., et al., *Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention*. Expert Rev Dermatol, 2009. **4**(1): S. 67-78.
45. Gold, L.I., *The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer*. Critical reviews in oncogenesis, 1999. **10**(4): S. 303-360.
46. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, *A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012. **44**(3): S. 469-474.
47. De Silva, T., et al., *Nodal promotes glioblastoma cell growth*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: S. 59.
48. Lawrence, M.G., et al., *Reactivation of embryonic nodal signaling is associated with tumor progression and promotes the growth of prostate cancer cells*. Prostate, 2011. **71**(11): S. 1198-209.

49. Lee, C.C., et al., *Nodal promotes growth and invasion in human gliomas*. *Oncogene*, 2010. **29**(21): S. 3110-23.
50. Lonardo, E., et al., *Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy*. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(5): S. 433-46.
51. Papageorgiou, I., et al., *Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: S. 122.
52. Daniela, F.Q., J.T. Meghan, and P. Lynne-Marie, *Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes*. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2012. **7**(3): S. 197-216.
53. Quail, D.F., et al., *Embryonic morphogen nodal promotes breast cancer growth and progression*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): S. e48237.
54. Quail, D.F., et al., *Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. *Oncogene*, 2014. **33**(4): S. 461-73.
55. Strizzi, L., et al., *Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer*. *Breast Cancer Research*, 2012. **14**(3): S. R75.
56. Topczewska, J.M., et al., *Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness*. *Nat Med*, 2006. **12**(8): S. 925-32.
57. Bodenstine, T.M., et al., *Plasticity underlies tumor progression: role of Nodal signaling*. *Cancer Metastasis Rev*, 2016. **35**(1): S. 21-39.

58. Hendrix, M.J., et al., *Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): S. 246-55.
59. Strizzi, L., et al., *Embryonic signaling in melanoma: potential for diagnosis and therapy*. Lab Invest, 2011. **91**(6): S. 819-24.
60. Gong, Y., et al., *Nodal promotes the self-renewal of human colon cancer stem cells via an autocrine manner through Smad2/3 signaling pathway*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: S. 364134.
61. Tsai, J.H. and J. Yang, *Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis*. Genes Dev, 2013. **27**(20): S. 2192-206.
62. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): S. 704-15.
63. Shipitsin, M., et al., *Molecular definition of breast tumor heterogeneity*. Cancer Cell, 2007. **11**(3): S. 259-73.
64. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): S. 871-90.
65. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): S. 1776-84.
66. Thiery, J.P., *Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies*. Current Opinion in Cell Biology, 2003. **15**(6): S. 740-746.
67. Kolf, C.M., E. Cho, and R.S. Tuan, *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(1): S. 204.

68. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): S. 1420-8.
69. Garber, K., *Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Important to Metastasis, But Questions Remain*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2008. **100**(4): S. 232-239.
70. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. Nat Genet, 2008. **40**(5): S. 499-507.
71. Postovit, L.-M., et al., *Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(11): S. 4329-4334.
72. Choi, D., et al., *Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(18): S. 2258-64.
73. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(12): S. 895-902.
74. Jung, B., J.J. Staudacher, and D. Beauchamp, *Transforming Growth Factor beta Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer*. Gastroenterology, 2017. **152**(1): S. 36-52.
75. Desai, D.C., et al., *Juvenile polyposis*. BJS (British Journal of Surgery), 1995. **82**(1): S. 14-17.
76. Jelsig, A.M., et al., *Hamartomatous polyposis syndromes: A review*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2014. **9**(1): S. 101.

77. Al-Hajj, M. and M.F. Clarke, *Self-renewal and solid tumor stem cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(43): S. 7274-82.
78. Krishnamurthy, N. and R. Kurzrock, *Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors*. *Cancer Treat Rev*, 2018. **62**: S. 50-60.
79. Fodde, R., R. Smits, and H. Clevers, *APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2001. **1**(1): S. 55-67.
80. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): S. 150-8.
81. Brabletz, T., et al., *Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression*. *Nature Reviews Cancer*, 2005. **5**(9): S. 744-749.
82. Sineva, G.S. and V.A. Pospelov, *Chapter Two -  $\beta$ -Catenin in Pluripotency: Adhering to Self-Renewal or Wnting to Differentiate?*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, Editor. 2014, Academic Press. S. 53-78.
83. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. *Dev Cell*, 2009. **17**(1): S. 9-26.
84. Qi, Y.F., et al., *Nodal signaling modulates the expression of Oct-4 via nuclear translocation of beta-catenin in lung and prostate cancer cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2016. **608**: S. 34-41.
85. Yamashita, S., et al., *Biomarkers in colorectal liver metastases*. *Br J Surg*, 2018. **105**(6): S. 618-627.
86. Patel, J.N., M.K. Fong, and M. Jagosky, *Colorectal Cancer Biomarkers in the Era of Personalized Medicine*. *J Pers Med*, 2019. **9**(1).

87. Taieb, J., et al., *The Evolving Biomarker Landscape for Treatment Selection in Metastatic Colorectal Cancer*. *Drugs*, 2019. **79**(13): S. 1375-1394.
88. Lewallen, S. and P. Courtright, *Epidemiology in practice: case-control studies*. *Community eye health*, 1998. **11**(28): S. 57-58.
89. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(3): S. 313-23.
90. Lee, J.W., et al., *Embryonic Morphogen Nodal Is Associated with Progression and Poor Prognosis of Hepatocellular Carcinoma*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(1).
91. Li, H., et al., *Aldehyde Dehydrogenase 1 and Nodal as Significant Prognostic Markers in Colorectal Cancer*. *Pathol Oncol Res*, 2016. **22**(1): S. 121-7.
92. Tamas, K., et al., *Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site*. *Cancer Treat Rev*, 2015. **41**(8): S. 671-9.
93. Li, M., et al., *Colorectal cancer or colon and rectal cancer? Clinicopathological comparison between colonic and rectal carcinomas*. *Oncology*, 2007. **73**(1-2): S. 52-7.
94. Gatta, G., et al., *Survival of colorectal cancer patients in Europe during the period 1978–1989*. *European Journal of Cancer*, 1998. **34**(14): S. 2176-2183.
95. Jessup, J.M., et al., *Carcinoembryonic antigen: enhancement of liver colonisation through retention of human colorectal carcinoma cells*. *British Journal of Cancer*, 1993. **67**(3): S. 464-470.
96. Wanebo, H.J., et al., *Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Indicator*



*in Colorectal Cancer*. New England Journal of Medicine, 1978. **299**(9): S. 448-451.

97. Cosimelli, M., et al., *Multivariate analysis of a tissue CEA, TPA, and CA 19.9 quantitative study in colorectal cancer patients*. Diseases of the Colon & Rectum, 1989. **32**(5): S. 389-397.

98. Kapiteijn, E., et al., *Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer*. The Journal of Pathology, 2001. **195**(2): S. 171-178.

99. Li, F.Y. and M.D. Lai, *Colorectal cancer, one entity or three*. J Zhejiang Univ Sci B, 2009. **10**(3): S. 219-29.

100. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. Nature, 2012. **487**(7407): S. 330-337.

101. Missiaglia, E., et al., *Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features*. Annals of Oncology, 2014. **25**(10): S. 1995-2001.

102. Dienstmann, R., et al., *Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(15\_suppl): S. 3511-3511.

103. Gabbert, H., et al., *Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion*. Clinical & Experimental Metastasis, 1985. **3**(4): S. 257-279.

104. Kohne, C.H., et al., *Clinical determinants of survival in patients with 5-fluorouracil-based treatment for metastatic colorectal cancer: results of a multivariate analysis of 3825 patients*. Ann Oncol, 2002. **13**(2): S. 308-17.

105. Li, P., et al., *Elevated expression of Nodal and YAP1 is associated with poor prognosis of gastric*

*adenocarcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(8): S. 1765-73.

106. Ziegler, A., S. Lange, and R. Bender, *Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. **127**(Suppl. Statistik): S. T 14-T 16.

107. Weiss, J.M., et al., *Mortality by stage for right-versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2011. **29**(33): S. 4401-4409.

108. Al-Hajj, M., et al., *Therapeutic implications of cancer stem cells*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): S. 43-7.

109. Curtin, J.C. and M.V. Lorenzi, *Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells*. Oncotarget, 2010. **1**(7): S. 563-577.

110. Wang, Y., et al., *The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(4): S. 413-25.

111. Davda, R., et al., *Abstract 2230: Wnt signaling in prostate cancer stem like cells*. Cancer Research, 2015. **75**(15 Supplement): S. 2230-2230.

112. Kahn, M., *Wnt Signaling in Stem Cells and Tumor Stem Cells*. Semin Reprod Med, 2015. **33**(05): S. 317-325.

113. Tanaka, S.S., et al., *Impact of WNT signaling on tissue lineage differentiation in the early mouse embryo*. Dev Growth Differ, 2011. **53**(7): S. 843-56.

114. Jamieson, C., M. Sharma, and B.R. Henderson, *Targeting the  $\beta$ -catenin nuclear transport pathway in cancer*. *Seminars in Cancer Biology*, 2014. **27**: S. 20-29.
115. Oishi, N., T. Yamashita, and S. Kaneko, *Molecular Biology of Liver Cancer Stem Cells*. *Liver Cancer*, 2014. **3(2)**: S. 71-84.
116. Ezeh, U.I., et al., *Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma*. *Cancer*, 2005. **104(10)**: S. 2255-2265.
117. Kumar, S.M., et al., *Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation*. *Oncogene*, 2012. **31(47)**: S. 4898-4911.
118. Liu, D., et al., *Differential expression of Oct4 in HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells is not regulated by DNA methyltransferase 3A*. *Tumor Biology*, 2011. **32(5)**: S. 941-950.
119. Ugolkov, A.V., et al., *Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate*. *The Prostate*, 2011. **71(1)**: S. 18-25.
120. Wang, X.Q., et al., *Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway*. *Hepatology*, 2010. **52(2)**: S. 528-539.
121. Kelly, K.F., et al.,  *$\beta$ -Catenin Enhances Oct-4 Activity and Reinforces Pluripotency through a TCF-Independent Mechanism*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8(2)**: S. 214-227.
122. Lee, S.H., et al., *Wnt/ $\beta$ -catenin signalling maintains self-renewal and tumourigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4*. *The Journal of Pathology*, 2014. **234(1)**: S. 99-107.

123. Hu, J., et al., *Expression of the cancer stem cell markers ABCG2 and OCT-4 in right-sided colon cancer predicts recurrence and poor outcomes*. *Oncotarget*, 2017. **8**(17): S. 28463-28470.
124. Zhou, H., et al., *Expression of Oct-4 is significantly associated with the development and prognosis of colorectal cancer*. *Oncol Lett*, 2015. **10**(2): S. 691-696.
125. Kosaka, T., et al., *The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer*. *Human Pathology*, 2016. **51**: S. 1-8.
126. Ponti, D., et al., *Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties*. *Cancer Research*, 2005. **65**(13): S. 5506-5511.
127. Kim, B.W., et al., *Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer*. *BMC Cancer*, 2015. **15**(1): S. 1015.
128. Pandurangan, A.K., *Potential targets for prevention of colorectal cancer: a focus on PI3K/Akt/mTOR and Wnt pathways*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. **14**(4): S. 2201-5.
129. Kalyan, A., et al., *Nodal Signaling as a Developmental Therapeutics Target in Oncology*. *Mol Cancer Ther*, 2017. **16**(5): S. 787-792.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Ich danke insbesondere den folgenden Personen, ohne deren Hilfe diese Dissertation niemals zustande gekommen wäre:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jens Neumann für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung, für die wohlwollende Unterstützung und Motivierung während der gesamten Dissertation, sowie dafür, dass er mir immer mit viel Geduld und fachlicher Kompetenz zur Seite stand und so einen maßgeblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leistete.

Außerdem gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Marlies Michl, die mich stets mit Rat und Tat und konstruktiven Anregungen unterstützte, mich ausgezeichnet mitbetreute, motivierte und durch viele gute Ideen und Vorschläge einen substanziellen Teil zu meiner Dissertation beitrug.

## | Danksagung

Frau Dr. med. dent. Marianne Ehrnsperger danke ich für ihre Hilfe beim Zusammenstellen des Patientenkollektivs und für die stets angenehme Zusammenarbeit.

Ich möchte außerdem dem Tumorregister München unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Jutta Engel, MPH danken, da durch ihre Arbeit die Zusammenstellung des Patientenkollektivs ermöglicht wurde.

Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Markus Pfirrmann, M.Sc. vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München möchte ich für seine hilfreiche statistische Beratung danken.

Den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der LMU München und der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der LMU München, sowie allen Beteiligten meiner Studien bin ich sehr dankbar für die kompetente Unterstützung sowie für die stets angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dipl.-Phys., Dipl.-Math. Klaus Kluck und Herrn Dr. Holger Kluck möchte ich für die Unterstützung, das Korrekturlesen und meine Dissertation betreffende Ratschläge danken.

Besonders möchte ich meinen Eltern Hong Lin-Schneider und Michael Schneider sowie meiner Schwester Nina

## | Danksagung

Kluck danken. Sie haben mich unermüdlich unterstützt, sind mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und haben unerschütterlich an mich geglaubt. Somit möchte ich ihnen diese Arbeit in tiefer Dankbarkeit widmen.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt und motiviert haben. Dieser große Rückhalt hat als wichtiger Teil zum Erfolg meines Studiums beigetragen.





# 10 Eidesstattliche Versicherung

Thomas Schneider

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

*„Validierung Nodals als Biomarker für das pulmonal metastasierte kolorektale Karzinom“*

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

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

Bayreuth, den 05.12.2022

Thomas Schneider

Ort, Datum

Unterschrift