

Aus dem Pathologischen Institut
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Frederick Klauschen

Validierung von KISS1 als Biomarker für das
pulmonal metastasierte kolorektale Karzinom

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

vorgelegt von
Dr. med. dent. Marianne Gabriele Ehrnsperger
aus Landshut
2023

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Amanda Tufman

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: PD Dr. Marlies Michl

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2023

Abstract/Zusammenfassung

Hintergrund:

Das kolorektale Karzinom zählt bei beiden Geschlechtern zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen in den westlichen Industrienationen. Das Haupterkrankungsalter liegt jenseits des 70. Lebensjahres, bei genetischer Vorbelastung bereits im jungen Erwachsenenalter. Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate liegt in der Gesamtgruppe bei 52 %. Im Rahmen unserer Fall-Kontroll-Studie wurde der kausale Zusammenhang zwischen der Expression des Biomarkers KISS-1 auf den Tumorzellen und dem vermehrten Auftreten von Lungenmetastasen untersucht.

Methode:

Bei der Planung der Studie wurden drei Gruppen generiert. Jede Gruppe umfasst 81 Patienten. Die Auswahl der zu untersuchenden Fälle erfolgte anhand von Daten des deutschen Tumorregisters. In die erste Gruppe wurden Patienten aufgenommen, die mindestens eine solitäre Lungenmetastase, jedoch sonst keine weiteren Metastasen in anderen Organen aufwiesen. In die zweite Gruppe wurden Patienten aufgenommen, die in einem Zeitraum von fünf Jahren nach der Erstdiagnose keine Metastasen aufwiesen. Die dritte Gruppe bildeten Patienten, die mindestens eine solitäre Lebermetastase aufwiesen, jedoch sonst keine weiteren Metastasen in anderen Organen diagnostiziert wurden. Die Auswertung der in Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeschnitte erfolgte mittels Beurteilung der Intensität immunhistochemischer Färbung und Einteilung nach dem H-Score. Im Anschluss an die mikroskopische Beurteilung erfolgte die statistische Auswertung. Bei den Merkmalen wurde die Lokalisation des Tumors, das Grading, das pT-Stadium (postoperativ), der Nodal-Status, der RAS-Status, der BRAF-Status, der MAP-Kinase-Status, MLH1 und MLH2, der MMR-Status, die p53-Regulation, der beta-Katenin-2e Risikoscore und die CD133-Risikogruppe in Bezug auf das Auftreten von KISS-1 untersucht.

Ergebnisse:

Im Rahmen der statistischen Auswertung unserer Ergebnisse konnte zunächst ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Biomarkers KISS-1 und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einer Mutation des MAP-Kinase- und beta-Catenin-Status erhoben werden. Bei 35 von 47 Patienten, die sowohl eine Mutation im MAP-Kinase-Status, als auch im beta-Catenin-Status aufwiesen, konnte eine starke Expression des Biomarkers KISS-1 festgestellt werden. Weiterhin konnte ein deutlicher signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von KISS1 und dem CD133 und/oder KRAS-Status festgestellt werden. Bei einer Mutation, die entweder im CD133 Score oder im KRAS-Status vorlag, kam es gleichzeitig bei 24 von 42 Patienten zu einer verstärkten KISS1-Expression, bei einer Mutation in beiden Genen, sogar bei 11 von 12 Patienten zu einer verstärkten Expression.

Schlussfolgerung:

Es konnte nachgewiesen werden, dass kolorektale Karzinome, die pulmonale Metastasen entwickelten eine signifikant höhere Expression des Biomarkers KISS1 aufwiesen. In der weiterführenden Diagnostik dieser Tumoren wäre besonders beim Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, einer Mutation im MAP-Kinase-Status, im CD133-Score und im KRAS-Status zukünftig eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung auf die Expression des Biomarkers KISS1 sinnvoll. Der Nachweis des KISS1 Biomarkers besonders im Zusammenhang mit weiteren genetischen Veränderungen stellt einen zusätzlichen Risikofaktor bei der Bildung von Lungenmetastasen dar. In Bezug auf die Therapie könnte zum Zeitpunkt der Diagnostik bereits über die Notwendigkeit weiterer therapeutischer Maßnahmen, wie beispielsweise einer adjuvanten Chemo- oder Immuntherapie entschieden werden.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT/ZUSAMMENFASSUNG	1
INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
1 EINLEITUNG	15
1.1 ÄTIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS	15
1.1.1 ERNÄHRUNG	15
1.1.2 GENUSSMITTELKONSUM	16
1.1.3 FAMILIÄRE VORBELASTUNG UND GENETISCHE SYNDROME	16
1.1.3.1 Familiäre Disposition	16
1.1.3.2 Erbliche Darmkrebserkrankung	16
1.2 PATHOGENESE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS	17
1.2.1 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE VERÄNDERUNG BEI DER ENTSTEHUNG DES KRK	17
1.2.2 DIE ROLLE VON ONKOGENEN UND TUMORSUPPRESSORGENEN BEI DER ENTSTEHUNG UND DES KRK	18
1.2.2.1 Onkogene	19
1.2.2.2 Tumorsuppressorgene	20
1.3 LAGE DES PRIMARIUS	20
1.4 METASTASIERUNG	22
1.4.1 LYMPHOGENE METASTASIERUNG	23
1.4.2 HÄMATOGENE METASTASIERUNG	23
1.4.3 KAVITÄRE METASTASIERUNG	24
1.5 MOLEKULARE MECHANISMEN DER METASTASIERUNG BEIM KRK	24
1.5.1 EPITHELIALE-MESENCHYMALLE TRANSITION (EMT)	24
1.5.2 BILDUNG VON TUMORZELLCLUSTERN	25
1.5.3 BILDUNG PROTEOLYTISCHER ENZYME	26
1.5.4 VERÄNDERUNG VON ZELLULÄREN HAFTMECHANISMEN	27
1.5.5 NEOANGIOGENESE	27
1.5.6 ZELLÜBERLEBEN UND UMGEHUNG DER KONTROLLE DURCH DAS IMMUNSYSTEM	28
1.6 HÄUFIGKEIT DER METASTASIERUNG	29
1.6.1 METASTASIERUNG BEI KOLONKARZINOMEN	30
1.6.2 METASTASIERUNG BEI REKTUMKARZINOMEN	30
1.7 PROGNOSE	31
1.8 ROLLE DES BIOMARKERS KISS1 BEI DER METASTASIERUNG UND DER PROGNOSE DES KRK SOWIE BEI ANDEREN TUMOREN	33
1.8.1 DAS GEN KISS1	33
1.8.2 DIE FUNKTION DES GENS KISS1 UND SEINER GENPRODUKTE	34
1.8.3 REGULIERUNG VON KISS1	36
1.8.4 ROLLE VON KISS1 BEI DER METASTASIERUNG VERSCHIEDENER MALIGNER TUMOREN	36
1.8.5 DIE ROLLE VON KISS1 BEI NICHT NEOPLASTISCHEN ERKRANKUNGEN	37

2	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	39
3	METHODEN	40
3.1	AUSWAHL UND ZUSAMMENSETZUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	40
3.1.1	ZUSAMMENSTELLUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	40
3.1.2	MATCHING DER TESTGRUPPEN	40
3.2	VORBEREITUNG DER PROBEN	42
3.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE ANFÄRBUNG DER PARAFFINSCHNITTE	43
3.4	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE MITTELS H-SCORE	44
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	45
4	ERGEBNISSE	47
4.1	STATISTISCHE AUSWERTUNG ALLGEMEINER MERKMALE BEI DER METASTASIERUNG	47
4.1.1	GESCHLECHTERVERTEILUNG	47
4.1.2	LOKALISATION DES PRIMARIUS	47
4.1.3	EINFLUSS DER VASKULÄREN ANATOMIE	48
4.1.4	LYMPHKNOTENSTATUS PULMONAL, HEPATISCH UND NICHT METASTASIERTER TUMOREN	48
4.2	AUSWERTUNG DES KISS1-STATUS	50
4.2.1	ERGEBNISSE DER AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	50
4.2.2	OPTISCHE DARSTELLUNG DER AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE	50
4.2.2.1	Negative Farbreaktion	51
4.2.2.2	1fach positive Farbreaktion	51
4.2.2.3	2fach positive Farbreaktion	52
4.2.2.4	3fach positive Farbreaktion	52
4.2.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER KISS1-EXPRESSION DER TESTGRUPPEN	53
4.2.3.1	KISS1-Status pulmonal, hepatisch und nicht metastasierter KRK	53
4.2.3.2	Statistischer Vergleich des KISS1-Status metastasierter und nicht metastasierter Tumoren	53
4.2.3.3	Statistischer Vergleich nicht metastasierter und hepatisch metastasierter KRK	54
4.2.3.4	Statistischer Vergleich nicht metastasierter und pulmonal metastasierter KRK	54
4.2.3.5	Statistischer Vergleich pulmonal metastasierter und hepatisch metastasierter KRK	55
4.2.4	KORRELATION DES KISS1-STATUS MIT WEITEREN MERKMALEN	55
4.2.4.1	Geschlechterverteilung	55
4.2.4.2	Lokalisation des Primarius	55
4.2.4.3	T-Stadium bei Erstdiagnose	56
4.2.4.4	Lymphknotenstatus	56
4.2.4.5	Differenzierungsgrad und KISS1-Expression	56
4.2.5	VERGLEICH DES KISS1-STATUS MIT ANDEREN OBERFLÄCHENMARKERN	57
4.3	ÜBERLEBENSZEIT UND FORTSCHREITEN DER ERKRANKUNG	59
4.3.1	KEINE METASTASIERUNG (M0)	59
4.3.2	HEPATISCHE METASTASIERUNG	60
4.3.3	PULMONALE METASTASIERUNG	62
4.3.4	PULMONALE VS. HEPATISCHE METASTASIERUNG	63
5	DISKUSSION	65
5.1	EXPRESSION VON KISS1 UND METASTASENBILDUNG/ LYMPHKONTENINFILTRATION BEIM KRK UND ANDEREN MALIGNEN TUMOREN	65
5.1.1	BILDUNG VON FERNMETASTASEN BEIM KRK UND ANDEREN MALIGNOMEN	65

5.1.2	BILDUNG VON LYMPHKNOTENMETASTASEN BEIM KRK	68
5.2	EINFLUSS VON KISS1 AUF TUMORWACHSTUM UND MALIGNITÄT	68
5.3	EINFLUSS VON KISS1 AUF DIE REZIDIVBILDUNG UND ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEIT	70
5.4	EINFLUSS DER METHYLIERUNG AUF DIE TUMORGENESE	71
5.5	ANATOMISCHE EINFLÜSSE BEI DER BILDUNG PULMONALER UND HEPATISCHER METASTASEN	72
5.6	BEDEUTUNG UND KRITISCHE BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
<hr/>		
	LITERATURVERZEICHNIS	75
<hr/>		
	DANKSAGUNG	81
<hr/>		
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	83
<hr/>		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: genetische und morphologische Veränderungen der Darmmukosa im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz (Quelle: De Palma et al. (17)).....	18
Abbildung 2: WNT-Signalweg, a: kanonischer Signalweg, b: nicht-kanonischer Signalweg (Quelle: Zhan, Rindtorff, Boutros 2017 (34))	25
Abbildung 3: Die Rolle proteolytischer Enzyme bei der Metastasierung (Quelle: Rudmik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com).....	26
Abbildung 4: Die Rolle von Urokinase-Plasminogen-Aktivator (u-PA) und Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (u-PAR) bei der Metastasierung (Rudmik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com).....	27
Abbildung 5: Darstellung des Apoptose-Signalwegs über TRAIL und IFN- β (Quelle: Rudmik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com)	29
Abbildung 6: schematische Darstellung des KISS1-Rezeptors und seiner intrazellulären Signalkaskade (Quelle: Hu, Chao, Zhang et al.,2017)	34
Abbildung 7: Produktion der Kisspeptine; die Kisspeptine 10, 13, 14 und 54 werden aus dem 145 Aminosäuren umfassenden Pro-Kisspeptin herausgeschnitten und von der Zelle sezerniert (Quelle: Cho et al., 2012)	35
Abbildung 8: Die Funktion von KISS1/GPR54 bei physiologischen und pathologischen biologischen Prozessen (Quelle: Cho et al., 2012)	38
Abbildung 9: negative Färbereaktion; A: 100fache Vergrößerung; B: 200fache Vergrößerung.....	51
Abbildung 10: einfach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung.....	51
Abbildung 11: zweifach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung.....	52
Abbildung 12: dreifach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung.....	52
Abbildung 13: Gesamtüberleben in der metastasenfremen Testgruppe	60
Abbildung 14: Gesamtüberleben in der hepatisch metastasierten Testgruppe	61
Abbildung 15: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in der hepatisch metastasieren Testgruppe.....	61
Abbildung 16: Gesamtüberleben in der pulmonal metastasierten Testgruppe	62
Abbildung 17: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in der pulmonal metastasierten Gruppe.....	63
Abbildung 18: Vergleich des Gesamtüberlebens der pulmonal metastasierten Testgruppe mit der hepatisch metastasierten Testgruppe.....	63
Abbildung 19: Vergleich des Zeitraums bis zum Auftreten eines Rezidivs bei der pulmonal metastasierten Testgruppe mit der hepatisch metastasierten Testgruppe ..	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede zwischen rechtsseitig und linksseitig gelegenen Primärtumoren	21
Tabelle 2: Pathologische Einteilung gastrointestinaler Primärtumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)	32
Tabelle 3: Pathologische Einteilung des Lymphknotenbefalls bei gastrointestinalen Tumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)	32
Tabelle 4: Pathologische Einteilung des Fernmetastasenbefalls bei gastrointestinalen Tumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)	32
Tabelle 5: Makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Resektionsränder (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)	32
Tabelle 6: Tumoreinteilung nach dem UICC-Stadium (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)	32
Tabelle 7: Schematische Tabelle zur Bildung des H-Score-Werts	45
Tabelle 8: Tabellarische Übersicht über die untersuchten Testgruppeneigenschaften und die genetischen Marker in Bezug auf die einzelnen Testgruppen und deren statistische Signifikanz	50
Tabelle 9: KISS1-Status in Bezug auf metastasierte und metastasenfrie Tumoren	54
Tabelle 10: KISS1-Status in Bezug auf die metastasenfrie und die hepatisch metastasierte Patientengruppe	54
Tabelle 11: KISS1-Status in Bezug auf die metastasenfrie und pulmonal metastasierte Patientengruppe	54
Tabelle 12: KISS1-Status in Bezug auf die pulmonal und hepatisch metastasierte Patientengruppe	55
Tabelle 13: KISS1-Status in Bezug auf die untersuchten Testgruppeneigenschaften und die untersuchten genetischen Marker, sowie die statistische Signifikanz	59
Tabelle 14: KISS1-Status bei distalen kolorektalen Karzinomen in Bezug zur Linea dentata	72

Abkürzungsverzeichnis

5-FU:	5-Fluorouracil
AML:	akute myeloische Leukämie
APC:	Adenomatous Poliposis Coli
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
bp:	Basenpaar
BRCA:	Breast Cancer
BSC:	Best supportive Care
°C:	Grad Celsius
CAF:	Cancer-associated-fibroblast
cm:	Zentimeter
CMS:	consensus molecular subtype
CRSP3:	Cofaktor-required-for-SP1-Aktivität 3
DAB:	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DCC:	Deleted in Colorectal Carcinoma
DII:	Dietary Inflammatory Index
dMMR:	defective Mismatchrepair
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EMT:	Epithelial mesenchymale Transition
FAP:	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE:	formalin fixed paraffin embedded
FOLFIRI:	5-FU, Folinsäure, Irinotecan (Chemotherapieschema)
GnRH:	Gonadotropin Releasing Hormon
GPR:	G-Protein-Rezeptor
Gy:	Gray
GTP:	Guanosintriphosphat
H.E.:	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC:	Hereditäre non polyposis colon cancer
HUVEC:	human umbilical vein endothelial cell
IGFR:	Insulin-like-growth-factor-Rezeptor
IFN:	Interferon
IRS:	Immunreaktive Score

kDa:	Kilodalton
Kp-10:	Kisspeptin-10
KRAS:	Kirsten rat sarcoma virus
KRK:	Kolorektales Karzinom
LK:	Lymphknoten
MADR2:	Mothers gainst decapentaplegic related 2
MAP:	MUTHY-assoziierte Polyposis
mm:	Millimeter
MMP:	Metalloproteinasen
MMR:	Mismatchreparaturstatus/Mismatchrepair
MSI:	Mikrosatelliteninstabilität
NK:	Natürliche Killerzellen
NSCLC:	Non small cell lung cancer (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
OAS:	Overall Survival
OPN:	Osteopontin
PD-ECGF:	Platelet derived-endothelial cell growth factor
PFS:	Progrssionfree Survival
PIP ₂ :	Phosphidyinositol-4,5-bisphosphat
pMMR:	proficient Mismatchrepair
ROCK:	Rho-assoziierte Proteinkinase
SCNA:	Somatic copy number alterations
SDF-1:	Stroma cell derived factor-1
SEER:	Survillance, Epidemiology and End Results
Sp1:	Specificity protein 1
TGFβ:	Transforming-Growth-Faktor β
TME:	Tumormicroenvironment
TNF:	Tumornekrosefaktor
TRAIL:	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TXNIP:	Thioreduxin-interacting-Protein
UICC:	Union international Contre le Cancer/ Union for international Cancer Control
uPA(R):	Urokinase Plasminogenaktivator(-Rezeptor)
μm:	Mikrometer
VDUP1:	Vitamin-D-upregulated-Protein

VEGF(R): Vascular endothelial growth factor (receptor)

z. B.: zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten malignen Tumorarten in den westlichen Industrienationen. Im Jahr 2016 war Darmkrebs mit 12,5 % nach Prostata- und Lungenkrebs auf Platz drei der häufigsten Krebsarten in der männlichen Bevölkerung, bei der weiblichen Bevölkerung ist Darmkrebs mit 11,1 % nach Brustkrebs die zweithäufigste Tumorerkrankung (1, 2). Mit über 50 % liegt das Haupterkrankungsalter jenseits des 70. Lebensjahres und steigt bis ins hohe Alter an. Weniger als 10 % der Neuerkrankungen werden vor dem 55. Lebensjahr diagnostiziert. Zu den größten Risikofaktoren gehören Lebens- und Ernährungsgewohnheiten wie fett- und fleischreiche Nahrung, Adipositas, Bewegungsmangel, Nikotinkonsum und regelmäßiger, übermäßiger Alkoholkonsum (2). Weiterhin spielen auch die familiäre Vorbelastung, genetische Syndrome und langjährig bestehende, chronische Erkrankungen eine nicht unwesentliche Rolle bei der Entstehung der Entstehung von Kolon- und Rektumkarzinomen.

1.1.1 Ernährung

Die Ernährung kann bei der Entstehung von Darmkrebs einerseits einen Risikofaktor darstellen, andererseits auch eine protektive Funktion haben.

Als besonders hohe Risikofaktoren gelten hierbei eine fett- und fleischreiche Ernährung. Bei einem hohen tierischen Fettgehalt kommt es zu einer vermehrten Bildung von Gallensäuren. Die primären Gallensäuren (sog. Konjugierte Gallensäuren) sind an der Absorption der Nahrungsfette im Dünndarm beteiligt und werden im Ileum zu ca. 98 % rückresorbiert. Ein restlicher kleiner Anteil von ein bis zwei Prozent gelangt ins Kolon und wird mittels Verstoffwechslung durch die Darmflora zu sekundären Gallensäuren, die eine mutagene Wirkung haben und die Entwicklung von malignen Dickdarntumoren begünstigen (3). Der vorwiegende Konsum von pflanzlichen Fetten wie z. B. Olivenöl zeigt hingegen einen protektiven Effekt und schützt vor der Entwicklung eines Darmmalignoms (4, 5). Weiterhin spielt ein vermehrter Verzehr von bestimmten Fleischsorten und Fleischprodukten eine Rolle in der KRK-Genese. Besonders der vorwiegende Verzehr von rotem Fleisch, wie Rind-, Schweine- und Lammfleisch korreliert mit

einem erhöhten Darmkrebsrisiko. Im Gegensatz dazu sind weiße Fleischsorten wie Fisch oder Hühnerfleisch mit einem geringeren KRK-Risiko assoziiert (4, 6).

1.1.2 Genussmittelkonsum

Der regelmäßige Konsum verschiedener Genussmittel hat einen variablen Einfluss auf die Entwicklung eines KRK. Nikotin- und Alkoholabusus gehen mit einer erhöhten Inzidenz einher. Bereits der tägliche Konsum von zehn Gramm Alkohol geht mit einer erhöhten Inzidenz einher (7). Bei der Nikotinabhängigkeit steigt das Risiko mit der Dauer der Nikotinabhängigkeit und der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag (8). Der regelmäßige Konsum von Kaffee und Kaffeeprodukten stellt hingegen einen protektiven Faktor bei der Darmkrebsentwicklung dar (9).

1.1.3 Familiäre Vorbelastung und genetische Syndrome

Ein weiterer bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung eines KRK stellen zum einen die familiäre Vorbelastung zum anderen erbliche Tumorsyndrome dar.

1.1.3.1 Familiäre Disposition

Bei einer familiären Disposition liegt ein autosomal-dominanter Erbgang vor, der sich mit Hilfe molekulargenetischer Tests nicht nachweisen lässt. Bei dieser Patientengruppe wird nicht die tatsächliche Krebserkrankung, sondern ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines KRK vererbt. Von einem familiär erhöhtem Risiko geht man aus, wenn bei einem direkten Verwandten Darmkrebs diagnostiziert wurde und das Erkrankungsalter vor dem 50. Lebensjahr liegt. Eine familiäre Disposition liegt ebenfalls vor, wenn bei dem betroffenen Patienten selbst oder einem direkten Verwandten Krebsarten wie Ovarialkarzinom, Uteruskarzinom oder ein Karzinom der ableitenden Harnwege festgestellt wurde. Bei etwa 20 % der Darmkrebspatienten liegt eine familiäre Vorbelastung vor (10).

1.1.3.2 Erbliche Darmkrebserkrankung

Im Gegensatz zur Familiären Disposition kommt es bei der erblichen Form des KRK mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit zu einem Krankheitsausbruch. Sie entstehen im Rahmen von Polyposis-Syndromen und können im Unterschied zur familiären Disposition mittels molekulargenetischer Tests nachgewiesen werden, diese Form liegt bei ca. fünf bis zehn Prozent der KRK-Patienten vor (11). Zwei sehr bedeutsame Syndrome sind in diesem

Zusammenhang die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das HNPCC-Syndrom (Hereditary non polyposis colon cancer; Lynch-Syndrom) (2, 12, 13).

Lynch-Syndrom (HNPCC)

Das Lynch-Syndrom kennzeichnet sich durch einen Defekt in der DNA-Mismatch-Reparatur aus. Bis zu 80 % der Patienten, die von dieser Mutation betroffen sind, entwickeln im Laufe ihres Lebens ein KRK. Bei circa fünf Prozent der Darmkrebserkrankungen liegt ein Lynch-Syndrom vor. Da es sich in der Mehrzahl der Fälle um eine Keimbahnmutation handelt, besteht ein erhöhtes Risiko, weitere Malignome zu entwickeln. Besonders häufig treten neben einem KRK auch Magenkarzinome, Endometriumskarzinome, maligne Neubildungen im Bereich der Harnleiter und des Nierenbeckens und Dünndarmkarzinome auf (11, 14-16).

Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die FAP ist hingegen durch die Bildung einer Vielzahl von Adenomen im Bereich des Dickdarms bereits in jungen Jahren gekennzeichnet. Unbehandelt liegt das Risiko bei 100 % ein Karzinom zu entwickeln und liegt bei 0,5 bis 1 % der KRK-Erkrankungen vor (14, 16).

Weitere genetische Syndrome die mit einem erhöhten Risiko für ein KRK assoziiert sind, sind die attenuierte FAP, die MUTHY-assoziierte Polyposis (MAP), das Peutz-Jeghers-Syndrom und das juvenile Polyposissyndrom (14-16).

1.2 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

1.2.1 Makroskopische und Mikroskopische Veränderung bei der Entstehung des KRK

Die häufigste Vorstufe des kolorektalen Karzinoms stellt das Adenom der Dickdarmschleimhaut dar. Adenome entstehen vermutlich aus Stammzellen der Dickdarmschleimhaut, von denen sich etwa ein bis fünf Stück pro Kolonkrypte nachweisen lassen. Kommen weitere begünstigende Faktoren, wie eine genetische Prädisposition, Ernährung und Karzinogene, bzw. Co-Karzinogene Einflüsse hinzu, kommt es zur malignen Transformation.

Das Adenom entsteht zunächst durch eine Proliferation von Mukosaepithelzellen, die eine geringere Differenzierung als normale Mukosazellen aufweisen. Weiterhin kommt es zu einer Strukturveränderung der Drüsen und in der Regel zu exophytischem Wachstum, wie es beim tubulären

oder villösen Adenom beobachtet wird. Flache Adenome treten selten auf. Nach dem 60. Lebensjahr nimmt die Anzahl der Adenome im distalen Kolon nicht weiter zu, jedoch die Adenome in proximalen Anteilen des Dickdarms. Dies führt man auf unterschiedliche Faktoren bei der Entstehung der Adenome zurück, wie unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Kolonabschnitte und die unterschiedliche Zusammensetzung des Darminhalts (17). Eine schematische Darstellung der Veränderungen in der Darmmukosa bei der Bildung von Adenomen bis hin zu einem Karzinom zeigt Abbildung 1 (18, 19)

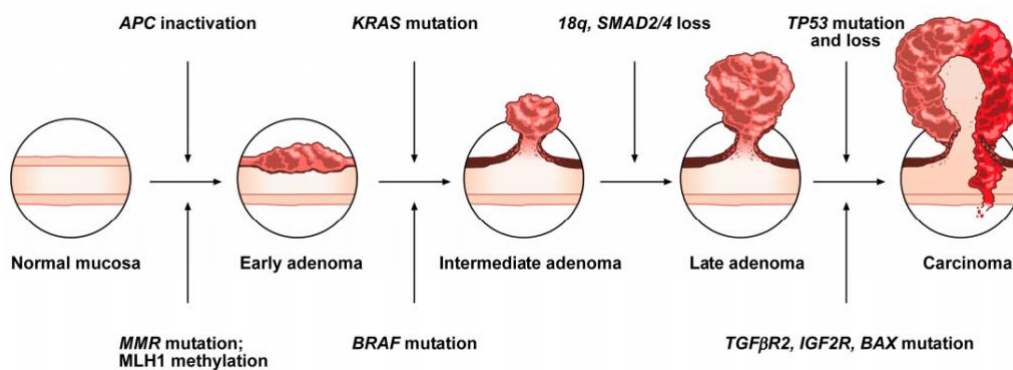


Abbildung 1: genetische und morphologische Veränderungen der Darmmukosa im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz (Quelle: De Palma et al., 2019 (18))

1.2.2 Die Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Entstehung und des KRK

Neben den exogenen Faktoren bei der Entstehung des KRK spielen auch endogene Faktoren, wie genetische Variationen bei verschiedenen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine Rolle.

Mutationen an zahlreichen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind an der Entstehung kolorektaler Karzinome wesentlich beteiligt. Häufig treten sie im Zusammenhang mit einer genetischen Vorerkrankung wie der FAP oder HNPCC auf, sind jedoch auch bei spontanen Neubildungen von kolorektalen Karzinomen nachzuweisen. Die Differenzierung dieser Genmuster hat nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Neigung zur Metastasierung von KRK, sondern letztendlich auch bei der Prognose und der Wahl der Therapie.

1.2.2.1 Onkogene

RAS-Gen

Bei den Säugetieren unterscheidet man im Wesentlichen drei RAS-Onkogene: das H-RAS-, das N-RAS- und das K-RAS-Onkogen, die alle nahezu gleich große 21-kDa-Proteine kodieren und zu der Gruppe der GTPasen gehören. Man findet ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in diesen Genen in ca. 15 % aller Tumoren und bei nahezu 50 % aller kolorektalen Karzinome. Auch hyperplastische Polypen weisen eine hohe Rate an mutierten RAS-Genen auf, obwohl diese nicht primär als eine maligne Vorstufe angesehen werden und auch selten maligne entarten (20).

BRAF

Das BRAF-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 an der Stelle 7q34 lokalisiert (21) und kodiert für ein Protein, das die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs steuert. Es beeinflusst das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Zellmigration und regelt die Apoptose und das Zellüberleben. Die BRAF-Mutation ist eine seltene, jedoch bedeutsame genetische Variante bei der Entstehung und der Bewertung der Prognose des KRK. Etwa 8 bis 12 % der Patienten mit KRK weisen diese Mutation auf. Bevorzugt zeigt sie sich bei KRK-Patientinnen über 70 Jahren, bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren und bei muzinösen Karzinomen. 60 % der Tumore mit einer BRAF-Mutation sind schlecht ausdifferenziert und es kommt zu einer gehäuften Metastasierung ins Peritoneum. Seltener sind die Lunge und die Leber von einem Metastasenbefall betroffen (22).

HER2

Das HER2-Gen gehört zur Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren und ist auf Chromosom 17 lokalisiert. Die Familie der HER2-Rezeptoren wird auch in normalen, gesunden Zellen exprimiert, wohingegen in Tumorzellen meist eine starke Überexpression vorliegt. HER2-Überexpressionen in Tumoren korrelieren meist mit einem sehr aggressiven Wachstumsmuster, dass von einer schnellen und tiefen Invasion und einer frühzeitigen Bildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen gekennzeichnet ist. Vorzugsweise tritt eine verstärkte HER2-Expression in den distal lokalisierten Darmmalignomen und Rektumkarzinomen auf.

1.2.2.2 Tumorsuppressorgene

APC-Gen

Das Tumorsuppressorgen APC (Adenomatous Poliposis Coli-Gen) ist bei der Kolonkarzinomentwicklung im Rahmen der FAP, aber auch bei spontan auftretenden Tumoren von Bedeutung. Diese Mutation kann bereits in sehr frühen Neoplasieformen nachgewiesen werden (20).

p53 Gen

Eine Mutation des Tumorsuppressorgen p53 liegt besonders beim sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom vor. Bei dieser Erkrankung kommt es vorwiegend zur Entwicklung von Sarkomen, Mammakarzinomen, Gehirntumoren und Tumoren an anderen Geweben, daneben wird auch ein vermehrtes Auftreten von kolorektalen Karzinomen beobachtet (20).

DCC-Gen

Zirka 60 bis 80 % der KRK zeigen einen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma-Gen) auf. Allerdings lässt sich bei diesem Gen kein eindeutiger, direkter Zusammenhang zwischen genetischer Mutation und der Entwicklung eines KRK herstellen, da auf dem betroffenen Genlocus noch weitere Tumorsuppressorgene kodiert sind (20).

1.3 Lage des Primarius

Die Lage des Primärtumors spielt insbesondere im Hinblick auf die Prognose und die Wahl der Therapie eine Rolle. So zeigten Krebsregisterdaten aus skandinavischen Ländern und den USA, dass Patienten, je nachdem ob der Primärtumor rechtsseitig oder linksseitig erstmals diagnostiziert wurde, eine unterschiedliche 5-Jahres-Überlebensrate. Ein Beispiel hierfür ist das amerikanische Register SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), dass bei 53.801 Kolonkarzinompatienten eine um 12 % geringere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei fortgeschrittenem, rechtsseitig lokalisiertem Primarius vorlag (23). Eine Studie von Schrag et al. 2016 zeigt, dass vor allem in den höheren Tumorstadien III und IV eine deutlich schlechtere Prognose bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren vorliegt. So zeigte sich im Tumorstadium III eine 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 62 % bei rechtsseitig lokalisierten Tumoren und von 72 % bei einem linksseitig lokalisierten Primarius. Im Stadium IV lag die 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem

Primärtumor auf der rechten Seite bei 16 % und auf der linken Seite bei 27 % (24). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede ist, dass linksseitige Darmtumoren und im Rektumkarzinome früher Beschwerden hervorrufen, wie z. B. Blutungen, Schmerzen oder Obstipation und somit früher entdeckt werden (23). Die Gründe für die Unterschiede bei rechtsseitiger und linksseitiger Lage liegen im embryologischen Ursprung und der Genetik der Tumorzellen. Eine molekulargenetische Untersuchung von Guinny J. et al. 2015 zeigte, dass vor allem Tumoren, die eine starke Hypermuation, Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Immunaktivierung aufweisen, vorzugsweise rechtsseitige Primärtumoren bei weiblichen Patienten verursachten. Diese wurden zudem auch erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Bei den linksseitigen Primärtumoren dominierte ein genetischer Typ, der vorwiegend durch einen epithelialen Ursprung, Chromosomenabberationen und einer Aktivierung des WNT- und MYC-Signalwegs charakterisiert ist (25). Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Kennzeichen der rechtsseitigen und linksseitigen primären Tumorlokalisation (23).

Lokalisation (Häufigkeit)	Rechtes Kolon (20 – 25 %)	Linkes Kolon (75 – 80 %)
Inzidenz	niedriger	höher
Geschlecht	Frauen häufiger	Männer häufiger
Größe TNM-Stadium	größere Tumoren TNM-Stadium höher; Häufig muzinös	kleinere Tumoren TNM-Stadium niedriger
Immunogenität	stark immunogen	schwächer immunogen
Molekularpathologische Kennzeichen	Verstärkte Methylierung Mikrosatelliteninstabilität/ Mismatchreparaturdefekt	Chromosomen- instabilität
Überlebenszeit	kürzer	länger

Tabelle 1: Unterschiede zwischen rechtsseitig und linksseitig gelegenen Primärtumoren

Auch bei der Therapie spielt die Lage des Primarius eine entscheidende Rolle. Bedeutsam ist hierbei das Ansprechen auf eine Therapie mit monoklonalen

Antikörpern. In der FIRE-3 und der CRYSTAL-Studie wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Cetuximab und Bevacizumab in Kombination mit der Chemotherapie FOLFIRI untersucht. Diese Studien zeigten, dass Patienten mit einem metastasierten, linksseitigen KRK und RAS-Wildtyp von einer Kombinationstherapie aus FOLFIRI und dem EGFR-Antikörper Cetuximab profitierten, wohingegen bei Patienten mit einem rechtsseitigen Primarius sich ein geringerer Behandlungserfolg zeigte (23, 26, 27). Bei Patienten mit rechtsseitigem Primarius konnte in der CALBG/SWOG-Studie ein Überlebensvorteil bei einer zusätzlichen Gabe von Bevacizumab festgestellt werden. Allerdings sind die Unterschiede im Behandlungserfolg durch die zusätzliche Gabe des Antikörpers in dieser Gruppe deutlich geringer als in der Patientengruppe mit linksseitigem Primarius (23).

1.4 Metastasierung

Ein wesentliches Kennzeichen von malignen Tumoren ist neben der Invasion in benachbarte Organe und Gewebe die Verschleppung von Tumorzellen aus dem Primärtumor in Lymphknoten oder weitere Organe, die sogenannte Metastasenbildung. Diese kann lymphogen, hämatogen oder kavitär erfolgen und verläuft in drei Stufen. Zunächst erfolgt das Eindringen der Tumorzellen in die Metastasierungswege wie Blut- und Lymphbahnen, Hohlraumstrukturen oder Nerven. Es kommt zu einer Verschleppung der Tumorzellen in weitere anatomische Strukturen. Hier kommt es zur Extravasation, zum Austritt der Tumorzellen aus den Metastasierungswegen. Durch einen lokalen Gerinnungsvorgang entgeht der Tumorzellkomplex, der zum einen vor der tumorziden Wirkung des Blutes schützt, zum anderen begünstigt diese Reaktion die Absiedelung der Tumorzellen in fremden Geweben. Viele Tumoren metastasieren bevorzugt in bestimmte Zielorgane (Organpräferenz). Als Ursache hierfür werden beispielsweise Unterschiede bei Membranrezeptoren, entsprechende Liganden bestimmter Organendothelien und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie vermutet (28). Bei der Metastasierung des KRK spielen besonders die lymphogene- und hämatogene Metastasierung eine Rolle, eine bevorzugte Metastasierung findet in Leber und Lunge statt (29). Die kavitäre Metastasierung tritt beim KRK in Form der Peritonealkarzinose auf und beruht

auf einem Befall und einer Ausbreitung der Tumorzellen in der freien Bauchhöhle. (30).

1.4.1 Lymphogene Metastasierung

Die lymphogene Metastasierung kennzeichnet sich durch ein Eindringen der Tumorzellen in spaltförmige Öffnungen der Lymphkapillaren. Zunächst kommt es zu einem Befall des dem Tumor am nächsten gelegenen Lymphknotens und im Anschluss zu einem Befall weiterer Lymphknotenstationen (Lymphangiosis carcinomatosa). Schlussendlich gelangen die Tumorzellen über den Ductus thoracicus in die Blutbahn, wobei ein erheblicher Anteil der malignen Zellen zugrunde geht. Die lymphogene Metastasierung ist von hoher Bedeutung in der Tumordiagnostik, da schon kleine Tumoren Lymphknotenmetastasen bilden können und hieraus entsprechende Therapiekonsequenzen wie Lymphadenektomie, Bestrahlung oder Chemotherapie folgen (28). Beim KRK findet man bei rechtsseitig lokalisierten Primärtumoren im Bereich des Colon ascendens eine lymphogene Metastasierung vor allem entlang der Arteria ileocolica, der Arteria colica dextra und der Arteria colica media. Bei einer Lokalisation im Colon transversum vor allem entlang der Arteria ileocolica (31). Bei linksseitigen Karzinomen findet die lymphogene Metastasierung vorwiegend in den Lymphknotensträngen entlang der Arteria mesenterica inferior statt (32). Die lymphogene Metastasierung des Rektumkarzinoms erfolgt über 3 Metastasenstraßen. Je tiefer der Sitz des Primarius ist, über umso mehr Metastasenstraßen können sich die Tumorzellen ausbreiten. Hochsitzende Karzinome (8 bis 16 cm) metastasieren nur paraaortal, Malignome der mittleren Etage (8 bis 4 cm) zusätzlich in die Beckenwand und tiefsitzende Karzinome (4-0 cm) paraaortal, in die Beckenwand und in die inguinalen Lymphknoten (16).

1.4.2 Hämatogene Metastasierung

Die hämatogene Metastasierung unterscheidet sich durch vier verschiedene Metastasierungstypen, den Cava-Typ, den Pfortadertyp, den Lungentyp und den vertebral-venösen Typ. Für unsere Untersuchungen am kolorektalen Karzinom sind vor allem der Cava-Typ und der Pfortadertyp bedeutsam. Der Cava-Typ liegt vor allem bei Malignomen des unteren Rektums, aber auch bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, der Schilddrüse und der Leber vor. Über das Abflussgebiet der Vena cava inferior gelangen die Tumorzellen in den rechten Herzventrikel und von dort aus weiter in die Lunge, wo es häufig zur Absiedelung

von Lungenmetastasen kommt. Der Pfortadertyp findet sich bei Krebserkrankungen des übrigen Magen-Darm-Trakts, des Pankreas und der Milz. Hierbei treten bevorzugt Lebermetastasen auf. Der Lungentyp liegt vor allem bei pulmonalen Primärtumoren vor. Hier kommt es zu einer Verschleppung der Tumorzellen über die Lungenvenen, in den linken Ventrikel und von dort über das arterielle Blutgefäßsystem in die Organe des großen Kreislaufs wie beispielsweise ins Gehirn. Der vertebral-venöse Typ kennzeichnet sich durch eine retrograde Metastasierung in das paravertebrale Venengeflecht. Es entstehen Knochenmetastasen, wie sie vor allem beim Schilddrüsen-, Nieren- und Prostatakarzinom auftreten (28).

1.4.3 Kavitäre Metastasierung

Die kavitäre Metastasierung ist gekennzeichnet von einem Einbruch des Primärtumors in einen Hohlraum und Bildung einer Tochtergeschwulst an einer anderen Stelle des Hohlraums (28). Die Peritonealkarzinose stellt die häufigste Form der kavitären Metastasierung beim KRK dar.

1.5 Molekulare Mechanismen der Metastasierung beim KRK

Neben den anatomischen Gegebenheiten, die eine entscheidende Bedeutung bei der Art der Metastasierung haben, spielen auch zahlreiche molekulare Mechanismen eine Rolle bei der Absiedelung von Lymphknoten- und Fernmetastasen. Hierzu zählen neben der Bildung verschiedener Enzyme und Signalstoffe auch die Veränderung von zellulären Strukturen.

1.5.1 Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Unter der epithelial-mesenchymalen Transition versteht man einen evolutionär konservierten Prozess, der eine Umwandlung epithelialer Zellen in mesenchymale Zellen beschreibt, die mitunter eine höhere Zellmotilität aufweisen. Im Rahmen eines tumorösen Zellwachstum fördert dies eine Loslösung von Krebszellen aus dem Primärtumor und ermöglicht den Eintritt dieser Zellen in lokale Blutgefäße. Die EMT stellt somit einen entscheidenden Schritt bei der Initiation der Metastasierung dar. An der EMT sind einige zelluläre Signalwege, unter anderem der WNT-, Notch- und TGF- β -Signalweg beteiligt. Die EMT beim KRK findet vorwiegend über den WNT-Signalweg statt. Seine Funktion wird über eine „loss-of-function“-Mutation ausgeübt, die einen intrazellulären β -Catenin-Abbau verhindert. Hierdurch kommt es zu einer

gesteigerten Gentranskription mit Förderung der Zellproliferation (33). Eine schematische Darstellung des WNT-Signalweges zeigt Abbildung 2. Die Genese des kolorektalen Karzinoms wird sowohl über den kanonischen als auch über den nicht-kanonischen WNT-Signalweg gesteuert (34).

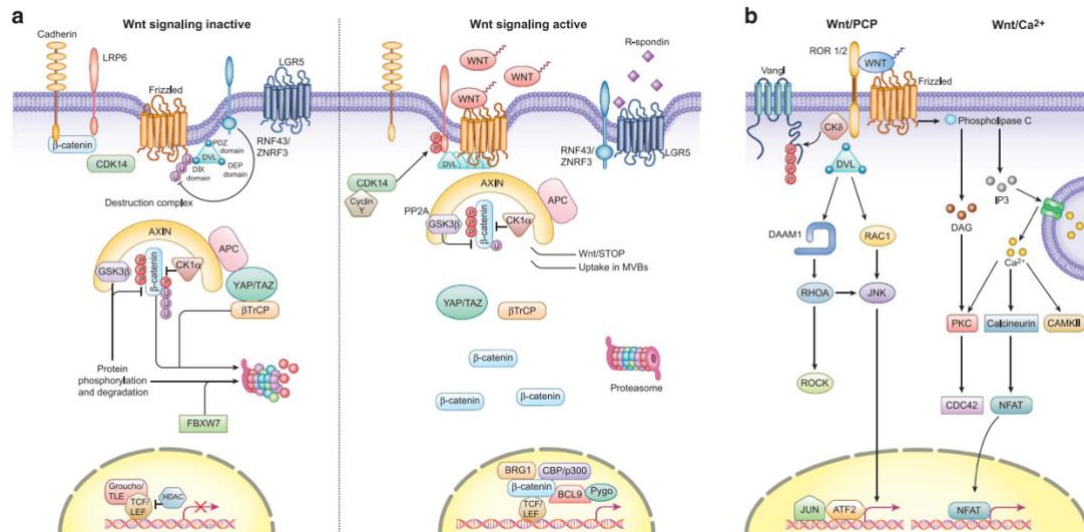


Abbildung 2: WNT-Signalweg, a: kanonischer Signalweg, b: nicht-kanonischer Signalweg (Quelle: Zhan, Rindtorff, Boutros 2017 (34))

1.5.2 Bildung von Tumorzellclustern

Ein weiterer Faktor bei der Metastasierung sind zirkulierende Tumorzellen, die entweder als einzelne Zellen oder in Form von Zellclustern (Tumorembolus), über die Blut- oder Lymphbahnen in andere Organe gelangen und sich dort zu Fernmetastasen entwickeln können. Es zeigt sich, dass mesenchymale Marker, die auch im Rahmen der EMT auftreten, von den Tumorzellclustern exprimiert werden. Die Cluster stammen von oligoklonalen primären Tumorzellklumpen ab, die ein hohes metastasenbildendes Potential haben und eine hohe Apoptoseresistenz aufweisen (35). An der Bildung dieser Tumorzellcluster sind unter anderem verschiedene Proteine beteiligt. So konnte in einer Studie von Aceto et al. 2014 die Beteiligung vom Pakoglobin an der Bildung von Lungenmetastasen bei Mammakarzinomen nachgewiesen werden (36). Auch Chemokine und Zytokine wie CXCL1 sind an der Metastasenbildung durch Tumorzellclusterbildung beteiligt. Durch eine veränderte Sekretion von CXCL1, Interleukin-8 und Zytokin-8 kann die Bildung dieser Cluster gehemmt werden und eine Metastasierung unterdrückt werden (35).

1.5.3 Bildung proteolytischer Enzyme

Die Bildung verschiedener proteolytischer Enzyme ermöglicht den Tumorzellen zum einen zelluläre Funktionen zu steuern, zum anderen kann durch die Spaltung verschiedener Oberflächenstrukturen eine Invasion in das umliegende Gewebe sowie Blut- und Lymphgefäße und andere anatomische Strukturen erfolgen. Beim kolorektalen Karzinom nehmen die zinkhaltigen Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) eine Schlüsselrolle ein. MMP 7 (Matrilysin) ist die am häufigsten überexprimierte Metalloproteinase und steuert beim KRK die Differenzierung, das Remodelling, die Invasion von Tumorzellen und die Metastasierung. Die Expression von MMP7 korreliert mit dem Grad der Malignität und der Bildung vorwiegend hepatischer Metastasen (37). In Bezug auf KISS1 konnte beim hepatozellulären Karzinom durch eine erhöhte Expression von KISS1 und daraus folgende Herunterregulierung der MMP9-Aktivität eine verminderte Metastasenbildung nachgewiesen werden (38).

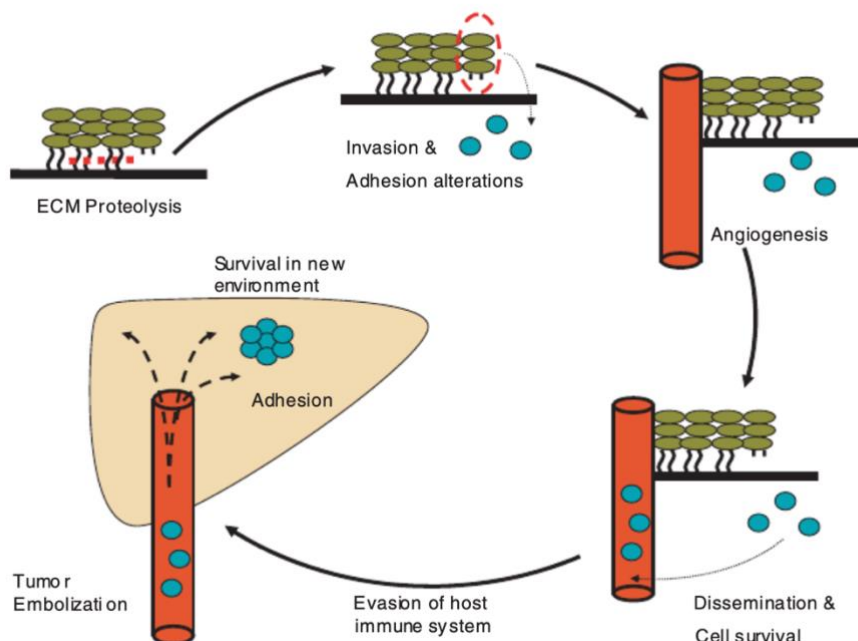


Abbildung 3: Die Rolle proteolytischer Enzyme bei der Metastasierung (Quelle: Rudmik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com)

Eine weitere bedeutsame Protease bei der Metastasierung des KRK ist die Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA). Eine hohe Expression des uPA-Rezeptors auf KRK-Zellen geht mit einer deutlich erniedrigten 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit einher (37).

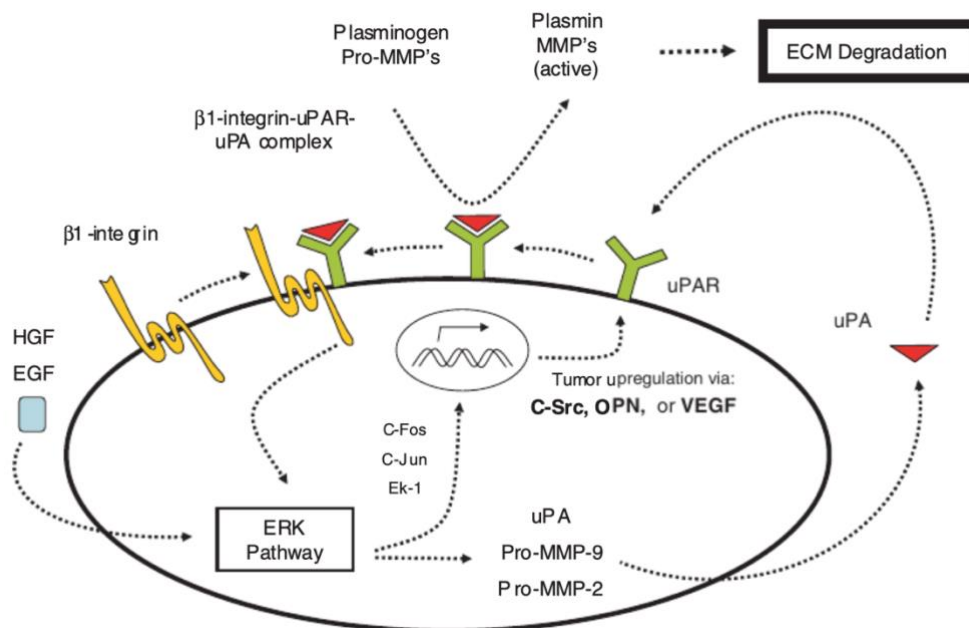


Abbildung 4: Die Rolle von Urokinase-Plasminogen-Aktivator (u-PA) und Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (u-PAR) bei der Metastasierung (Rudmik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com)

1.5.4 Veränderung von zellulären Haftmechanismen

Zelluläre Adhäsionsstrukturen und -moleküle sind entscheidende Faktoren bei der Metastasierung maligner Tumoren. Durch die Interaktion mit externen Signalen, die Steuerung intrazellulärer Signalwege und Steuerung der Zellmotilität haben sie eine hohe Bedeutung beim Tumorzellüberleben im jeweiligen, umgebenden Milieu. Beim KRK trifft dies besonders auf Integrine und Osteopontin zu. Die Integrine haben Einfluss auf die bevorzugte Absiedelung von Tumorzellen und Metastasenbildung in der Leber.

Osteopontin (OPN) übt seine Funktion über die Bindung an Integrin aus. Durch OPN werden das Zellüberleben, die Zellmotilität und die anti-apoptotische Wirkung intrazellulärer Signalwege gesteuert. OPN stellt einerseits einen Marker für die Tumorprogression dar, zum anderen beeinflusst es das Risiko für eine zukünftige Metastasierung (37).

1.5.5 Neoangiogenese

Bei den molekularen Mechanismen der Metastasierung hat die Neoangiogenese sowohl beim Wachstum des Primärtumors, als auch bei der Ernährung der Metastasen eine hohe Bedeutung. Durch die Neoangiogenese wird die Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff sichergestellt. Durch alleinige Diffusion wäre eine Versorgung mit Sauerstoff nur bis in eine Gewebetiefe von ca. 1-2 mm möglich. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Urokinase-Plasminogen-

Aktivator (uPA). Durch eine z. B. im Rahmen eines Tumorwachstums entstehende Gewebhypoxie kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF und somit zu einer gesteigerten Aussprossung von Gefäßen und einer gesteigerten Ausschüttung von Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), das wiederum eine hämatogene Verschleppung der Tumorzellen und die weitere Bildung von Fernmetastasen begünstigt. Eine vermehrte Expression von VEGF in Zellen des KRK geht mit einer deutlich schlechteren Prognose, einem schnelleren Tumorwachstum, sowie mit einem doppelt so hohen Risiko eines Tumorrezidivs bzw. einer erhöhten Sterblichkeit einher. Ein weiterer an der Tumorangio-genese beteiligter Wachstumsfaktor ist der Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF). Die genaue Funktion dieses Wachstumsfaktors ist derzeit noch nicht endgültig geklärt. Jedoch geht eine erhöhte Expression dieses Wachstumsfaktors laut einiger Studien die Sterblichkeit bei KRK um das Achtfache, unabhängig vom Tumorstadium (37). In Studien konnte bereits die antiangiogenetische Wirkung von KISS1 durch eine Herabregulierung der Sekretion von proangiogenetischen Faktoren und Verhinderung der vesikulären Wiederaufnahme von EGFR bei MDA-MB-231 triple-negativen Brustkrebszellen am Mausmodell nachgewiesen werden (39). Kisspeptin-10 bewirkt weiterhin eine Hemmung der Tumorangio-genese über eine Unterdrückung der Sp1-vermittelten VEGF-Expression (40).

1.5.6 Zellüberleben und Umgehung der Kontrolle durch das Immunsystem

Die Bildung von Fernmetastasen setzt das Überleben der losgelösten Tumorzellen während des hämatogenen oder lymphogenen Transportes und der Absiedelung in entfernten Geweben voraus. Besonders wichtig ist hierbei die Umgehung einer Kontrolle durch das Immunsystem. Der Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL/Apo-2-Ligand) gehört zu der Gruppe der Tumornekrosefaktoren (TNF) und bewirkt speziell in Tumorzellen den Zelltod durch Apoptose unter Schonung gesunder Körperzellen. Der TRAIL-Faktor findet sich in vor allem in natürlichen Killerzellen (NK) der Leber, wohingegen er in normalen T-Zellen oder NK's fehlt. Eine Steuerung der Expression von TRAIL in den NK findet über Interferon-gamma statt.

Ein weiterer wichtiger Signalstoff des Immunsystems bei der Steuerung des Tumorwachstums stellt das Interferon- β (IFN- β) dar. Auch IFN- β wird eine

antiapoptotische Wirkung zugeschrieben, die auf der Herunterregulierung von proapoptotisch wirkenden Genen beruht, in Folge kommt es zu einer Hemmung des Tumor- und Metastasenwachstums.

Eine weitere vom Immunsystem gesteuerte Komponente bei der Metastasierung stellen der Chemokinrezeptor CXCR 4 und sein Ligand CXCL12 (SDF-1; stromal cell derived factor-1) dar, die normalerweise ihre Funktion bei der Steuerung der Lymphozytenwanderung ausüben. In malignen Tumoren bewirkt CXCR 4 ein Herauslösen einzelner Tumorzellen aus dem Tumorgewebe und die Bildung von Mikrometastasen, vorzugsweise in der Leber. (37)

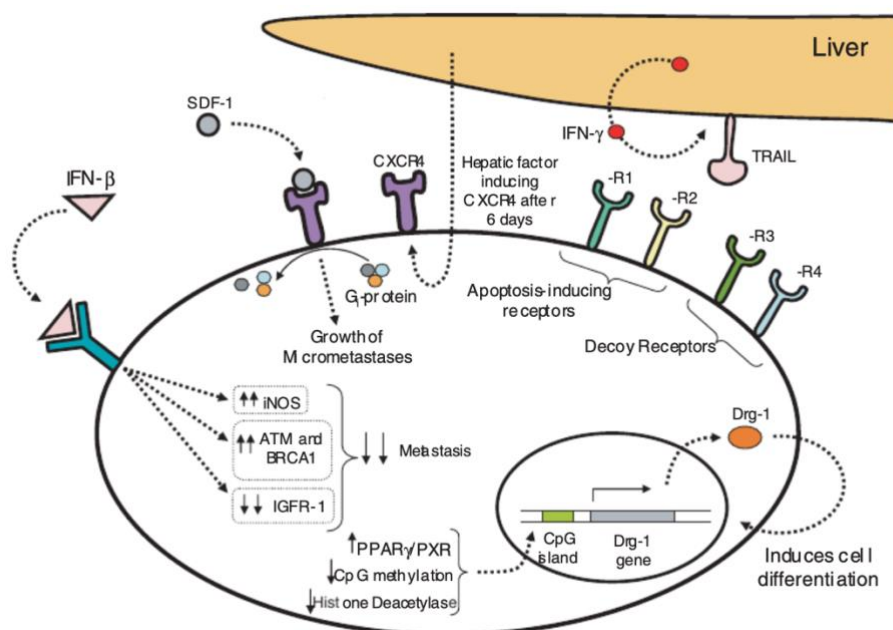


Abbildung 5: Darstellung des Apoptose-Signalwegs über TRAIL und IFN-β (Quelle: Rudnik and Magliocco 2005; www.interscience.wiley.com)

1.6 Häufigkeit der Metastasierung

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines KHK weisen ca. 20 % der Patienten ein Tumorstadium IV oder eine Metastase auf. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um eine Lebermetastase. Der zweithäufigste Ort der Metastasierung ist die Lunge (29). Deutlich seltener finden sich ovarielle Metastasen, ein Befall des Peritoneums, ossäre Metastasen, cerebrale Metastasen oder Nierenmetastasen (13, 41). Einen weiteren Faktor beim Ort der Metastasierung stellt der Sitz des Primarius dar. So zeigen sich deutliche Unterschiede bei der Fernmetastasierung beim Kolonkarzinom und beim Rektumkarzinom.

1.6.1 Metastasierung bei Kolonkarzinomen

So zeigt eine Studie von Riihimäki et al. aus dem Jahr 2016, dass bei Patienten mit einem Kolonkarzinom und einer solitären Metastase in allen Tumorstadien I bis IV vor allem die Leber befallen war (I = 51 %, II = 42 %, III = 49 %, IV = 48 %). Am zweithäufigsten war bei diesen Patienten das Peritoneum betroffen (I = 11 %, II = 14 %, III = 14 %, IV = 11 %) und am dritthäufigsten waren die thorakalen Organe betroffen (I = 10 %, II = 13 %, III = 13 %, IV = 4 %). Solitäre Metastasen im Bereich des Knochens, des ZNS oder anderen Bereichen des Gastrointestinaltrakts zeigten sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose seltener. Lagen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits drei und mehr Fernmetastasen vor, so zeigt sich vor allem im Tumorstadium I vorwiegend eine Metastasierung im Thoraxbereich (93 %). Ab dem Tumorstadium II war wiederum auch hier am häufigsten die Leber betroffen (II = 73 %, III = 80 %, IV = 91 %). An zweiter Stelle war bei Patienten mit Tumorstadium I und mehr als 3 Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die Leber betroffen (85 %), in den Tumorstadien II, III und IV die thorakalen Organe (II = 72 %, III = 75 %, IV = 76%) (42).

1.6.2 Metastasierung bei Rektumkarzinomen

Bei metastasierten Rektumkarzinomen ist bei allen Patienten der Stadien I bis IV und einer solitären Metastase am häufigsten die Leber betroffen (I = 38 %, II = 43 %, III = 44 %, IV = 80 %). Am zweithäufigsten sind bei allen Tumorstadien die thorakalen Organe betroffen (I = 34 %, II = 27 %, III = 25 %, IV = 12 %). An dritter Stelle steht bei Tumoren im Stadium I und IV das Peritoneum (I = 7 %, IV = 3 %), in den Stadien II und III ist findet man Metastasen am häufigsten im Knochen, sowie im ZNS-Bereich (II = je 5 %, III = 7 % Knochen, 5 % ZNS). Bei drei und mehr Metastasen ist in den Stadien I und IV am häufigsten die Leber betroffen (I = 89 %, IV = 93 %). In den Tumorstadien II und III sind bei drei und mehr Metastasen am häufigsten die thorakalen Organe betroffen (II = 79 %, III = 87 %). Am zweithäufigsten sind in den Stadien I und IV die thorakalen Organe betroffen (I = 86 %, IV = 84 %), in den Stadien II und III ist an zweiter Stelle die Leber betroffen (II = 66 %, III = 73 %). Am dritthäufigsten ist bei Patienten die drei und mehr Metastasen aufweisen in allen Stadien der Knochen betroffen (I = 41 %, II = 33 %, III = 39 %, IV = 37 %) (42).

1.7 Prognose

Bei der Prognose des Kolonkarzinoms sind das postoperative, pathologische Tumorstadium (pT-Kategorie) nach dem TNM-System der UICC und der Differenzierungsgrad (Graduierung) entscheidende Faktoren. Die Bestimmung des pathologischen Stadiums erfolgt im Wesentlichen anhand der Infiltrationstiefe. Hier unterscheidet man weiterhin ein expansiv-kohäsives Wachstumsmuster, das in 75 % der Fälle vorliegt von einem infiltrativ-dissoziiertem Wachstum bei 25 % der Erkrankungen. Im Stadium der pT1-Karzinome ist der frühzeitige Einbruch in Lymphgefäße ein wichtiges Prognosekriterium. Prognostisch günstig verlaufen hier hoch bis mittelhoch differenzierte Tumoren ohne Lymphgefäßeinbrüche und Invasion der Submukosa. Eine deutlich schlechtere Prognose weisen niedrig differenzierte oder undifferenzierte Karzinome mit Lymphgefäßinvasion und Submukosainfiltration auf. Weiter prognostisch ungünstige Kriterien sind eine Invasion venöser Blutgefäße, Infiltration der Perineuralscheiden und eine Dedifferenzierung und Knospenbildung des Tumors an der Invasionsfront, das sogenannte „budding“. Ebenfalls von hoher prognostischer Bedeutung ist das Vorhandensein eines Residualtumors (R1 bzw. R2-Resektion) und von Fernmetastasen. In Hinblick auf die Fünf-Jahrs-Überlebenszeit beträgt diese durchschnittlich im UICC-Stadium I 96 %, im Stadium II 85 %, im Stadium III 61 % und im Stadium IV nur 9%. Tabelle 2 bis 5 geben eine Übersicht über die Tumorstadien nach TNM, die Stadien des Lymphknotenbefalls, der Fernmetastasen und Resektionsränder. Tabelle 6 zeigt die Einteilung in die verschiedenen UICC-Stadien (43). Allgemein kann gesagt werden, dass die Überlebenschancen mit zunehmendem Alter sinken und bei jüngeren Patienten die Überlebenschancen für Frauen etwas höher sind als für Männer (44).

Primärtumor	
pTis	<ul style="list-style-type: none"> • Intraepitheliale „high-grade“ Neoplasie • Intraglandulär oder Infiltration der Lamina propria mucosae • Kein Durchbruch muscularis mucosae • Keine Infiltration der Submukosa
pT1	Infiltration bis in die Submukosa
pT2	Infiltration bis in die Muscularis propria
pT3	<ul style="list-style-type: none"> • Muscularis propria bereits überschritten • Ausdehnung bis ins perikolische bzw. perirektale Fettgewebe
pT4	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltration anderer Organe oder Strukturen und/oder • Infiltration des viszeralen Peritoneums

Einleitung

pT4a	Viszerales Peritoneum durchbrochen
pT4b	Benachbarte Organe oder Strukturen bereits infiltriert

Tabelle 2: Pathologische Einteilung gastrointestinaler Primärtumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)

Lymphknoten	
pN0	Kein regionärer LK-Befall
pN1	1 – 3 regionäre LK befallen
pN1a	1 regionärer LK befallen
pN1b	1 – 2 regionäre LK befallen
pN1c	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorbefall im subserösen bzw. perikolischen/perirektalen Fettgewebe • Keine regionären LK befallen
pN2	≥ 4 regionäre LK befallen
pN2a	4 – 6 regionäre LK befallen
pN2b	≥ 7 regionäre LK befallen

Tabelle 3: Pathologische Einteilung des Lymphknotenbefalls bei gastrointestinalen Tumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)

Fernmetastasen	
pM0	Keine Fernmetastasen vorhanden
pM1	Fernmetastasen vorhanden
pM1a	Metastasenbefall (solitär/multibel) in einem Organ
pM1b	<ul style="list-style-type: none"> • Metastasenbefall (solitär/multibel) in mehreren Organen • Peritonealkarzinose

Tabelle 4: Pathologische Einteilung des Fernmetastasenbefalls bei gastrointestinalen Tumoren nach TNM (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)

Resektionsränder	
RX	Resektionsränder nicht beurteilbar
R0	Kein Residualtumor vorhanden
R1	Residualtumor mikroskopisch vorhanden
R2	Residualtumor makroskopisch vorhanden

Tabelle 5: Makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Resektionsränder (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)

UICC-Stadium	Tumorstadium (TNM)	Lymphknotenbefall	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Jedes T-Stadium	N1, N2	M0
IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
IVA	Jedes T-Stadium	Jedes N-Stadium	M1a
IVB	Jedes T-Stadium	Jedes N-Stadium	M1b

Tabelle 6: Tumoreinteilung nach dem UICC-Stadium (Quelle: MANUAL gastrointestinale Tumoren)

1.8 Rolle des Biomarkers KISS1 bei der Metastasierung und der Prognose des KRK sowie bei anderen Tumoren

1.8.1 Das Gen KISS1

KISS1 ist ein auf Chromosom 1 an der Position q32-q41 lokalisiertes Gen, das einerseits physiologischen Vorgänge, wie den Eintritt in die Pubertät, die sexuelle Entwicklung und Schwangerschaft steuert, zum anderen auch eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Auf physiologischer Ebene wird KISS1 und seine zugehörigen Kisspeptine im Hypothalamus von spezifischen Neuronen exprimiert. Über diese Subpopulation erfolgt mittels Östradiol eine Hoch- oder Herunterregulierung von KISS1 über den Östrogenrezeptor- α (ER- α). Die Aktivierung von ER- α durch Östrogen erfolgt mittels sog. Estrogen-responsive Elements (ERE) oder alternativ über die Bindung von Kofaktoren wie AP1, SP1, NF κ B etc. Durch die anschließende Bindung an die DNA wird die Transkription gesteuert (45).

Betrachtet man die Funktion des KISS1-Gens im Zusammenhang mit der Bildung einer Krebserkrankung steuert es unter anderem die Tumorzellproliferation, die Metastasierung, die Invasion von Tumorzellen, sowie die Zelldifferenzierung und Apoptose in zahlreichen malignen Neoplasien. Hierzu zählen neben dem kolorektalen Karzinom insbesondere maligne Harnblasentumoren, Mammakarzinome und weitere gastrointestinale Krebserkrankungen (46).

Die Regulatoren des Gens erfolgt durch zwei Proteine: Thioreduxin-Interacting-Protein (TXNIP) auch genannt Vitamin-D-Upregulated-Protein (VDUP1) mit Lokalisation auf Chromosom 1 und den Cofaktor Cofaktor-required-for-SP1-Aktivität 3 (CRSP3) auch genannt Vitamin-D-Rezeptor-Interacting-Protein mit Lokalisation auf Chromosom 6 (45, 47). Die Genprodukte, verschiedene Kisspeptine, reagieren mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die den sogenannten Orphan-Rezeptoren angehören. Die intrazelluläre Wirkung dieser Rezeptoren beruht zunächst auf einer Hydrolyse von PIP₂, daraufhin kommt es zu einer Leerung von intrazellulären Kalziumspeichern und Freisetzung von Arachidonsäurederivaten, die dann ihre intrazelluläre Signalwirkung ausüben (48, 49). Zu den mit Kisspeptinen reagierenden G-Protein-Rezeptoren zählen beispielsweise GPR 54, AXOR 12 und hOT7T175 (48-51). Unter physiologischen Bedingungen findet sich die höchste Expression des Gens KISS1 in der Plazenta

und dem zentralen Nervensystem, etwas weniger auch in den Hoden und Ovarien, Pankreas, Leber, Fettgewebe, Herz und stellenweise im Gastrointestinaltrakt (45, 52). Auf den Zellen einiger dieser Gewebe finden sich dementsprechend auch vermehrt die zugehörigen Orphanrezeptoren. So wird GPR 54 vorwiegend in der Plazenta, der Hypophyse, der Bauchspeicheldrüse und im Rückenmark exprimiert, der Rezeptor AXOR 12 ist vor allem in der Plazenta, der Hypophyse und dem Gehirn lokalisiert (48, 49). Die schematische Darstellung des KISS1-Rezeptors und seiner intrazellulären Wirkungsweise ist in Abbildung 2 dargestellt (53).

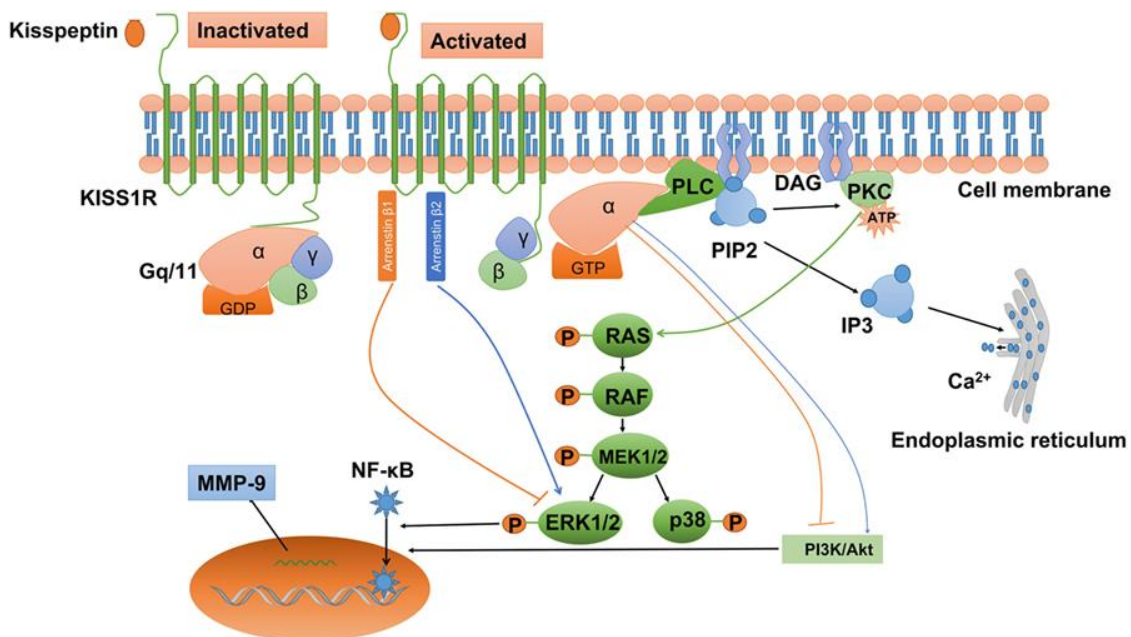


Abbildung 6: schematische Darstellung des KISS1-Rezeptors und seiner intrazellulären Signalkaskade (Quelle: Hu, Chao, Zhang et al., 2017)

1.8.2 Die Funktion des Gens KISS1 und seiner Genprodukte

Die Wirkung der KISS1-Genprodukte im Rahmen der Karzinogenese und auf physiologischer Ebene unterscheiden sich grundlegend. Während bei der KISS1 in Tumorzellen vor allem eine Unterdrückung der Metastasenbildung bewirkt, stehen auf physiologischer Ebene eher endokrine Funktionen im Vordergrund (47, 54). Kisspeptine und ihre zugehörigen Rezeptoren regulieren die Entstehung und die Metastasierung einer Krebserkrankung auf vielfältige Weise (55). Die Funktion dieses Genprodukts wird dabei zum einen über die quantitative Expression, zum anderen über den Methylierungsstatus bestimmt. Beispielsweise zeigen besonders gastrointestinale Tumoren verstärkt eine Hypermethylierung im Bereich des KISS1-Promotors (46). Die metastasenhemmende Wirkung dieses Gens bewirkt in Tumorzellen eine

Hemmung der Zellmigration, eine verminderte Chemotaxis und Unterdrückung der Invasion von Tumorzellen. Zudem wird auch eine Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts angenommen. KISS1 bildet weiterhin verschiedene Peptide (Kisspeptin 10, 13, 14 und 54 (Metastin)), unter anderem ein am C-Ende aminiertes Peptid (Kisspeptin 54), dass als endogener Ligand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR54 seine Funktion ausübt. Die Rolle von Kisspeptin-54 und GPR54 stehen neben physiologischen Vorgängen vor allem bei pathologischen Vorgängen im Vordergrund. KISS1/GPR54 hemmt die Aktivierung die Zellproliferation und -migration und verhindert dadurch die Metastasenbildung und die Tumorinvasion und -progression. KISS1/GPR54 fördert weiterhin die Zelldifferenzierung (55, 56).

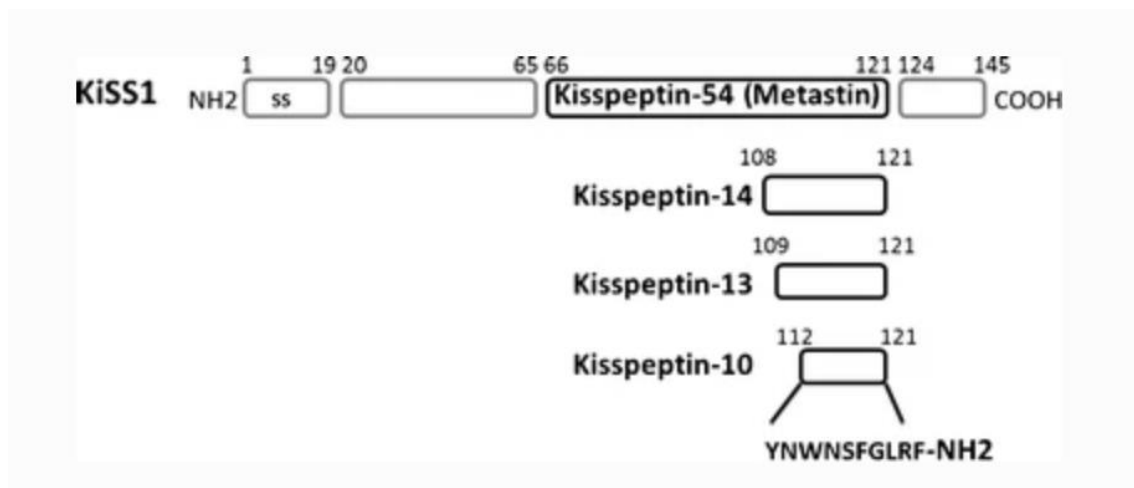


Abbildung 7: Produktion der Kisspeptine; die Kisspeptine 10, 13, 14 und 54 werden aus dem 145 Aminosäuren umfassenden Pro-Kisspeptin herausgeschnitten und von der Zelle sezerniert (Quelle: Cho et al., 2012)

Eine weitere Funktion besteht in der Einleitung der Apoptose über eine RhoA-ROCK-Aktivierung. Die genaue intrazelluläre Signalkaskade ist bis heute nicht bekannt. RhoA-assoziierte Proteinkinasen steuern eine Vielzahl grundlegender Zellfunktionen unter anderem Kontraktion, Motilität, Proliferation und Aufbau des Zytoskeletts. Im Rahmen der Apoptose wird über eine RhoA-assoziierte Proteinkinase, das sogenannte „membrane blebbing“, ein blasenähnliches Anschwellen der Zelle vor dem Zelltod bewirkt (55, 57).

Auf physiologischer Ebene bewirken vor allem die Kisspeptine 10, 13, 14 und 54 (=Metastin) über den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR 54) die GnRH-induzierte Gonadotropinsekretion und aktivieren pubertale GnRH-Neuronen. Dies führt zum Eintritt in die Pubertät und Steuerung der sexuellen Entwicklung (47, 49, 54). Weitere physiologische Funktionen liegen in der Steuerung des

zirkadianen Rhythmus, der Knochenbildung, der Entwicklung der Nieren und dem Fettstoffwechsel (45).

1.8.3 Regulierung von KISS1

Die Regulierung von KISS1 erfolgt zum einen auf genetischer Ebene, zum anderen über die Menge der Proteinbildung. Die Ursache hierfür liegt in gewebe- und zellspezifischen Merkmalen und wird in Kapitel 1.8.1 beschrieben.

1.8.4 Rolle von KISS1 bei der Metastasierung verschiedener maligner Tumoren

Die Unterdrückung der Metastasierung zählt zu den Hauptfunktionen des Tumorsuppressorgens KISS1. Die Expression von KISS1 wurde zunächst als Metastasierungsfaktor im malignen Melanom entdeckt. Bei der Metastasierung des schwarzen Hautkrebses kommt es über die Kisspeptine 10, 13, 14 und 54 (=Metastin) und den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR 54, hOT7T175, AXOR 12) zu einer Unterdrückung der Metastasierung. In den Melanomzellen findet sich in der Hälfte der metastasierten Krankheitsfälle ein Funktionsausfall der Regulatoren auf Chromosom 6, folglich wird eine Metastasenbildung begünstigt (47, 49). Kurze Zeit später wurde dieses Gen auch beim Mammakarzinom als ein entscheidender Faktor bei der Bildung von sekundären Tumoren entdeckt, aber auch als Induktor der Tumorzellphagozytose und Apoptose, identifiziert. Beim metastasierten Mammakarzinom findet sich bei diesem Gen häufig eine Deletion des Gens in Chromosom 1 (47). Die verschiedenen Kisspeptine und ihr zugehöriger Rezeptor zeigen beim Mammakarzinom unterschiedliche Funktionen und Merkmale. Das Kisspeptin-10 hemmt die Stimulation der RhoA-Kinase durch den Tumornekrosefaktor- α . Dies bewirkt eine schlechtere Invasion der Brustkrebszellen bei der Absiedelung in fremden Geweben, insbesondere bei der Bildung von Lungenmetastasen. Eine verminderte KISS1/GPR54-Expression wurde hingegen bei der Bildung von Fernmetastasen und Lymphknotenbefall festgestellt. Auf der anderen Seite zeigen hingegen besonders aggressive, östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome eine vermehrte Expression von KISS1/GPR54 (55). Allerdings ist ein hoher Polymorphismus im KISS1-Gen ist nicht nur mit einer verstärkten Metastasenbildung und aggressiveren Tumoren assoziiert, sondern auch mit einem generell erhöhten Brustkrebsrisiko (47, 58). Eine erhöhte Expression von KISS1/GPR54 konnte neben dem Mammakarzinom auch in

einigen Zelllinien (K562, KU812, LAMA84) der akuten myeloischen Leukämie (AML) festgestellt werden (55). Beim Urothelkarzinom spielt neben einer verminderten Expression des KISS1-Gens auch der Methylierungsgrad eine wichtige Rolle. So konnte festgestellt werden, dass Patienten, die neben einer geringen KISS1-Expression in den Tumorzellen, zusätzlich noch einen hohen Methylierungsgrad dieses Gens aufwiesen, eine raschere Tumorprogression zeigten und eine deutlich schlechtere Überlebensprognose hatten, als Patienten, die als einzelnes Merkmal eine verminderte KISS1-Expression aufwiesen (52). Eine weitere Gruppe von malignen Erkrankungen, in denen der KISS1-Status von Bedeutung ist, stellen die gastrointestinalen Tumoren dar. In der immunhistochemischen Untersuchung findet sich eine homogene KISS1-Expression zum einen in der normalen Mukosa, wobei die Expression in der tiefer gelegenen Proliferationszone sich etwas schwächer darstellt, wohingegen die oberflächlichen, foveolären Epithelzellen und tiefer gelegenen Drüsenzellen eine etwas stärkere Farbreaktion zeigen. Bei Tumoren zeigt sich vor allem in den metaplastischen Randbereichen eine positive Reaktion, wohingegen im eigentlichen Tumor sich die KISS1-Expression eher schwach bis heterogen zeigt (59). Beim KRK konnte eine KISS1-Expression vorwiegend im Zytoplasma der Malignomzelle gefunden werden, jedoch nicht in der normalen Mukosa (60). Zusammen mit dem Orphan-G-Protein-Rezeptor hOT7T175 (=GPR 54) zeigt das KISS1-Gen auch eine metastasenhemmende Wirkung beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und der Bauchspeicheldrüse. So konnte beim Verlust von entweder KISS1 oder dem hOT7T175-Rezeptor eine verstärkte Bildung von Lymphknotenmetastasen festgestellt werden (50). Auch beim Pankreaskarzinom stellt der Metastin-Rezeptor hOT7T175 einen wichtigen Faktor bei der Unterdrückung der Metastasierung dar (51). Beim hepatozellulären Karzinom konnte eine gegenteilige Wirkung festgestellt werden. So korreliert eine Überexpression des KISS1-Gens zusammen mit einem vermehrten Auftreten des hOT7T175-Rezeptors mit einer deutlichen Tumorprogression und verkürzten Überlebenszeit (61).

1.8.5 Die Rolle von KISS1 bei nicht neoplastischen Erkrankungen

KISS1 und der zugehörige GPR54-Rezeptor haben nicht nur Einfluss auf die Entwicklung diverser maligner Erkrankungen, sie steuern eine Vielzahl biologischer Vorgänge, die bei einer Über- bzw. Unterexpression entsprechende

Krankheitsbilder zeigen. Eine sehr wichtige Funktion besteht in der Steuerung der Gonaden über die hypothalamisch-hypophysäre-Hormonachse. Bei einem Funktionsverlust von GPR54/KISS1 lässt sich besonders häufig das Krankheitsbild des idiopathischen hypothalamischen Hypogonadismus (IHH) feststellen, der zu einem erniedrigten Spiegel vor allem von LH und FSH führt und massive Auswirkungen auf die menschliche Fertilität hat. Bei einer vermehrten Expression von KISS1 kommt es hingegen zu einem vorzeitigen Eintritt in die Pubertät (55, 62). Auch in der Schwangerschaft kommt KISS1 eine wichtige Rolle bei der Funktion der Plazenta und der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zu. So konnte eine deutlich erhöhte Expression von KISS1 in humanen Synzytiotrophoblasten beim Auftreten einer Präeklampsie festgestellt werden (63).

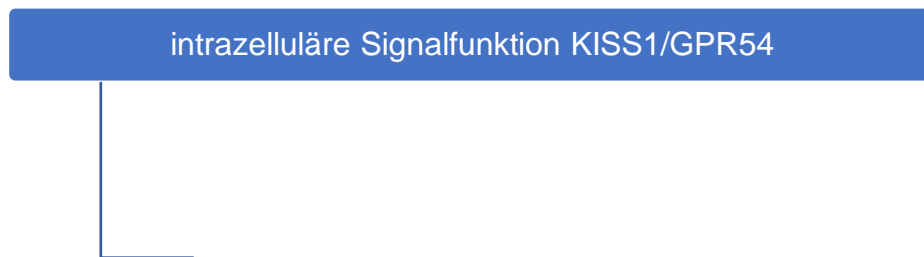


Abbildung 8: Die Funktion von KISS1/GPR54 bei physiologischen und pathologischen biologischen Prozessen (Quelle: Cho et al., 2012)

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Trotz erheblicher Fortschritte in der Vorsorge, Diagnostik und Therapie von kolorektalen Karzinomen stellen sie nach wie vor eine der häufigsten Tumorerkrankungen sowohl bei Männern als auch bei Frauen dar (1, 2). Durch die sich stetig verbessernde Diagnostik, vor allem im Bereich der Molekularpathologie ist es möglich die genetischen Merkmale des KRK immer besser zu entschlüsseln. Diese genetischen Muster liefern nicht nur Hinweise auf die Wachstumseigenschaften und Metastasierungsneigung des KRK, sondern ermöglicht es frühzeitig gezielte Therapien zu planen. Im Rahmen meiner Arbeit wurde die KISS1-Expression bei pulmonal metastasierten KRK mit der KISS1-Expression bei hepatisch metastasierten malignen Tumoren und nicht-metastasierten KRK verglichen. Die Fragestellung meiner Arbeit beinhaltet vor allem, ob ein verstärktes Auftreten des Oberflächenmarkers KISS1 bei der pulmonalen Metastasierung sich von hepatisch metastasierten KRKs und nicht metastasierten malignen Darmtumoren unterscheidet. Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von KISS1 auch mit dem Auftreten von weiteren Merkmalen wie anderen Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen, dem Geschlecht, dem Alter, dem T-Stadium, dem Differenzierungsgrad oder auch einer verstärkten Neigung zu Lymphknotenbefall korreliert. Das Ziel der Arbeit beinhaltet, dass zukünftig eine hohe Metastasierungsneigung beim KRK frühzeitig erkannt wird und somit bereits in niedrigen Tumorstadien eine passende und zeitnahe Therapie geplant werden kann.

3 Methoden

3.1 Auswahl und Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Unsere Untersuchung wurde als retrospektive Fall-Kontrollstudie geplant. Hierbei wurden uns Daten des Tumorregisters München zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Daten erfolgte anschließend die Auswahl der Patientenfällen, die in der Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München behandelt wurden und Patienten, die in anderen Kliniken behandelt wurden und histologisches Material an das pathologische Institut der LMU gesandt wurde. Es wurde ein Zeitraum von 20 Jahren festgelegt und Daten von Patienten erhoben, die zwischen 1998 und 2018 die Erstdiagnose „kolorektales Karzinom“ erhielten. Es wurden dabei sowohl Patienten mit einem Kolonkarzinom, als auch Patienten mit einem Rektumkarzinom in die jeweiligen Untersuchungsgruppen aufgenommen.

3.1.1 Zusammenstellung des Patientenkollektivs

Das zentrale Kriterium bei der Zusammensetzung unserer Testgruppen war das Vorhandensein mindestens einer pulmonalen Metastase im besagten Zeitraum. Die Kontrollgruppen bildeten zum einen eine Patientengruppe, die innerhalb eines Zeitraums von 5 Jahren keine Metastase aufwiesen. Die Zweite Kontrollgruppe bildete eine Gruppe von Patienten, bei der zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder im Untersuchungszeitraum mindestens eine hepatische Metastase nachgewiesen werden konnte.

3.1.2 Matching der Testgruppen

Um eine möglichst große Homogenität bei der Auswahl des Patientenkollektivs zu erhalten, wurden Triplets gebildet, in denen aus jeder Gruppe ein Patientenfall vertreten ist. Die Zusammenstellung der Triplets erfolgte nach möglichst ähnlichen Merkmalen. Diese Merkmale bezogen sich auf das Geschlecht, die Lage des Primarius und das Tumorgrading.

Geschlecht

Nach Möglichkeit wurden bei der Bildung der Triplets nach Geschlechtern getrennt. Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Häufigkeit der Risikofaktoren und protektiver hormoneller Faktoren. So weisen Männer deutlich häufiger Risikofaktoren, wie Nikotin- oder Alkoholkonsum, auf. Frauen hingegen, haben möglicherweise einen Schutz durch den beim weiblichen Geschlecht

höheren Östrogenspiegel (64). Aufgrund eines Mangels an ausreichenden Matchingpartnern, konnte eine strikte Trennung nach Geschlechtern stellenweise nicht erfolgen und 23 Triplets enthalten männliche und weibliche Patientendaten.

Primariuslage

Ein weiteres Matching-Kriterium bezog sich auf die Lage des Primarius. Hier wurde in rechtsseitig lokalisierte Tumoren und linksseitig lokalisierte Tumoren unterteilt. Die Grenzstruktur bildete in unserer Studie die linke Kolonflexur. Dieses Kriterium wurde ausgewählt, da hier relevante Unterschiede im Erkrankungsalter, dem Metastasierungsverhalten und in der Prognose liegen. So tritt das linksseitig lokalisierte KRK vor allem bei jüngeren Patienten auf, das rechtsseitig lokalisierte Karzinom eher bei älteren Patienten. Linksseitig lokalisierte Tumoren bilden vorwiegend pulmonale und hepatische Metastasen, wohingegen die rechtsseitig lokalisierten Tumoren zu Peritonealmetastasen neigen. Auch in der Prognose zeigt sich bei der Lokalisation ein Unterschied. So haben Patienten mit rechtsseitig lokalisierten Tumoren vor allem eine bessere Prognose, wenn der Tumor in den Stadien I und II diagnostiziert wird, bei linksseitigen Tumoren liegt paradoxerweise eine bessere Prognose in den Stadien III und IV vor. Bei der Bildung unserer Triplets zeigte sich deutlich, dass die meisten unserer untersuchten Tumoren linksseitige Tumoren waren. Wir konnten Daten für insgesamt für neun rechtsseitige Triplets gewinnen und Daten für 72 linksseitige Triplets.

Tumorgrading

Bei der Auswahl des Tumorstadiums wurden Daten der von Tumoren mit dem Differenzierungsgrad G2 und G3 gesammelt. Der Grund hierfür liegt in der klinischen Bedeutung bei der Therapieplanung. So ist bei gut ausdifferenzierten Tumoren meist eine operative Therapie ausreichend, wohingegen bei schlecht ausdifferenzierten, hoch malignen Tumoren in der Regel zusätzlich eine Chemotherapie/Strahlentherapie notwendig ist, da high-grade-Tumoren bösartiger sind, schneller wachsen und früher Metastasen bilden (65, 66). Im Rahmen unserer Untersuchung wurden gezielt moderat (G2) bis schlecht ausdifferenzierte (G3) Tumoren ausgewählt, da bei diesen Tumoren häufig eine Metastasierung bereits vorliegt und zudem hier die höchste Fallzahl gewonnen werden konnte.

Lymphknotenmetastasen

Liegen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen vor, so besteht ein erhöhtes Risiko eine Fernmetastase zu entwickeln. Weiterhin verschlechtert sich mit zunehmender Anzahl der nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen auch die 5-jahres-Überlebensrate (13, 67).

Somit konnten drei möglichst homogene Studiengruppen zusammengestellt werden. Die Datensammlung erfolgte zum einen mit im klinikinternen SAP®-System archivierten Patientenakten anhand von Anamnesebögen, Untersuchungs- und Operationsberichten und Arztbriefen, zum anderen aus archivierten Untersuchungsberichten des Pathologischen Instituts der LMU. Bei der Auswahl des histologischen Untersuchungsmaterials wurden Primärtumoren, Biopsien und Fernmetastasen des KRK ausgewählt. Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe der Befunddatenbank des pathologischen Instituts die entsprechenden Archivnummern der Patientenfälle festgestellt und die zugehörigen Schnitte aus dem Archiv des pathologischen Instituts an den Standorten Innenstadt und Großhadern herausgesucht. Anhand der Schnitte wurden die Paraffinblöcke ausgewählt, die einen möglichst großen Anteil an Tumormasse aufwiesen. Im Anschluss wurde, um die Patientenfälle irreversibel zu anonymisieren, zum einen jedem Patienten und jedem Tripletts eine fortlaufende Nummer zugeteilt. Schlussendlich konnten 81 Tripletts zusammengestellt werden. Unsere anonymisierten Daten wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel für Mac, Version 16.34 gesammelt, verwaltet und archiviert.

3.2 Vorbereitung der Proben

Im nächsten Schritt wurde von dem von uns ausgewählten Patientenkollektiv aus dem Archiv des pathologischen Instituts die zugehörigen fertig gefärbten H.E.-Schnitte des Tumorgewebes herausgesucht. Unter dem Mikroskop wurde zunächst geprüft ob die ausgewählten Gewebeproben eine ausreichende Menge an Tumorgewebe aufwiesen. Anschließend wurden die zugehörigen Paraffinblöcke im Archiv des pathologischen Instituts der LMU herausgesucht. Bei den von uns verwendeten Gewebeproben handelt es sich um in gepufferter Formaldehydlösung fixiertes und anschließend in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE). Von den ausgewählten Paraffinblöcken wurden im histologischen Labor an den Standorten Innenstadt und Großhadern mit dem Rotationsmikrotom

Paraffinschnitte mit einer Stärke von 5 µm angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden zunächst in 70 °C warmen Wasser geglättet, auf Objektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank getrocknet. Pro Paraffinblock wurde mindestens ein Schnitt für eine nochmalige H.E.-Färbung und mindestens ein Schnitt für die nachfolgende immunhistochemische Färbung angefertigt. Auf der H.E.-Färbung wurde von Prof. Dr. Dr. Jens Neumann das Vorhandensein von Tumorgewebe kontrolliert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung. Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte durch unsere medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentinnen und -assistenten.

3.3 Immunhistochemische Anfärbung der Paraffinschnitte

Aufbauend auf die Identifizierung unseres Biomarkers erfolgte im nächsten Schritt eine immunhistochemische Anfärbung unserer Paraffinschnitte. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Identifizierung einer bestimmten Gewebeeigenschaft oder wie in unserem Fall eines bestimmten Biomarkers auf der Zelloberfläche durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der für diese Oberflächeneigenschaft spezifische Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt ist. Als Marker bei der Immunhistochemischen Reaktion dienen meist Enzyme wie die Meerrettichperoxidase oder die alkalische Phosphatase, aber auch Fluorochrome und Biotin (68). Bei unseren Untersuchungen wurde zunächst ein Maus-Primär-Antikörper gegen den Biomarker KISS-1 (Millipore, Cat.No. MABC60, Merck KGaA, Darmstadt) auf die zu untersuchenden Proben aufgebracht. Als Detektionssystem diente ein gegen IgG der Maus gerichteter Pferdeantikörper (ImmPRESS Anti-Mouse IgG-Polymer-Kit, Cat.No. MP-7402, Vector Laboratories, Maravai LifeSciences, California, USA), der an Meerrettichperoxidase gekoppelt mit Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) am Ort des Oberflächenmarkers ein stabiles braunes Farbprodukt bildet. Bei der Anfärbung der Tumorschnitte wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte. Dies erfolgte im ersten Schritt mit Xylol und danach in einer absteigenden Alkoholreihe. Danach erfolgte eine Demaskierung des Antigens in unseren Proben bei 750 Watt in der Mikrowelle mit einem Antigen-Retrieval-Puffer (AR-10, Cat.No. HKO57-5KE, DCS, Hamburg, BRD). Die Kochzeit betrug zweimal 15 Minuten, anschließend kühlten die Proben bei Raumtemperatur 20 Minuten ab. Die Schnitte wurden zweimal je fünf Minuten mit

einem TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült. Im nächsten Schritt erfolgte eine Blockierung der endogenen Peroxidase mit 7,5 %igen, wässrigen Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden nachfolgend zehn Minuten fließend gewässert und zweimal je fünf Minuten mit TRIS-Puffer gespült. Danach wurde ein Blocking-Serum auf die Schnitte aufgebracht, der Überstand nach 20 Minuten abgekippt und die Proben mit dem Anti-KISS1-Mausantikörper (Verdünnung 1:50) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneut eine zweimalige Spülung mit TRIS-Puffer für je fünf Minuten. Nun wurde der Anti-Maus-IgG-Antikörper für 30 Minuten auf die Schnitte aufgebracht und der Überschuss in einem weiteren Waschschrift, ebenfalls mit TRIS-Puffer zweimal je fünf Minuten entfernt. Zur Farbentwicklung diente eine dreiminütige Inkubation der Proben mit DAB+ (Cat.No. K3467, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), anschließen wurden die Schnitte erneut für zehn Minuten fließend gewässert. Im letzten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill`s Formula (Cat. No. H-3401, Vector Laboratories, Maravai LifeSciences, California, USA) für zehn Sekunden und ein erneutes fließendes Wässern für zehn Minuten. Die Schnitte wurden mit Aquatex (Cat. No. 1.08562.0050, Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

3.4 Auswertung der Immunhistochemie mittels H-Score

Die Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop in zwei unterschiedlichen Vergrößerungsstufen, bei 100facher und 200facher Vergrößerung. Es wurde zunächst der Teil des Schnittes ausgewählt, in dem die Tumorzellmasse am dichtesten lag, anschließend erfolgte die Beurteilung der Farbtintensität der Zellkerne. Separat wurde noch die Anfärbarkeit des Zytoplasmas beurteilt. Im Wesentlichen wurden drei Merkmale betrachtet. Es wurde der Anteil aller positiv reagierenden Tumorzellen quantifiziert, die Anfärbarkeit der Kerne und die Farbreaktion des Zytoplasmas beurteilt. Die Farbreaktion der Kerne wurde in vier Intensitäten eingeteilt, wobei Grad 0 keinerlei Farbreaktion zeigte, Grad 1 eine leichte Anfärbung, Grad 2 eine mittelstarke Anfärbarkeit und Grad 3 eine stark ausgeprägte Farbreaktion. Im Anschluss wurde ein Score berechnet, wobei prozentuale Anteil der jeweiligen Farbreaktion mit dem jeweiligen Grad multipliziert wurde. Im Anschluss wurde ein Score-Ergebnis kleiner als 120 als „KISS low“ definiert und ein Score größer

als 120 als „KISS high“ eingruppiert. Die Anfärbbarkeit des Zytoplasmas erfolgte ebenfalls in vier Intensitätsgraden.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung haben wir uns an einem semiquantitativen Auswertungsschema orientiert, dass häufig auch bei der Bewertung hormonrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen gebräuchlich ist und neben der Farbintensität auch den prozentualen Anteil der positiven Zellen berücksichtigt (69).

Färbeintensität	Farbreaktion	H-Score-Teilwerte
0	Keine Farbreaktion	% der Zellen ohne Färbung x 0
1	Schwache Farbreaktion	% der Zellen mit Farbintensität 1 x 1
2	Mäßig starke Farbreaktion	% der Zellen mit Farbintensität 2 x 2
3	Starke Farbreaktion	% der Zellen mit Farbintensität 3 x 3
Summe aller Werte der einzelnen H-Score-Teilwerte bildet den H-Score-Wert		

Tabelle 7: Schematische Tabelle zur Bildung des H-Score-Werts

Die Berechnung des H-Score erfolgt durch Multiplikation der Färbeintensität mit dem prozentualen Anteil positiver Zellen, anschließend wird daraus die Summe gebildet. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst. In einem Nächsten Schritt wurden die Ergebnisse in hohe und niedrige KISS-Expression unterteilt. Die Grenze wurde hierbei bei 120 festgesetzt, somit wurde ein Score-Ergebnis < 120 als KISS-low und ein Ergebnis >120 als KISS-high festgelegt.

3.5 Statistische Auswertung

Zur tabellarischen Sammlung und Verarbeitung der gewonnenen Daten und Ergebnisse wurde Microsoft® Excel for Mac Version 16.40 verwendet. Weitere statistische Berechnungen, die Auswertung unserer Ergebnisse und zum Erstellen der Überlebenskurven wurde das Programm SPSS® Statistics Version 26 (IBM® Inc, Armonk, New York, USA) verwendet. Die von uns erstellte Hypothese wurde mit dem Chi²-Test nach Pearson überprüft. Dieser Test überprüft die stochastische Unabhängigkeit von zwei Faktoren, also ob ein Zusammenhang zwischen der pulmonalen Metastasierung und der Expression des Biomarkers KISS1 besteht. Die Werte wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war und somit die Irrtumswahrscheinlichkeit unter fünf Prozent betrug.

4 Ergebnisse

4.1 Statistische Auswertung allgemeiner Merkmale bei der Metastasierung

4.1.1 Geschlechterverteilung

Betrachtet man die einzelnen Testgruppen bei der Verteilung auf Männer und Frauen, so lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Bildung von Metastasen bei männlichen und weiblichen Probanden feststellen. In unserer Untersuchung wiesen deutlich mehr Männer eine Leber- oder Lungenmetastase auf. So wiesen 66,7 % (54 von 81 Patienten) der Männer in der pulmonalen Gruppe eine Lungenmetastase auf und 60,5 % (49 von 81 Patienten) der männlichen Patienten in der hepatischen Gruppe eine Lebermetastase, wohingegen nur 33,3 % (27 von 81 Patienten) der Frauen in der PUL-Gruppe pulmonal metastasiert waren und 39,5 % (32 von 81 Patienten) der weiblichen Patienten in der HEP-Gruppe eine hepatische Metastase aufwiesen. Bei der Patientengruppe, die keine Metastase bis zu fünf Jahre nach Erstdiagnose aufwiesen, waren 48,1 % (39 von 81 Patienten) männlich und 51,9 % (42 von 81 Patienten) weiblich. Der p-Wert betrug 0,052.

4.1.2 Lokalisation des Primarius

Bei der Betrachtung der Lokalisation des Primarius wurden zum einen der Unterschied zwischen rechtsseitiger und linksseitiger Lokalisation (Grenze war hier die linke Kolonflexur) und zum anderen zwischen Lokalisation im Kolon, Rektum und rektosigmoidaler Übergang ausgewertet. Betrachtet man zunächst die Lokalisationen in den einzelnen Testgruppen, so fällt auf, dass Patienten, die eine pulmonale Metastasierung aufweisen in 60,5 % der Fälle (49 von 81 Patienten) der Primärtumor im Rektum auftrat. Anders bei der metastasenfreien Patientengruppe. Hier zeigte sich die primäre Lokalisation in 61,7 % im Kolon (50 von 81 Patienten). Bei der Testgruppe mit hepatischer Metastasierung stellten wir eine weitestgehend gleiche Verteilung fest. 38,3 % (31 von 81 Patienten) der Patienten wiesen ein primäres Kolonkarzinom auf, 48,1 % (39 von 81 Patienten) der Patienten zeigten ein primäres Rektumkarzinom. Ein primäres Karzinom im kolorektalen Übergang lag bei 8,6 % (7 von 81 Patienten) der Fälle sowohl in der pulmonal metastasierten als auch in der metastasenfreien Patientengruppe vor, bei der hepatisch metastasierten Patientengruppe zeigte sich in 12,3 % (10

von 81 Patienten) der Primarius im kolorektalen Übergang. Bei zwei Patienten lagen hierzu keine Daten vor. Der p-Wert lag bei der Auswertung bei 0,001. Somit liegt ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Primarius, dem Auftreten von Metastasen und dem Ort der Metastasierung vor.

4.1.3 Einfluss der vaskulären Anatomie

Aus der Annahme, dass die vaskuläre Anatomie Einfluss auf die Metastasenlokalisierung hat, wurde in einem weiteren Schritt wurde die Lage des Primarius und der KISS1-Status in Bezug zur Linea dentata betrachtet.

Lage des Tumors in Bezug zur Linea dentata	KISS-high	KISS-low	Gesamtzahl
proximal	31	17	48
distal	21	12	33
Gesamtzahl	52	29	81

Tabelle 8: KISS1-Status bei distalen kolorektalen Karzinomen in Bezug zur Linea dentata

In der Gruppe der pulmonal metastasierenden KRK mit Primariuslokalisierung im mittleren und unteren Rektum sitzenden Tumoren zeigte sich verglichen mit proximal lokalisierten KRK kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf den KISS1-Status. Der p-Wert liegt bei dieser Auswertung bei 0,930.

4.1.4 Lymphknotenstatus pulmonal, hepatisch und nicht metastasierter Tumoren

Bei der Untersuchung des Lymphknotenbefalls in den Testgruppen, zeigt sich, dass in der metastasenfremen Testgruppe 63 % (51 von 81) der Patienten keinen Lymphknotenbefall hatten. Bei 34,5 % (28 von 81 Patienten) lag ein Lymphknotenbefall vor, bei 2,5 % (2 von 81 Patienten) ist der Status unbekannt. Bei der Patientengruppe mit Lebermetastase wiesen 60,5 % (49 von 81) eine Lymphknotenmetastase auf, 38,8 % (31 von 81 Patienten) wiesen keinen Lymphknotenbefall auf und bei 1,2 % (1 Patient von 81) gab es hierzu keine Angabe. In der Patientengruppe mit pulmonaler Metastasierung konnte bei 38,3 % (31 von 81 Patienten) ein Lymphknotenbefall diagnostiziert werden, 25,9 % (21 von 81 Patienten) waren frei von Lymphknotenmetastasen. Jedoch ist bei 35,8 % (29 von 81 Patienten) der Patienten der Lymphknotenstatus in dieser Gruppe unbekannt, eine statistische Auswertung ist daher nicht aussagekräftig,

Ergebnisse

der ermittelte p-Wert lag bei 0,000. Eine Übersicht, der von uns betrachteten Merkmale und deren statistische Auswertung zeigt Tabelle 9.

	PUL (%)	M0 (%)	HEP (%)	Gesamt (%)	p
Geschlecht (gesamt):	81	81	81	243	
männlich	54 (66,7)	39 (48,1)	49 (60,5)	142 (58,4)	0,052
weiblich	27 (33,3)	42 (51,9)	32 (39,5)	101 (41,6)	
Alter (Median):	64,6	71,3	63,4	67,1	
≥ 65 Jahre	39 (48,1)	63 (77,8)	36 (44,4)	138 (56,8)	0,000
< 65 Jahre	42 (51,9)	18 (22,2)	45 (55,6)	105 (43,2)	
Lokalisation Primarius I:					
rechte Seite	9 (11,1)	9 (11,1)	9 (11,1)	27 (11,1)	x
linke Seite	72 (88,9)	72 (88,9)	72 (88,9)	216 (88,9)	
Lokalisation Primarius II:					
Kolon	24 (29,6)	50 (61,7)	31 (38,3)	106 (43,6)	0,001
rektosigmoidaler Übergang	7 (8,6)	7 (8,6)	10 (12,3)	24 (9,9)	
Rektum	49 (60,5)	24 (29,6)	39 (48,1)	111 (45,7)	
keine Angabe	1(1,2)	0 (0,0)	1 (1,2)	2 (0,8)	
T-Stadium UICC:					
T1	4 (4,9)	4 (4,9)	4 (4,9)	12 (4,9)	0,852
T2	6 (7,4)	7 (8,6)	11 (13,6)	24 (9,9)	
T3	61 (75,3)	60 (24,7)	56 (69,1)	177 (72,8)	
T4	10 (4,1)	10 (4,1)	9 (11,1)	29 (11,9)	
keine Angabe	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,4)	
Nodal-Status:					
N0 (=kein Lymphknotenbefall)	21 (25,9)	51 (63,0)	31 (38,8)	103 (42,4)	0,000
N1 (=Lymphknotenbefall)	31 (38,3)	28 (34,5)	49 (60,5)	108 (44,4)	
keine Angabe	29 (35,8)	2 (2,5)	1 (1,2)	32 (13,2)	
Metastasenstatus:					
M0 (=keine Metastase)	0 (0,0)	81 (100)	0 (0,0)	81 (33,3)	x
M1 (=Fernmetastase)	81 (100)	0 (0,0)	81 (100)	162 (66,7)	
Differenzierungsgrad WHO:					
G1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,970
G2	53 (65,4)	55 (67,9)	55 (67,9)	163 (67,1)	
G3	27 (33,3)	26 (32,1)	26 (32,1)	79 (32,5)	
G4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
keine Angabe	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,4)	
KISS-Status:					
KISS high	52 (64,2)	40 (49,4)	36 (44,4)	128 (52,7)	0,032
KISS low	29 (35,8)	41 (50,6)	45 (55,6)	115 (47,3)	
RAS-Status:					
keine Mutation	33 (40,7)	47 (58,0)	41 (50,6)	121 (49,8)	0,087
Mutation	48 (59,3)	34 (42,0)	40 (49,4)	122 (50,2)	
BRAF-Status:					
keine Mutation	77 (95,1)	77 (95,1)	80 (98,8)	234 (96,3)	0,354
Mutation	4 (4,9)	4 (4,9)	1 (1,2)	9 (3,7)	
MAP-Kinase-Status:					
keine Mutation	29 (35,8)	43 (53,1)	40 (49,4)	112 (46,1)	0,067
Mutation	52 (64,2)	38 (46,9)	41 (50,6)	131 (53,9)	

MLH1: positiv negativ	80 (98,8) 1 (1,2)	77 (95,1) 4 (4,9)	79 (97,5) 2 (2,5)	236 (97,1) 7 (2,9)	0,357
MLH2: positiv negativ	81 (100,0) 0 (0,0)	81 (100,0) 0 (0,0)	81 (100,0) 0 (0,0)	243 (100,0) 0 (0,0)	x
MMR-Status: pMMR dMMR	80 (98,8) 1 (1,2)	77 (95,1) 4 (4,9)	79 (97,5) 2 (2,5)	236 (97,1) 7 (2,9)	0,357
p53: reguliert dereguliert	28 (34,6) 53 (65,4)	28 (34,6) 53 (65,4)	24 (29,6) 57 (70,4)	80 (32,9) 163 (67,1)	0,742
beta-Katenin-2er Score: <30% >30%	40 (49,4) 41 (50,6)	46 (56,8) 35 (43,2)	49 (60,5) 32 (39,5)	135 (55,6) 108 (44,4)	0,350
CD133-Risikogruppe: <50% >50%	61 (75,3) 20 (24,7)	69 (85,2) 12 (14,8)	57 (70,4) 24 (29,6)	187 (77,0) 56 (23,0)	0,074

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht über die untersuchten Testgruppeneigenschaften und die genetischen Marker in Bezug auf die einzelnen Testgruppen und deren statistische Signifikanz

4.2 Auswertung des KISS1-Status

4.2.1 Ergebnisse der Auswertung der Immunhistochemie

Um Rückschlüsse auf mögliche Unterschiede zwischen der pulmonalen und hepatischen Metastasierung und dem Auftreten des Oberflächenmarkers KISS1 ziehen zu können, wurden von uns univariante statistische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden mit Hilfe von SPSS® zunächst Kreuztabellen erstellt und mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests statistisch signifikante Unterschiede berechnet. Im Anschluss wurden Überlebensanalysen erstellt, bei der das Überleben der Patienten bis zum Eintreten des Todes oder das Eintreten der Progression in den einzelnen Gruppen verglichen wurde. Die Darstellung erfolgte graphisch mit einer Kaplan-Meier-Kurve und der COX-Regression-Analyse.

4.2.2 Optische Darstellung der Auswertung der Immunhistochemie

Die optische Darstellung erfolgte mittels photographischer Mikroskopaufnahmen der verschiedenen Anfärbungsgrade.

4.2.2.1 Negative Farbreaktion

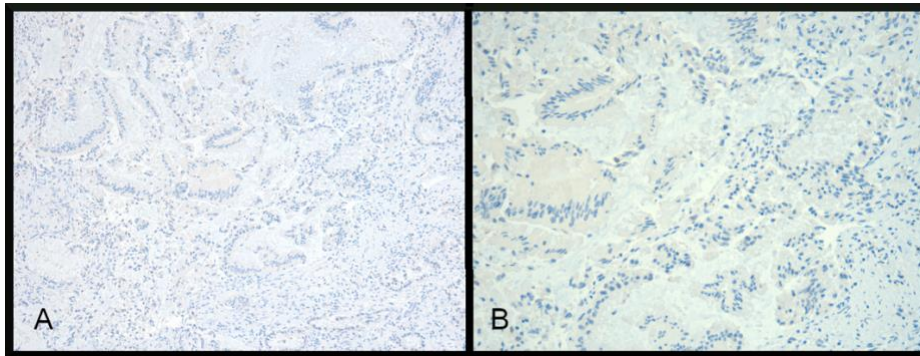


Abbildung 9: negative Färbereaktion; A: 100fache Vergrößerung; B: 200fache Vergrößerung

4.2.2.2 1fach positive Farbreaktion

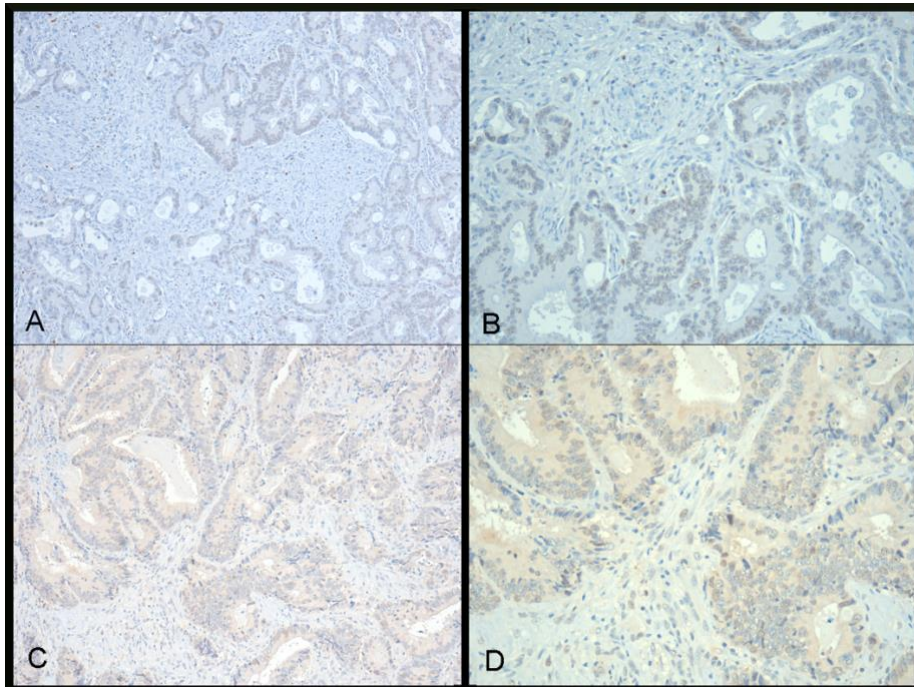


Abbildung 10: einfach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung

4.2.2.3 2fach positive Farbreaktion

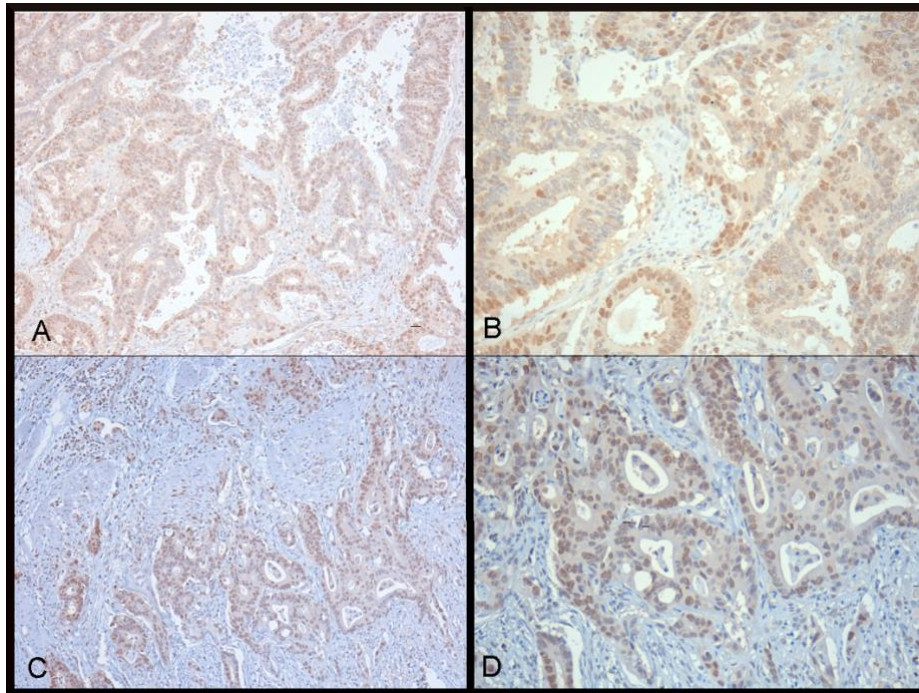


Abbildung 11: zweifach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung

4.2.2.4 3fach positive Farbreaktion

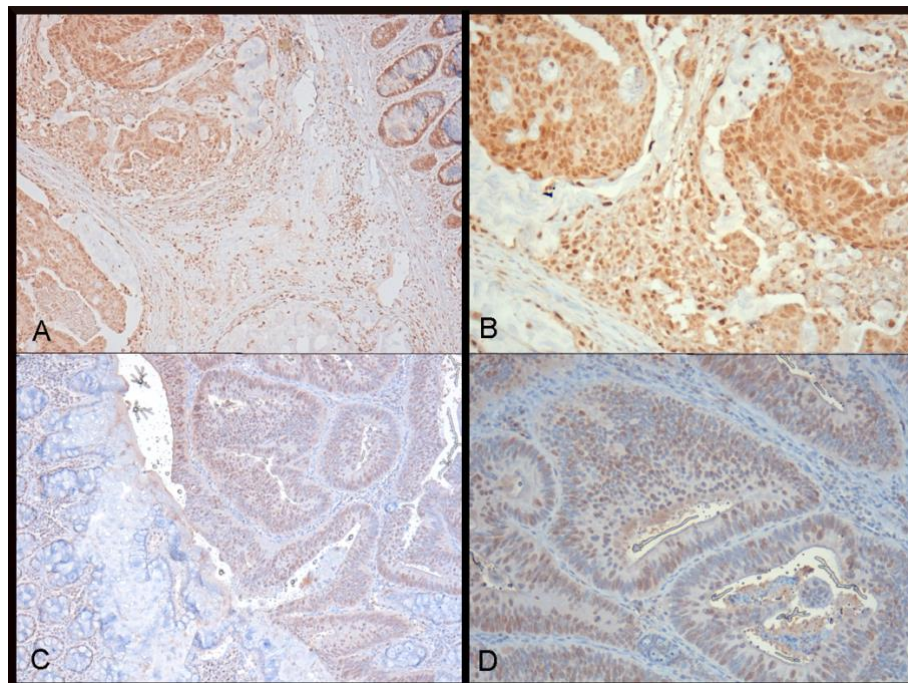


Abbildung 12: dreifach positive Färbereaktion; A: homogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; B: homogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung; C: inhomogene Färbereaktion 100fache Vergrößerung; D: inhomogene Färbereaktion 200fache Vergrößerung

4.2.3 Statistische Auswertung der KISS1-Expression der Testgruppen

4.2.3.1 KISS1-Status pulmonal, hepatisch und nicht metastasierter KRK

Bei der statistischen Auswertung der Expression von KISS1 und der Patientengruppe, die mindestens fünf Jahre nach dem erstmaligen Auftreten eines kolorektalen Karzinoms keine Metastasierung aufwies (M0) zeigte sich im Vergleich mit den anderen Patientengruppen folgendes Ergebnis: Bei der M0-Gruppe konnte bei 49,4 % (40 von 81 Patienten) der Patienten eine hohe KISS1-Expression festgestellt werden. 50,6 % (41 von 81 Patienten) wiesen eine niedrige Expression auf. In der Kontrollgruppe der hepatisch metastasierten Patienten (HEP) hatten 44,4 % (36 von 81 Patienten) eine hohe KISS1-Expression und 55,6 % (45 von 81 Patienten) eine niedrige Expression. In unserer Testgruppe der pulmonal metastasierten kolorektalen Karzinome (PUL) wiesen 64,2 % (52 von 81 Patienten) der Probanden eine starke Biomarkerexpression auf, dagegen nur 35,8 % (29 von 81 Patienten) einen niedrigen KISS1-Status. Insgesamt konnte bei allen untersuchten Personen in 52,7 % (128 von 243 Patienten) der Fälle eine starke KISS1-Expression festgestellt werden und bei 47,3 % (115 von 243 Patienten) eine niedrige KISS1-Expression. Der p-Wert lag bei 0,032, somit liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

Folglich konnte bei der statistischen Auswertung festgestellt werden, dass bei pulmonal metastasierten Tumoren eine deutliche höhere Expression von KISS1 vorliegt, als dies in Tumoren ohne Metastasenbildung oder beispielsweise hepatisch metastasierten Tumoren der Fall ist. Somit hat das Tumorsuppressorgen KISS1 keine protektive Wirkung bei der pulmonalen Metastasenbildung wie dies zum Beispiel bei hepatisch metastasierten Tumoren vermutet wird.

4.2.3.2 Statistischer Vergleich des KISS1-Status metastasierter und nicht metastasierter Tumoren

Vergleicht man allgemein die Testpatienten, bei denen eine Metastase festgestellt werden konnte (M1-Status), mit der Testgruppe, die keine Metastase aufwies ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Bildung von Metastasen und einer erhöhten Expression von KISS1 feststellbar. Bei 36,2 % (88 von 243 Patienten) mit M1-Status konnte eine verstärkte Expression von KISS1 nachgewiesen werden, wohingegen bei 30,5 % (74 von 243 Patienten)

der Probanden keine verstärkte KISS1-Expression vorhanden war. Der p-Wert lag bei 0,467.

	M0 (%)	M1 (%)	p	Risiko	95%-Konfidenzintervall untere Grenze; obere Grenze
KISS low	41(16,9)	74(30,5)			
KISS high	40 (16,5)	88 (36,2)	0,467	1,219	0,715; 2,079

Tabelle 10: KISS1-Status in Bezug auf metastasierte und metastasenfrie Tumoren

4.2.3.3 Statistischer Vergleich nicht metastasierter und hepatisch metastasierter KRK

Es konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der M0-Gruppe mit der Patientengruppe, bei denen eine hepatische Metastasierung (HEP-Gruppe) diagnostiziert werden konnte. Der p-Wert lag hier bei 0,529.

	M0 (%)	HEP (%)	p	Risiko	95%-Konfidenzintervall untere Grenze; obere Grenze
KISS low	41 (25,3)	45 (27,8)			
KISS high	40 (24,7)	36 (22,2)	0,529	0,820	0,422; 1,521

Tabelle 11: KISS1-Status in Bezug auf die metastasenfrie und die hepatisch metastasierte Patientengruppe

4.2.3.4 Statistischer Vergleich nicht metastasierter und pulmonal metastasierter KRK

Auch der Vergleich der M0-Gruppe mit der Testgruppe, die mindestens eine solitäre Lungenmetastase hatten (PUL-Gruppe) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Der p-Wert lag hier bei 0,057.

	M0 (%)	PUL (%)	p	Risiko	95%-Konfidenzintervall untere Grenze; obere Grenze
KISS low	41 (25,3)	29 (17,9)			
KISS high	40 (24,7)	52 (32,1)	0,057	1,838	0,980; 3,449

Tabelle 12: KISS1-Status in Bezug auf die metastasenfrie und pulmonal metastasierte Patientengruppe

4.2.3.5 Statistischer Vergleich pulmonal metastasierter und hepatisch metastasierter KRK

Beim Vergleich der Testgruppe, die mindestens eine solitäre Lungenmetastase aufwies mit der hepatisch metastasierten Patientengruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied. Der p-Wert lag bei 0,012.

	PUL (%)	HEP (%)	<i>p</i>	Risiko	95%-Konfidenzintervall untere Grenze; obere Grenze
KISS low	29 (17,9)	45 (27,8)			
KISS high	52 (32,1)	36 (22,2)	0,012	0,446	0,237; 0,839

Tabelle 13: KISS1-Status in Bezug auf die pulmonal und hepatisch metastasierte Patientengruppe

Folglich konnte bei der statistischen Auswertung festgestellt werden, dass bei pulmonal metastasierten Tumoren eine deutliche höhere Expression von KISS1 vorliegt, als dies in Tumoren ohne Metastasenbildung oder beispielsweise hepatische metastasierten Tumoren der Fall ist.

4.2.4 Korrelation des KISS1-Status mit weiteren Merkmalen

4.2.4.1 Geschlechterverteilung

Bei der Expression des Oberflächenmarkers KISS1 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Geschlechterverteilung festgestellt werden. So konnte bei 49,3 % (70 von 142) der männlichen Patienten und bei 57,4 % (58 von 101) der weiblichen Patienten eine erhöhte KISS1-Expression festgestellt werden. Der p-Wert lag in diesem Fall bei 0,211.

4.2.4.2 Lokalisation des Primarius

In einem weiteren Schritt bei der statistischen Auswertung wurde der Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von KISS1 und der Lage des Primärtumors untersucht. Vergleicht man zunächst die rechtsseitige und linksseitige Primärtumoralage, wiesen 55,6 % (15 von 27) der Patienten mit einem Primarius auf der rechten Seite eine hohe KISS1-Expression auf und 52,3 % (113 von 216) der Patienten mit einem linksseitig erstmals aufgetretenem kolorektalen Karzinom. Der p-Wert lag hier bei 0,750 und somit liegt keine statistische Signifikanz vor. Bei der genaueren Betrachtung der Lokalisation im Kolon, Rektum oder im rektosigmoidalen Übergang hatten 50 von 106 (47,2 %) der Patienten mit Primarius im Kolon, 67 von 115 (58,3 %) der untersuchten

Personen mit einem Primarius im Rektum und 50,0 % (11 von 22) der Patienten mit Primariuslage im rektosigmoidalen Übergang eine erhöhte KISS1-Expression. Der p-Wert lag hier bei 0,248 und somit liegt auch hier keine statistische Signifikanz vor.

4.2.4.3 T-Stadium bei Erstdiagnose

In einer weiteren statistischen Testung wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium bei Erstdiagnose und der KISS1-Expression besteht. Hierbei zeigte sich, dass 75,0 % (9 von 12) der Patienten mit dem Stadium T1, 58,3 % (14 von 24) der Patienten mit dem Stadium T2, 50,3 % (89 von 177) der Patienten mit dem Stadium T3 und 51,7 % (15 von 29) der Patienten mit dem Stadium T4 eine erhöhte Expression von KISS1 aufwiesen. Bei einem Patienten war das T-Stadium nicht bekannt und es liegt hier eine niedrige Expression von KISS1 vor. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist nicht feststellbar, der p-Wert liegt bei 0,403.

4.2.4.4 Lymphknotenstatus

Die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen KISS1-Status und Auftreten von Lymphknotenmetastasen zeigte folgendes Ergebnis: Die Verteilung zeigte sich bei den Patienten mit Lymphknotenmetastase annähernd genau gleich: 42,2 % (54 von 128) der Patienten hatten einen hohen KISS1-Status, 47,0 % (54 von 115) der Patienten einen niedrigen KISS1-Status. Bei den Patienten ohne Lymphknotenbefall hatten 39,1 % (50 von 128) einen hohen KISS-Status und 43,5 % (50 von 115) einen niedrigen KISS1-Status. Bei den Probanden ohne Angabe zum Status des Lymphknotenbefalls zeigten 18,8 % (24 von 128) einen hohen KISS1-Status, bei 7,0 % (8 von 115) der Patienten zeigt sich ein niedriger KISS1-Status. Der p-Wert liegt hier bei 0,025 und zeigt eine statistische Signifikanz. Aufgrund der jedoch hohen Anzahl an Probanden ohne Angabe des Lymphknotenbefalls ist hier ein statistischer Zusammenhang nicht beurteilbar.

4.2.4.5 Differenzierungsgrad und KISS1-Expression

Vergleicht man weiterhin die KISS1-Expression mit weiteren von uns definierten Merkmalen, kann festgestellt werden, dass vor allem Tumoren mit einem Differenzierungsgrad von G3 zu einer höheren KISS1-Expression neigen, als Tumoren mit dem Differenzierungsgrad G2. Von den 79 Patienten mit Differenzierungsgrad G3, die untersucht wurden, zeigten 60,8 % (48 von 79) der Patienten einen erhöhten KISS1-Status, 39,2 % (31 von 79) der Patienten einen

niedrigen KISS1-Status. Bei Tumoren, die einen Differenzierungsgrad G2 aufweisen ist die Verteilung hingegen weitestgehend gleich. Von 163 Patienten mit Differenzierungsgrad G2 zeigen 49,1 % (80 von 163) der Patienten eine hohe Expression von KISS1, 50,9 % (83 von 163) der Patienten eine niedrige KISS1-Expression. Zu einem Patienten lagen uns keine Daten vor. Eine statistische Signifikanz liegt beim Vergleich dieser Merkmale allerdings nicht vor, der p-Wert liegt bei 0,133. Die Differenzierungsgrade G1 und G4 wurden in dieser Arbeit nicht mituntersucht, da die Auswahlkriterien eindeutig auf Patienten mit einem Differenzierungsgrad G2 und G3 festgelegt wurden, um eine möglichst hohe Homogenität der Gruppen zu erreichen.

4.2.5 Vergleich des KISS1-Status mit anderen Oberflächenmarkern

Die Daten zu den anderen Oberflächenmarkern lagen aus bereits vorhergegangenen Studien in unserem Institut vor. Es wurden Daten zum RAF-Status, zum BRAF-Status, zum MAP-Kinase-Status, MLH1- und MLH2-Status, zum MMR-Status, dem p53-Status, dem Beta-Katenin-2er-Score und dem CD133-Risiko zur Verfügung gestellt. Es konnte in der statistischen Auswertung gezeigt werden, dass bei der Mehrzahl der Patienten, die einen mutierten RAS-Status aufwiesen, es auch zu einer verstärkten Expression von KISS1 kommt. So zeigten 58,2 % (71 von 122) der Patienten mit einem mutierten RAS-Status gleichzeitig eine hohe KISS1-Expression. Bei den Patienten mit Wildtyp zeigten nur 47,1 % (57 von 121) der Patienten einen hohen KISS1-Status. Das Signifikanzniveau lag hier bei 0,083, somit liegt keine eindeutige statistische Signifikanz vor, jedoch eine deutliche Neigung. Eine ähnliche Neigung zeigt sich bei der Bewertung des Beta-Katenin-Risiko-Scores. Es konnte festgestellt werden, dass bei den 108 Patienten, die ein Beta-Katenin-Risiko von mehr als 30 % besaßen, 59,3 % (64 von 108) der Patienten gleichzeitig auch einen erhöhten KISS1-Status aufwiesen. 40,7 % (44 von 108) der untersuchten Probanden hatten einen niedrigen KISS1-Status. Bei den Patienten mit einem Beta-Katenin-Risiko-Score von < 30 % zeigten 47,4 % (64 von 135) einen erhöhten KISS1-Status und 52,6 % (71 von 135) einen niedrigen KISS1-Status. Der p-Wert lag hier bei 0,066. Auch hier liegt keine statistische Signifikanz vor, jedoch wie beim RAS-Status eine deutliche Tendenz.

Betrachtet man den MAP-Kinase-Status, konnte gezeigt werden, dass von 131 Patienten, die einen mutierten MAP-Kinase-Status aufwiesen, 58,8 % (77 von

Ergebnisse

131) der Patienten auch gleichzeitig einen hohen KISS1-Status aufwiesen. 41,2 % (54 von 131) hatten einen niedrigen KISS1-Status. Bei den Probanden mit Wildtyp-MAP-Kinase-Status zeigten 45,5 % (51 von 112) eine verstärkte KISS1-Expression und 54,5 % (61 von 112) einen niedrigen KISS1-Status. Das Signifikanzniveau lag hier bei 0,039. Somit liegt hier eine statistische Signifikanz vor. Bei der statistischen Auswertung der Korrelation der übrigen Oberflächenmarker konnte eindeutig keine statistische Signifikanz für ein gehäuft gemeinsames Auftreten nachgewiesen werden. Die nachfolgende Tabelle 13 zeigt eine Übersicht über unsere statistische Auswertung.

Untersuchtes Merkmal (Anzahl der Probanden = 100%)	KISS high (%)	% in Bezug auf Gesamtheit (243 Fälle)	KISS low (%)	% in Bezug auf Gesamtheit (243 Fälle)	p	Risiko	95%- Konfidenz- intervall untere Grenze; obere Grenze
Geschlecht: Männlich (142) Weiblich (101)	70 (49,3) 58 (57,4)	28,8 23,9	72 (50,7) 43 (42,6)	29,6 17,7	0,211	1,387	0,830; 2,319
Alter (Median): ≥ 65 Jahre (139) < 65 Jahre (104)	73 (52,5) 55 (52,9)	30,0 22,6	66 (47,5) 49 (47,1)	27,2 20,2	0,955	0,985	0,592; 1,639
Lokalisation Primarius I: Rechte Seite (27) Linke Seite (216)	15 (55,6) 113(52,3)	6,2 46,5	12 (44,4) 103(47,7)	4,9 42,4	0,750	0,878	0,393; 1,962
Lokalisation Primarius II: Kolon (106) rektosigmoidaler Übergang (22) Rektum (115)	50 (47,2) 11 (50,0) 67 (58,3)	20,6 4,5 27,6	56 (52,8) 11 (50,0) 48 (41,7)	23,0 4,5 19,6	0,248	a	x
T-Stadium UICC: T1 (12) T2 (24) T3 (177) T4 (29) keine Angabe (1)	9 (75,0) 14 (58,3) 89 (50,3) 15 (51,7) 1 (100,0)	3,7 5,8 36,6 6,2 0,4	3 (25,0) 10 (41,7) 88 (49,7) 14 (48,3) 0 (0,0)	1,2 4,1 36,2 5,8 0,0	0,403	a	x
Differenzierungsgrad WHO: G1 (0) G2 (163) G3 (79) G4 (0) Keine Angabe (1)	0 (0,0) 80 (49,1) 48 (60,8) 0 (0,0) 0 (0,0)	0,0 32,9 19,8 0,0 0,0	0 (0,0) 83 (50,9) 31 (39,2) 0 (0,0) 1 (100,0)	0,0 34,2 12,8 0,0 0,4	0,133	a	x
N-Status: N0 (keine Lymphknotenmetastase) (103) N1 (Lymphknotenmetastase) (108) Keine Angabe (32)	50 (48,5) 54 (50,0) 24 (75,0)	20,6 22,2 9,9	53 (51,5) 54 (50,0) 8 (25,0)	21,8 22,2 3,3	0,025	a	x

M-Status: M0 (keine Metastase)(81) M1 (Fernmetastase) (162)	40 (49,4) 88 (54,3)	16,5 36,2	41(50,6) 74(45,7)	16,9 30,5	0,467	1,219	0,715; 2,079
RAS-Status: Wildtyp (121) Mutiert (122)	57 (47,1) 71 (58,2)	23,5 29,2	64 (52,9) 51 (41,8)	26,3 21,0	0,083	1,563	0,942; 2,595
BRAF-Status: Wildtyp (234) Mutiert (9)	122(52,1) 6 (66,7)	50,2 2,5	112 (47,9) 3 (33,3)	46,1 12,2	0,392	1,836	0,449; 7,516
MAP-Kinase-Status: Wildtyp (112) Mutiert (131)	51 (45,5) 77 (58,8)	21,0 31,7	61 (54,5) 54 (41,2)	25,1 22,2	0,039	1,706	1,025; 2,838
MLH1: Positiv (236) Negativ (7)	123(52,1) 5 (71,4)	50,6 2,1	113 (47,9) 2 (28,6)	46,5 0,8	0,313	2,297	0,437; 12,047
MLH2: Positiv (243) Negativ (0)	128(52,7) 0 (0,0)	52,7 0,0	115 (47,3) 0 (0,0)	47,3 0,0	x	a	x
MMR-Status: pMMR (236) dMMR (7)	123(52,1) 5 (71,4)	50,6 2,1	113 (47,9) 2 (28,6)	46,5 0,8	0,313	2,297	0,437; 12,074
p53: reguliert (80) dereguliert (163)	46 (57,5) 82 (50,3)	18,9 33,8	34 (42,5) 81 (49,7)	14,0 33,3	0,291	0,748	0,436; 1,283
Beta-Katenin-Risiko: < 30% (135) > 30% (108)	64 (47,4) 64 (59,3)	26,3 26,3	71 (52,6) 44 (40,7)	29,2 18,1	0,066	1,614	0,968; 2,691
CD133: < 50% (187) > 50% (56)	99 (52,9) 29 (51,8)	40,8 11,9	88 (47,1) 27 (48,2)	36,2 11,1	0,879	0,955	0,525; 1,736

Tabelle 14: KISS1-Status in Bezug auf die untersuchten Testgruppeneigenschaften und die untersuchten genetischen Marker, sowie die statistische Signifikanz

4.3 Überlebenszeit und Fortschreiten der Erkrankung

Im Rahmen einer weiteren statistischen Auswertung wurde bei den einzelnen Gruppen mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve die Gesamtüberlebenszeit bis zum Tod (Overall-Survival = OAS) und die Zeit bis zum Eintreten der ersten Progression (Progression-free-Survival = PFS) beurteilt. Es wurden dabei der OAS und der PFS bei den Patienten die KISS1 stark exprimierten mit denen die eine schwache KISS1-Expression aufwiesen verglichen.

4.3.1 Keine Metastasierung (M0)

In dieser Testgruppe wurden Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Metastase aufwiesen (synchrone Metastasierung) und innerhalb eines Zeitraums von 5 Jahren keine pulmonale, hepatische oder

andere Metastasierung nachgewiesen werden konnte. In dieser Testgruppe verstarben innerhalb des zwölfjährigen Beobachtungszeitraums von 81 untersuchten Personen 32 (39,5%). Hiervon wiesen 14 Personen eine hohe KISS1-Expression auf, 18 Patienten eine niedrige Expression. Das Signifikanzniveau betrug hierbei 0,564, somit ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen bei der Überlebenszeit von Patienten die KISS1 stark exprimieren und Patienten mit einer schwachen KISS1-Expression.

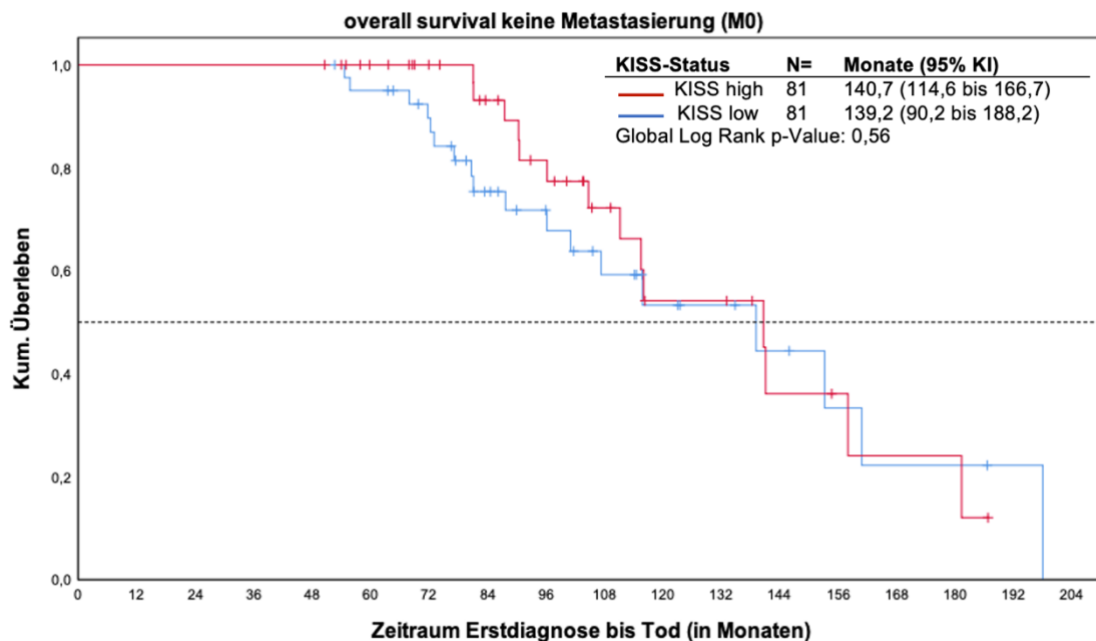


Abbildung 13: Gesamtüberleben in der metastasenfreien Testgruppe

Die Beurteilung des Zeitraums bis zum ersten Fortschreiten der Erkrankung entfällt, da in diese Untersuchungsgruppe nur Patienten aufgenommen wurden, die im untersuchten Zeitraum keine synchrone und metachrone Metastasierung aufwiesen.

4.3.2 Hepatische Metastasierung

In dieser Patientengruppe konnte festgestellt werden, dass in unserem Beobachtungszeitraum von 1998 bis 2018 von 81 Patienten 56 (69,1 %) Patienten verstarben (OAS). Von diesen 56 Patienten wiesen 26 eine starke Expression des Oberflächenmarkers auf, 30 eine schwache KISS1-Expression. Die statistische Signifikanz lag bei 0,83 und somit liegt bei dieser Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied vor.

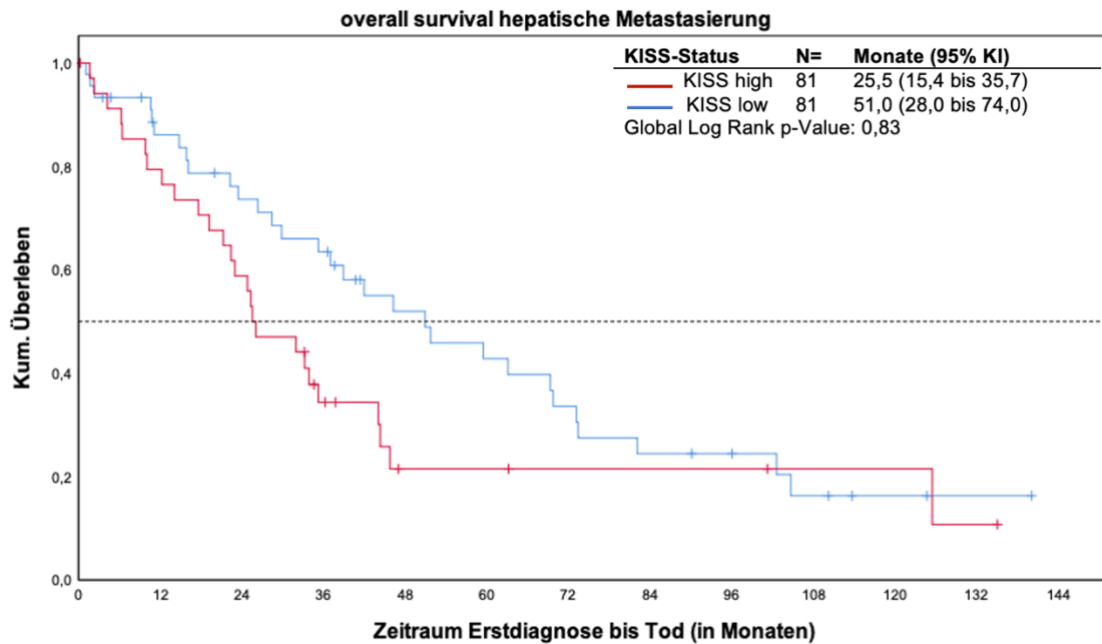


Abbildung 14: Gesamtüberleben in der hepatisch metastasierten Testgruppe

Bei der Bewertung des Zeitraums bis zum Eintritt der ersten Progression (PFS) zeigten von 81 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums 76 (93,8 %) eine Progression. Von 76 Patienten hatten 32 eine hohe KISS1-Expression und 44 eine schwache KISS1-Expression. Das Signifikanzniveau lag hierbei bei 0,69 und gilt somit als nicht statistisch signifikant.

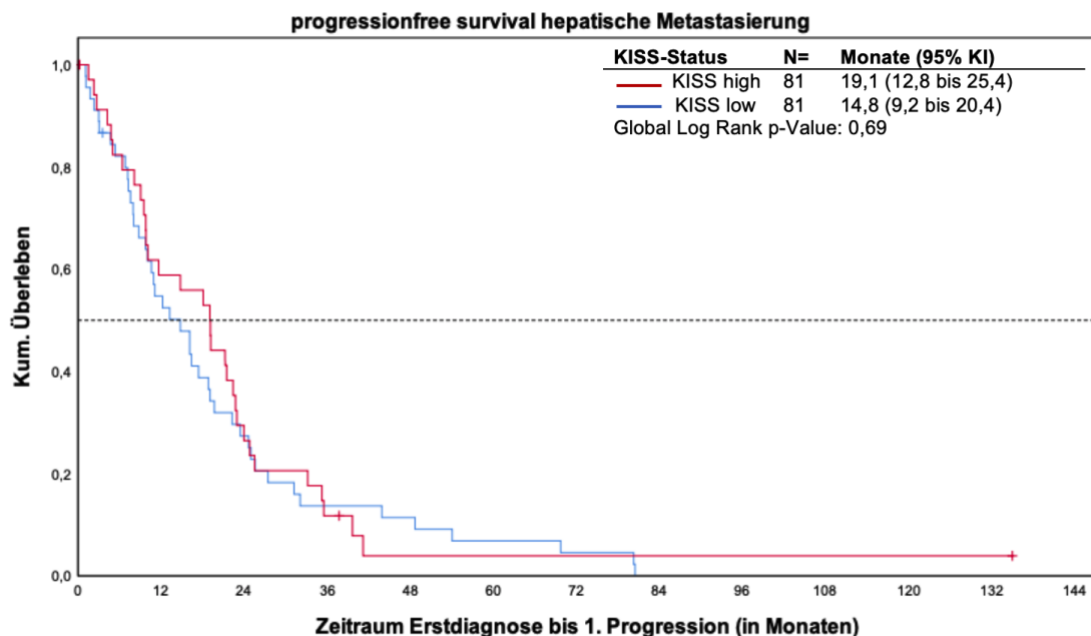


Abbildung 15: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in der hepatisch metastasieren Testgruppe

4.3.3 Pulmonale Metastasierung

In der pulmonal metastasierten Patientengruppe verstarben innerhalb unseres Beobachtungszeitraumes von 81 Tumorpatienten 53 (65,4 %). Bei der Berechnung des OAS wiesen 33 der verstorbenen Patienten eine hohe Expression des Oberflächenmarkers KISS1 auf, nur 20 von Ihnen zeigten eine niedrige Expression. Die statistische Signifikanz lag bei 0,64.

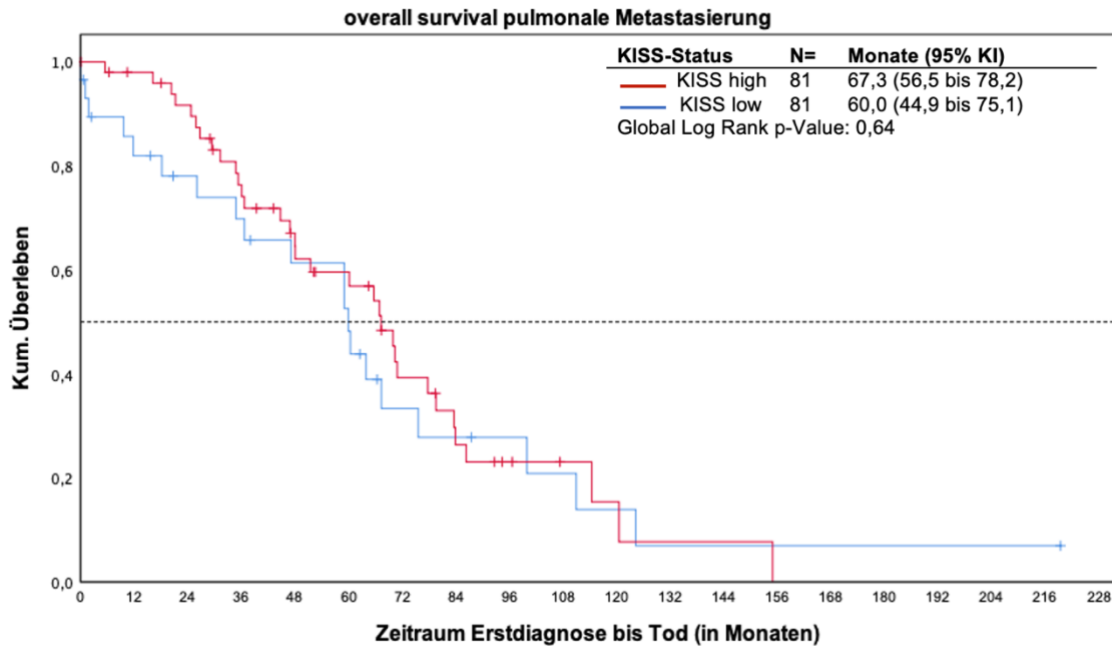


Abbildung 16: Gesamtüberleben in der pulmonal metastasierten Testgruppe

Bei der Betrachtung des PFS konnte festgestellt werden, dass es bei 76 (93,8 %) von 81 Probanden innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einer Progression kam. Von diesen 76 Patienten wiesen 49 Patienten eine hohe KISS1-Expression auf. 27 eine geringe Expression. Hier lag die statistische Signifikanz bei 0,495.

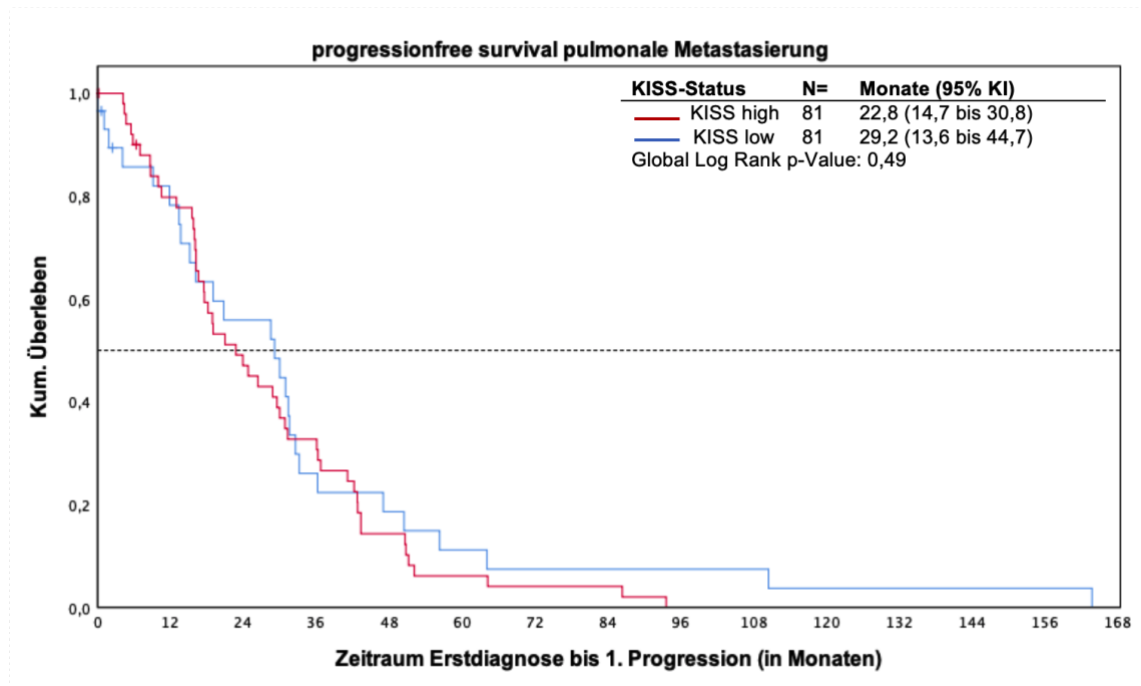


Abbildung 17: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in der pulmonal metastasierten Gruppe

4.3.4 Pulmonale vs. hepatische Metastasierung

Vergleicht man die Patientengruppe mit pulmonaler und hepatischer Metastasierung, so kann festgestellt werden, dass innerhalb des Beobachtungszeitraums 53 Patienten mit einer pulmonalen Metastase verstarben und 56 Patienten mit einer hepatischen Metastase verstarben (OAS).

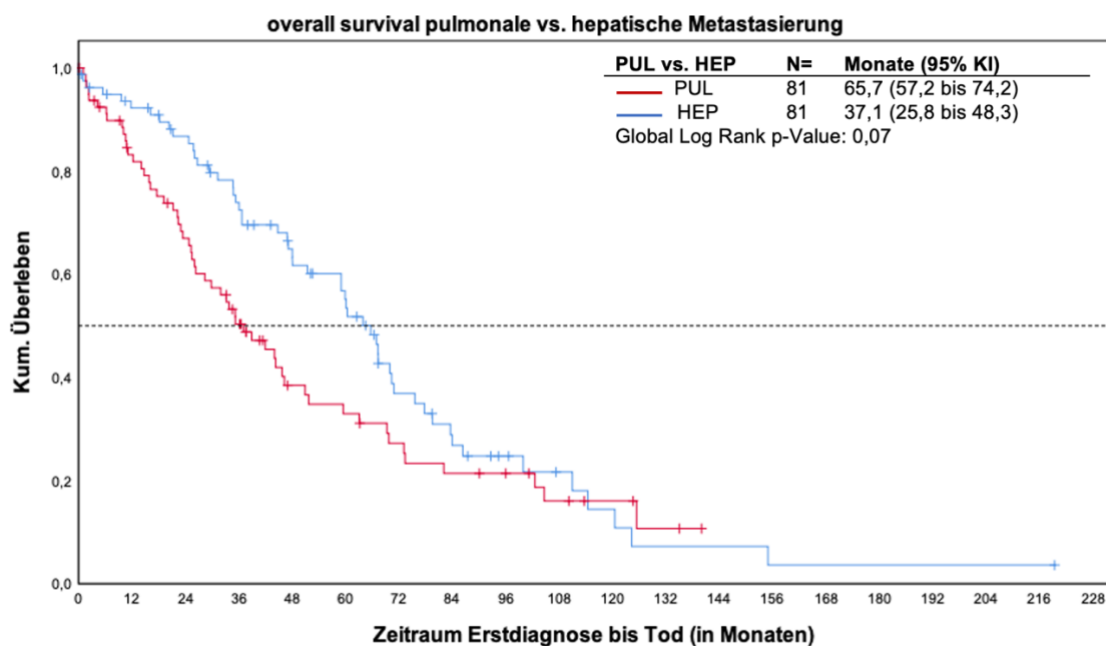


Abbildung 18: Vergleich des Gesamtüberlebens der pulmonal metastasierten Testgruppe mit der hepatisch metastasierten Testgruppe

Bei der Bewertung des Zeitraums bis zur ersten Progression kam es bei beiden Gruppen bei 76 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einer Progression.

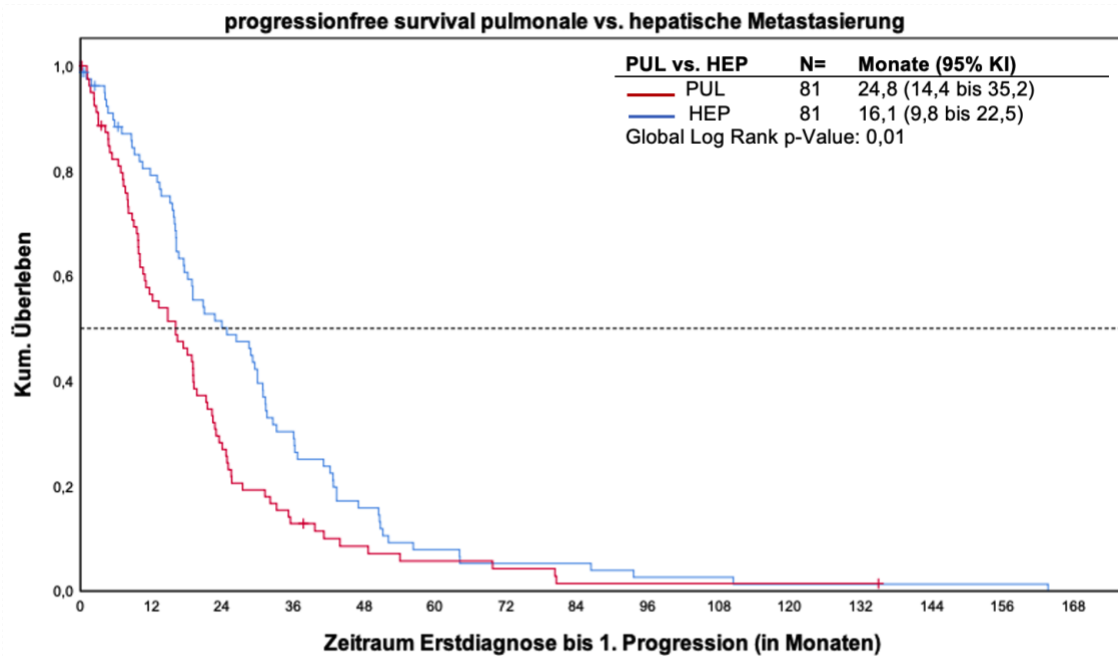


Abbildung 19: Vergleich des Zeitraums bis zum Auftreten eines Rezidivs bei der pulmonal metastasierten Testgruppe mit der hepatisch metastasierten Testgruppe

5 Diskussion

Unserer Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass eine verstärkte Expression Biomarkers KISS1 auf den kolorektalen Tumorzellen mit einer bevorzugten pulmonalen Metastasierung einhergeht. Die Kenntnis über die Anzahl und Art von bestimmten Biomarkern auf den Tumorzellen ließen zukünftig möglicherweise Rückschlüsse auf eine mögliche pulmonale Metastasierung bereits in frühen Tumorstadien zu. Dies hätte weitere Auswirkungen auf die Therapieplanung.

5.1 Expression von KISS1 und Metastasenbildung/ Lymphknoteninfiltration beim KRK und anderen malignen Tumoren

5.1.1 Bildung von Fernmetastasen beim KRK und anderen Malignomen

Das Protein KISS1 und die daraus gebildeten Kisspeptine -10, -13, -14 und -54 (Metastin) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Zellen und der Neigung maligner Tumoren zur Metastasierung (70). Im Gegensatz zu vielen Studienergebnissen, wo das Tumorsuppressorgen KISS1 in metastasierten Tumorstadien vermindert exprimiert wird, zeigten unsere Ergebnisse beim pulmonal metastasierten KRK eine signifikant höhere Expression von KISS1 als in den Vergleichsgruppen. 64,2 % der Patientengruppe mit Lungenmetastasen zeigten einen hohen KISS1-Status. In der von uns untersuchten Patientengruppe mit hepatischer Metastasierung zeigte sich dieser Zusammenhang nicht. Bei dieser Gruppe zeigten nur 44,4 % der Patienten eine erhöhte KISS1-Expression. Vergleicht man diese beiden Gruppen untereinander so zeigt sich ein hoher statistisch signifikanter Unterschied zwischen pulmonal metastasierten und hepatisch metastasierten Patienten ($p=0,012$). In der Kontrollgruppe, die keine Metastase im vorgegebenen Zeitraum bildeten, zeigten 49,4 % der Patienten eine starke Expression. Auch beim Vergleich der Kontrollgruppe ohne Metastasierung mit der pulmonal metastasierten Gruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied. Die pulmonal metastasierte Gruppe zeigte eine deutlich höhere Expression von KISS1 ($p=0,057$). Beim Vergleich der hepatisch metastasierten

Gruppe mit der Kontrollgruppe M0 konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden ($p=0,529$). Vergleicht man unsere Ergebnisse mit anderen Studien, so konnte in einer Untersuchung von Matthaiou et al. (2018) eine ähnlich hohe Expression von KISS1 bei metastasierten Darmtumoren festgestellt werden. Es wurde die Expression von KISS1 und KISS1-Rezeptor beim primären und beim metastasierten KRK untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei 68,4 % der primären kolorektalen Karzinome eine starke KISS1-Expression 31,6 % zeigten eine niedrige Expression. Eine hohe KISS1-Expression zeigte sich vor allem in den höheren Tumorstadien wie den Stadien III und IV. Bei den metastasierten KRK zeigten 52,9 % einen erhöhten KISS-Status, allerdings waren unter den 66 Testpatienten lediglich acht Patienten, die neben dem Primarius eine Lebermetastase aufwiesen, 9 Patienten zeigten nur eine Lebermetastase. Somit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen primären und metastasierten KRK und der Expression von KISS1 gefunden werden. Bei der Betrachtung des KISS1-Rezeptors zeigten 38,6 % der Patienten mit primären KRK eine erhöhte KISS1-Rezeptordichte. Bei der Patientengruppe mit metastasiertem KRK konnte bei 66,7 % eine erhöhte Rezeptordichte festgestellt werden (70). In anderen einer Studie zum Mammakarzinom von Martin, Watkins und Jiang (2005) wurde eine stark erhöhte KISS1-Expression vor allem in Mammakarzinomen, die durch ein aggressives Wachstumsmuster und einer hohen Mortalität gekennzeichnet waren, beschrieben. Anders verhielt sich hier die Rezeptordichte von KISS1. Diese war bei den aggressiveren Tumoren erniedrigt. Zudem konnte eine statistisch signifikant höhere KISS1 Expression bei bereits vorliegendem Lymphknotenbefall nachgewiesen werden (71). In einer weiteren Untersuchung von Marot et al. (2007), ebenfalls zum Mammakarzinom, zeigte sich, dass eine hohe Expression von KISS1 und GPR54 mit einer schlechten Prognose bei östrogenrezeptorpositiven Brustkrebsarten korreliert (72). Auch beim hepatozellulären Karzinom stellt KISS1 einen wichtigen Prognosefaktor dar. Eine Studie von Schmid et al. 2007 stellte fest, dass eine hohe KISS1-Expression mit einem schlechteren, klinischen Outcome einhergeht. Eine hohe Expression des Rezeptors AXOR 12 (GPR 54) bei Erstdiagnose geht mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer niedrigeren Graduierung einher (73). Ein Zusammenhang bei der Bildung von Lungen- und Lebermetastasen und der gleichzeitigen Expression von KISS1 konnte weiterhin auch bei anderen

malignen Tumoren festgestellt werden. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen wurde in etlichen weiteren Studien jedoch in hohen und metastasierten Tumorstadien eher ein niedriger KISS1-Status festgestellt. Dies zeigte sich beispielsweise in einer Untersuchung von McNally et al. (2010). Es wurde die Rolle von KISS1 bei der pulmonalen und hepatischen Metastasierung des Pankreaskarzinoms am Mausmodell untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe eines Reportergens (Luziferase) unter anderem ein markiertes KISS1-Gen (FLAG-tagged KISS1; KFM) in Tumorzellen eingebracht und anschließend wurde das Tumor- und Metastasenwachstum beobachtet. In der nachfolgenden Auswertung mittels Immunhistochemie zeigte sich, dass Mäuse mit KISS1-exprimierenden Tumoren signifikant weniger Lungen- und Lebermetastasen bildeten. Beim Vergleich der KISS1-Testgruppe mit der KFM Δ SS-Testgruppen (Testgruppe mit entfernter Sekretionssignalsequenz), wurden in der KISS1-Testgruppe signifikant weniger Lungen- und Lebermetastasen nachgewiesen (74). In einer Studie von Zheng et. al wurde festgestellt, dass niedrigere TNM-Stadien beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) eine hohe Expression von KISS1-mRNA aufwiesen, wohingegen in höheren Stadien (UICC Stadien III/IV) eine deutlich niedrigere Expression vorhanden war (22). Eine weitere Studie, ebenfalls zum NSCLC wurde 2013 von Sun und Xu durchgeführt. Auch hier zeigten höhere, metastasierte Tumorstadien eine deutlich geringere KISS1-Peptin und KISS1-Rezeptorexpression als niedrigere Tumorstadien (75). Zeitgleich stellten Okugawa et. al (2013) fest, dass eine verminderte Expression des Kisspeptins mit einem verstärkten Auftreten von Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom verbunden war. Zudem wiesen die Patienten mit einer verminderten KISS1-Expression auch eine deutlich schlechtere Überlebensprognose auf als Tumorpatienten mit normalen Kisspeptin-Status ($p=0,045$) (60). Auch hier zeigte unsere Studie ein anderes Ergebnis. Betrachtet man den KISS1-Status bei Patienten, die neben einer Lungenmetastase auch Lymphknotenmetastasen aufweisen, so konnte festgestellt werden, dass bei 52 (64,2 %) von 81 Patienten eine verstärkte Expression von KISS1 vorhanden war. Bei den übrigen Patienten dieser Testgruppe war der KISS1-Status niedriger bzw. unbekannt. Patienten, die mindestens eine Lebermetastase und zusätzlich Lymphknotenmetastasen aufwiesen, zeigten nur 24 von 81 einen erhöhten KISS1-Status. Betrachtet man alle von uns untersuchten Patienten, so konnte

bei 54 Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein erhöhter KISS1-Status erhoben werden.

5.1.2 Bildung von Lymphknotenmetastasen beim KRK

Bei der Beurteilung der Lymphknoteninfiltration beim KRK spielt die Expression von KISS1 ebenfalls eine Rolle. Betrachtet man den KISS1-Status bei Patienten, die neben einer Lungenmetastase auch Lymphknotenmetastasen aufweisen, so konnte festgestellt werden, dass bei 52 (64,2 %) von 81 Patienten eine verstärkte Expression von KISS1 vorhanden war. Bei den übrigen Patienten dieser Testgruppe war der KISS1-Status niedriger bzw. unbekannt. Patienten, die mindestens eine Lebermetastase und zusätzlich Lymphknotenmetastasen aufwiesen, zeigten nur 24 von 81 einen erhöhten KISS1-Status. Betrachtet man alle von uns untersuchten Patienten, so konnte bei 54 Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein erhöhter KISS1-Status nachgewiesen werden. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit anderen Studien, so zeigte sich in der Untersuchung von Matthaïou et al. (2018) bei 81,1% der Patienten mit Lymphknotenmetastasen ein erhöhter KISS1-Status (70). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und den Ergebnissen von Matthaïou stellten Okugawa et al. (2013) fest, dass eine verminderte Expression des Kisspeptins mit einem verstärkten Auftreten von Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom verbunden ist (60).

5.2 Einfluss von KISS1 auf Tumorwachstum und Malignität

In Zahlreichen Studien wurden die Einflüsse von KISS1 auf die Metastasierung verschiedener Tumoren untersucht. Jedoch spielt KISS1 auch bereits in früheren Tumorstadien beim Tumorwachstum und der malignen Progression, der Tumorangiogenese, Autophagie und Apoptose eine wichtige Rolle. Kostakis et al. konnten 2015 zeigen, dass die Expression von KISS1 in gesunder Darmmukosa deutlich höher liegt als in maligne entarteter Schleimhaut (76). In unserer Untersuchung war prägnant, dass besonders die pulmonal metastasierten kolorektalen Karzinome eine sehr hohe Expression von KISS1 aufwiesen, obwohl es sich bei KISS1 um ein Tumorsuppressor-Gen handelt. Die hepatisch metastasierten KRK hingegen zeigten dieses Phänomen nicht. Zum Vergleich wird zeigt eine Untersuchung von Kostakis et al. (2015), dass

besonders in höheren Tumorstadien (III und IV) von möglichst weit distal gelegenen Tumoren eine verstärkte KISS1-Expression zu finden war. Zeitgleich lag zudem ein vermehrter Lymphknotenbefall vor (76). Bei den von uns ausgewählten Studienpatienten wurden vorzugsweise Patienten mit dem Tumorstadium II und III ausgesucht. Dies diente dazu, um eine möglichst homogene Patientengruppe zusammenzustellen. Analog zu den von Kostakis (2015) In einer Studie von Cho et al. (2011) wurde die Rolle des KISS1-Gens bei Vorliegen einer haploinsuffizienten Form am Mausmodell untersucht. Es wurden verschiedene Faktoren bei der Entstehung, Progression und Malignität untersucht, neben der eigentlichen Expression des Oberflächenmarkers wurden auch die autokrine Wirkung der KISS1/Kisspeptin-Interaktion und intrazelluläre Signalwege betrachtet. Die Studie wurde am Tiermodell, in diesem Fall an Mäusen mit Mammakarzinom vorgenommen. Das Ergebnis dieser Studie zeigte, dass Mäuse, die bereits heterozygot den Oberflächenmarker KISS1 in Mammakarzinomtumorzellen aufwiesen, eine geringere Mammahyperplasie zeigten, langsames Wachstum von soliden Tumoren aufwiesen und weniger aggressive Tumoren bildeten. Weiterhin wurde in dieser Studie die Signalwirkung des KISS1-Rezeptors, zusammen mit Kisspeptin auf intrazelluläre Signalwege untersucht, insbesondere die Aktivierung der sogenannten Rho-GTPasen und gezeigt, dass die Rho A-GTPase ein Schlüsselprotein bei der Signalwirkung von KISS1 darstellt und erheblichen Einfluss auf die Tumorbildung und -progression hat. Die Aktivität von Rho A war in KISS1-negativen Tumorzellen deutlich niedriger als in KISS1-positiven Tumorzellen. Auch die Absiedelung von Tumorzellen wird von der Aktivität der Rho-A-Kinase beeinflusst. Hier war eine hohe Aktivität von Rho-A mit einem erhöhten Wachstum von KISS1-positiven Tumorzellabsiedelungen verbunden. Andere Rho-GTPasen wie Rac1 oder Cdc42 hatten keinen Einfluss auf die Tumorbildung und das Tumorstadium. Als ein weiterer Bestandteil dieser Untersuchung wurde auch die autokrine Wirkung der KISS1-Rezeptor/Kisspeptin-Interaktion untersucht und festgestellt, dass eine verringertes autokrines Signal in Mammaepithelzellen einen signifikanten Einfluss auf die initiale Bildung eines Mammakarzinoms bei den untersuchten Mäusen, hat (77, 78). In einem Review von Ulasov et al. (2019) wurde neben der Hemmung der Metastasenbildung, auch ein Einfluss von KISS1 bei der Tumorprogression und Autophagozytose beim Mammakarzinom

beschrieben (47). In einer weiteren Untersuchung von Cho et al. 2009 wurde eine antiangiogenetische Wirkung von KISS1 in humanen Prostatakarzinomzellen am Mausmodell festgestellt. Die antiangiogenetische Wirkung wird hierbei durch das Kisspeptin-10 (Kp-10), ein Genprodukt von KISS1 hervorgerufen. Kisspeptin-10 bewirkt in menschlichen Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) eine verminderte VEGF-Expression und in Folge wird eine Aktivierung des Rac/Cdc42-Signalwegs blockiert und die Tumorangiose reduziert (40).

5.3 Einfluss von KISS1 auf die Rezidivbildung und Überlebenswahrscheinlichkeit

Bei der Betrachtung des Zeitraums bis zum Auftreten eines Rezidivs oder bis zum Eintritt des Todes konnte in allen drei Testgruppen kein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren mit hohem KISS1-Status und Tumoren mit geringer KISS1-Expression festgestellt werden. Lediglich beim Vergleich der pulmonal metastasierten Gruppe mit der hepatisch metastasierten Gruppe konnte ein statistisch signifikanter Unterschied beim Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs festgestellt werden. In der pulmonal metastasierten Patientengruppe kam es signifikant früher zu einem Rezidiv bzw. zu einer Tumorprogression ($p=0,01$). Betrachtet man den Zeitraum bis zum Eintritt des Todes konnte zwar kein eindeutiger, statistisch signifikanter Unterschied belegt werden, jedoch konnte erkannt werden, dass Patienten mit einer pulmonalen Metastase/pulmonalen Metastasen deutlich eher verstarben als hepatisch metastasierte Patienten ($p=0,07$). Vergleicht man unsere Auswertung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zeichnet sich bei anderen Tumoren ein anderes Bild ab. In einer Untersuchung von Marot et al. 2007 wurde die Rolle von KISS1 und seinem zugehörigen Rezeptor GPR54 bei östrogenrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomzellreihen untersucht und daraus folgend der Zusammenhang zwischen antihormoneller Therapie und der verstärkten Expression von KISS1. Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von KISS1 in den Tumoren mit einem signifikant kürzerem Zeitintervall bis zum Auftreten eines Rezidivs verknüpft war. Nach acht Jahren waren 56,1 % der Patienten mit hohem KISS1-Status noch rezidivfrei, verglichen dazu waren in diesem Zeitraum 82,6 % der Patienten mit niedrigem KISS1-Status

rezidivfrei. Lag neben einer hohen Expression von KISS1 zusätzlich noch eine hohe Rezeptordichte mit GPR54 vor, waren nach acht Jahren nur noch 48,3 % der Patienten ohne erneute Bildung eines Tumors. In der Patientengruppe, die neben einer niedrigen Expression von KISS1 zusätzlich eine niedrige GPR 54-Rezeptordichte aufwies, war das rezidivfreie Intervall mit 90,2 % am höchsten (72).

5.4 Einfluss der Methylierung auf die Tumorgenese

In Zahlreichen weiteren Studien wird eine fehlerhafte Methylierung im Bereich der Promotorregion vieler Gene als ein bedeutender Faktor bei der Tumorgenese, der Prognose der Erkrankung und auch beim Rezidivrisiko beschrieben. Die Methylierung im Bereich der Promotorregion hat in diesem Kontext zum einen Einfluss auf die Expression eines Gens, zum anderen auch auf die Funktion des Genprodukts. Die Methylierung des KISS1-Gens und ihre Bedeutung bei der Vorhersage der Prognose von Darmkrebs wurde in einer Untersuchung von Chen et al. (2014) durchgeführt. In dieser Studie zeigte sich, dass eine Hypermethylierung des KISS1-Gens mit einem verstärkten Auftreten von kolorektalen Karzinomen, aber auch mit einer verstärkten Neigung zu Lymphknotenbefall und Bildung von Fernmetastasen einhergeht. Dies zeigt, dass eine verstärkte Methylierung dieses Gens mit einer verminderten Funktion dieses Tumorsuppressorgens verbunden ist (79). In anderen Studien wie von Chang et al. (2020) wurde dies auch bei anderen Genen nachgewiesen (80). In einem Review von Lam et al. 2016 wird die Bedeutung der Methylierung bestimmter Oberflächenmarker nicht nur in der Diagnostik beschrieben, sondern auch deren Bedeutung bei der Auswahl der Therapie (81). In Bezug auf unsere Untersuchungen bedeutet dies, dass bei der Diagnostik von KRK und deren Metastasierungsneigung auch der Methylierungsgrad möglicherweise eine nicht unerhebliche Rolle hat und auch eine erhebliche Bedeutung bei der Einschätzung des Krankheitsverlaufs und der Wahl der Therapie haben könnte. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen unserer Arbeit nicht durchgeführt, könnten jedoch in einer weiteren Studie eingehend untersucht werden.

5.5 Anatomische Einflüsse bei der Bildung pulmonaler und hepatischer Metastasen

Einen weiteren Einflussfaktor bei der Metastasierung von Darmtumoren stellt die Anatomie dar. Besonders bedeutsam ist hierbei der venöse Blutabfluss im Gastrointestinaltrakt. So erfolgt der venöse Abfluss aus dem Gebiet des Kolon ascendens, Kolon transversum, Kolon deszendens, Kolon sigmoideum und dem oberen Anteil des Rektums zunächst über die Vena mesenterica superior, die hinter dem Pankreaskopf nach Vereinigung mit der Vena splenica und der Vena mesenterica inferior in der Vena portae und somit in die Leber (82). Der distal der Linea pectinata gelegene untere Anteil des Rektums und der Analkanal wird über den Plexus venosus rectalis in die Vena rectalis superior, media und inferior in die Vena pudenda interna, nachfolgend in die Vena iliaca interna und von dort in die Vena cava inferior drainiert (82, 83). Folglich gelangt das venöse Blut distal der Linea pectinata direkt in den Körperkreislauf und hat somit keinen Anteil an der Blutversorgung der Leber. Eine hepatische Metastasierung kann daher bei distalen Rektumkarzinomen allein über eine „Filterfunktion“ in den Lebersinusoiden nicht stattfinden, bei proximal der Linea pectinata gelegenen Tumoren wäre dies möglich. Bei den distal gelegenen KRK, die über die Vena cava inferior direkt in den Körperkreislauf gelangen stellt die Lunge das nächste Gewebe mit einem sehr ausgedehnten engmaschigen Kapillarnetz dar. Hier wäre infolge eines verlangsamten Blutflusses eine Absiedelung von Tumorzellen im Sinne einer „Filterfunktion“ möglich. Diese Tatsache könnte einen möglichen Störfaktor in unseren Untersuchungen darstellen. Um diesen Störfaktor möglichst gering zu halten, wurde neben einer metastasenfremen Kontrollgruppe auch eine hepatisch metastasierte Kontrollgruppe bei unseren Untersuchungen mitgeführt. Auch bezüglich des KISS1-Status konnte kein relevanter Unterschied festgestellt werden. In der in Kapitel 4.1.3. aufgeführten statistischen Auswertung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beim KISS1-Status bei pulmonal metastasierten, im unteren und mittleren Rektum lokalisierten Tumoren und im oberen Drittel lokalisierten KRK festgestellt werden.

5.6 Bedeutung und kritische Betrachtung der Ergebnisse

In der von mir angefertigten Arbeit zeigte sich, dass es bei kolorektalen Karzinomen, die vorwiegend oder ausschließlich pulmonale Metastasen ausbilden, eine verstärkte Expression des Tumorsuppressorgens KISS1 nachgewiesen werden konnte. In Darmmalignomen, die keine (M0) oder beispielsweise hepatisch metastasierten, konnte diese Tatsache nicht beobachtet werden. Somit kann der Rückschluss gezogen werden, dass eine verstärkte Expression dieses Gens Einfluss auf die Ausbildung pulmonaler Metastasen hat und bei vorzugsweise pulmonal metastasierenden KRK keine tumorsuppressive Wirkung zeigt. Basierend auf den von uns gewonnenen Erkenntnissen ist in begrenztem Umfang eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf des KRK möglich, aber auch über Art und den Umfang der Therapie könnte beim Vorliegen bestimmter Oberflächenmarker besser geplant werden. In einer nachfolgenden Studien könnte eine Untersuchung des Methylierungsstatus von KISS1 bei KRK weitere Erkenntnisse zur Funktion dieses Gens erbringen und ebenfalls zur diagnostischen und therapeutischen Optimierung beitragen. Zur Validierung unserer Ergebnisse und auch weiterer Biomarkermuster wären prospektive Studien, in denen bereits bestimmte Merkmalskonstellationen vorher festgelegt wurden, sinnvoll. Die Patienten sollten bereits bei der Erstdiagnose und noch vor einer möglichen Metastasierung auf bestimmte genetische Muster ihrer Tumoren untersucht und eingeordnet werden. Unsere Studie fand an drei sehr streng selektierten Patientenkollektiven statt, es wurden jeweils Dreiergruppen (M0, PUL und HEP) mit möglichst hoher Merkmalsübereinstimmung gebildet. Die Aussagen, die im Rahmen der Arbeit getroffen wurden, stützten sich zum einen auf bereits bestehende wissenschaftliche Theorien, aber auch auf Aussagen und wissenschaftliche Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen des Instituts, die mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Somit kann eine allgemeine Gültigkeit der Ergebnisse angenommen werden, jedoch sollten weitere molekulargenetische Untersuchungen zur Validierung und zur genaueren genetischen Einordnung des KRK vorgenommen werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass bei pulmonaler Metastasierung des kolorektalen Karzinoms die Expression des Oberflächenmarkers KISS1 zum einen die Lokalisation der Metastase wie auch die generelle Wahrscheinlichkeit einer Metastasenbildung beeinflussen. Zu Bestätigung unserer Annahme wurde eine Testgruppe und zwei Kontrollgruppen (eine metastasenfreie und eine hepatisch metastasierte) gebildet. Mit immunhistochemischen Tests wurde anschließend die Stärke der Expression beurteilt. Hier konnte gezeigt werden, dass besonders pulmonal metastasierte kolorektale Karzinome, verglichen mit hepatisch metastasierten und metastasenfreien Tumoren, eine verstärkte KISS1-Expression aufwiesen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass bei der Bildung pulmonaler Metastasen der Tumormarker KISS1 nicht als Tumorsuppressoren wirksam ist. Weiterhin wurden statistische Zusammenhänge zwischen der Expression von KISS1 und dem Vorliegen weiterer Biomarker betrachtet. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde zudem der Zusammenhang zwischen der Expression von KISS1 und dem Gesamtüberleben bzw. dem Zeitraum bis zur Progression des Tumors untersucht. Hier konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im Progressionszeitraum bei hepatisch und pulmonal metastasierten KRK nachgewiesen werden. Patienten mit pulmonal metastasierten KRK zeigten einen deutlich kürzeres rezidivfreies Intervall. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit gesammelt, so zeigt sich, dass bei der pulmonalen Metastasierung des KRK es zum einen zu einer verstärkten Expression von KISS1 kommt, jedoch gleichzeitig auch noch andere Oberflächenmarker verstärkt auftreten. Zukünftig wäre somit bereits in frühen Tumorstadien eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung und nachfolgend auch eine verbesserte Anpassung der Therapie möglich.

Literaturverzeichnis

1. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
2. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 2021.
3. Franco A, Sikalidis AK, Solis Herruzo JA. Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005;97(6):432-48.
4. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med.* 1990;323(24):1664-72.
5. Kushi L, Giovannucci E. Dietary fat and cancer. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 9B:63S-70S.
6. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients.* 2019;11(1).
7. Shivappa N, Godos J, Hebert JR, Wirth MD, Piuri G, Speciani AF, et al. Dietary Inflammatory Index and Colorectal Cancer Risk-A Meta-Analysis. *Nutrients.* 2017;9(9).
8. Cappellani A, Zanghi A, Di Vita M, Cavallaro A, Piccolo G, Veroux P, et al. Strong correlation between diet and development of colorectal cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2013;18:190-8.
9. Schmit SL, Rennert HS, Rennert G, Gruber SB. Coffee Consumption and the Risk of Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(4):634-9.
10. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol.* 2019;13(2):109-31.
11. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(10):919-32.
12. von Herbay A, Krekeler G-R, Riede U-N. Digestorisches System. In: Riede U-N, Werner M, Schaefer H-E, editors. *Allgemeine und spezielle Pathologie.* 5. Auflage. Freiburg: Thieme Verlag; 2004. p. 719-26.
13. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF). Leitlinienprogramm Onkologie; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom; Langversion 2.0, AWMF Registrierungsnummer 021/007OL 2017 [15.11.2017].
14. Weigl K, Mons U. Familiäre Vorbelastung und Darmkrebs. Wissen zur Krebsprävention Heidelberg: Deutsches Krebsforschungszentrum; 2019 [cited 2021 09.06.2021].
15. Geißler M, Graeven U. Familiäre Formen des KRK. *Das kolorektale Karzinom:* Thieme Verlag; 2005. p. 12-4.
16. Rösch W. Gastroenterologie. *Duale Reihe Innere Medizin.* 2: Thieme; 2009. p. 552-9.
17. Schmoll H-J, Arnold D, Lang A, Graeven U. Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *Regulation.* 2007;53:17p3.
18. De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(7).

19. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
20. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997;21(5):233-300.
21. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(9):878-87.
22. Zheng S, Chang Y, Hodges KB, Sun Y, Ma X, Xue Y, et al. Expression of KISS1 and MMP-9 in non-small cell lung cancer and their relations to metastasis and survival. *Anticancer Res*. 2010;30(3):713-8.
23. Siegmund-Schultze N. Kolorektale Karzinome - Die Lage des Primarius zählt. *Deutsches Ärzteblatt*. 2017;1:20-3.
24. Schrag D, Weng S, Brooks G, Meyerhardt JA, Venook AP. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *American Society of Clinical Oncology*; 2016.
25. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
26. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1065-75.
27. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, 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):194-201.
28. Böcker W, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R, Tannapfel A, et al. Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, editors. *Pathologie*. 4. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2008. p. 193-6.
29. Robinson JR, Newcomb PA, Hardikar S, Cohen SA, Phipps AI. Stage IV colorectal cancer primary site and patterns of distant metastasis. *Cancer Epidemiol*. 2017;48:92-5.
30. Pretzsch E, Bosch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*. 2019;2019:7407190.
31. Cotte E, Glehen O. Lymphadenectomy for colon cancer: is there a consensus? *Ann Surg Oncol*. 2009;16(6):1454-5.
32. Weber K, Gohl J, Lux P, Merkel S, Hohenberger W. [Principles and technique of lymph node dissection in colorectal carcinoma]. *Chirurg*. 2012;83(5):487-98; quiz 99-500.
33. Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Wnt/FZD signaling and colorectal cancer morphogenesis. *Front Biosci*. 2007;12:458-70.
34. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461-73.
35. Yousefi M, Nosrati R, Salmaninejad A, Dehghani S, Shahryari A, Saberi A. Organ-specific metastasis of breast cancer: molecular and cellular mechanisms underlying lung metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*. 2018;41(2):123-40.
36. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110-22.

37. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2005;92(4):347-59.
38. Harihar S, Ray S, Narayanan S, Santhoshkumar A, Ly T, Welch DR. Role of the tumor microenvironment in regulating the anti-metastatic effect of KISS1. *Clin Exp Metastasis*. 2020;37(2):209-23.
39. Platonov ME, Borovjagin AV, Kaverina N, Xiao T, Kadagidze Z, Lesniak M, et al. KISS1 tumor suppressor restricts angiogenesis of breast cancer brain metastases and sensitizes them to oncolytic virotherapy in vitro. *Cancer Lett*. 2018;417:75-88.
40. Cho SG, Yi Z, Pang X, Yi T, Wang Y, Luo J, et al. Kisspeptin-10, a KISS1-derived decapeptide, inhibits tumor angiogenesis by suppressing Sp1-mediated VEGF expression and FAK/Rho GTPase activation. *Cancer Res*. 2009;69(17):7062-70.
41. Luedde T, Roderburg C, Binnebösel M, Neumann U, Trautwein C. Interdisziplinäre Therapie kolorektaler Lebermetastasen. *Der Gastroenterologe*. 2016;11(6):479-88.
42. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2016;6:29765.
43. Heinemann V, Engel J, Giessen C, Gross M, Kleespies A, Kolligs F, et al. Kolonkarzinom. In: München T, editor. *MANUAL Gastrointestinale Tumoren*. 9. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag; 2013. p. 164-211.
44. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
45. Ly T, Harihar S, Welch DR. KISS1 in metastatic cancer research and treatment: potential and paradoxes. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(3):739-54.
46. Li C, Yuan L, Han S, Xuan M, Liu D, Tian B, et al. Reduced Kiss1 expression is associated with clinical aggressive feature of gastric cancer patients and promotes migration and invasion in gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 2020;44(3):1149-57.
47. Ulasov IV, Borovjagin AV, Timashev P, Cristofanili M, Welch DR. KISS1 in breast cancer progression and autophagy. *Cancer Metastasis Rev*. 2019;38(3):493-506.
48. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28969-75.
49. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34631-6.
50. Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(4):1379-83.
51. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, et al. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(1):85-92.
52. Cebrian V, Fierro M, Orenes-Pinero E, Grau L, Moya P, Ecke T, et al. KISS1 methylation and expression as tumor stratification biomarkers and clinical outcome prognosticators for bladder cancer patients. *Am J Pathol*. 2011;179(2):540-6.
53. Hu KL, Zhao H, Chang HM, Yu Y, Qiao J. Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:365.

54. Roberts SA, Kaiser UB. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic etiologies of central precocious puberty and the role of imprinted genes. *Eur J Endocrinol.* 2020;183(4):R107-R17.
55. Cho SG, Li D, Tan K, Siwko SK, Liu M. KiSS1 and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):585-91.
56. Ciaramella V, Della Corte CM, Ciardiello F, Morgillo F. Kisspeptin and Cancer: Molecular Interaction, Biological Functions, and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:115.
57. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ Res.* 2016;118(2):352-66.
58. Antar S, Mokhtar N, Abd Elghaffar MA, Seleem AK. Association of polymorphisms in metastasis suppressor genes NME1 and KISS1 with breast cancer development and metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2020;32(1):24.
59. Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, et al. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 2004;111(6):868-72.
60. Okugawa Y, Inoue Y, Tanaka K, Toiyama Y, Shimura T, Okigami M, et al. Loss of the metastasis suppressor gene KiSS1 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2013;30(3):1449-54.
61. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003;129(9):531-5.
62. Trevisan CM, Montagna E, de Oliveira R, Christofolini DM, Barbosa CP, Crandall KA, et al. Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(4):1259-76.
63. Zhang H, Long Q, Ling L, Gao A, Li H, Lin Q. Elevated expression of KiSS-1 in placenta of preeclampsia and its effect on trophoblast. *Reprod Biol.* 2011;11(2):99-115.
64. Hoffken N, Leichsenring J, Reinacher-Schick A. [Clinically relevant, gender-specific differences in colorectal carcinoma (CRC)]. *Z Gastroenterol.* 2015;53(8):782-8.
65. Wittekind C. [General aspects of tumor grading]. *Pathologe.* 2016;37(4):283-4.
66. Wittekind C. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren.* Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017. 1-15 p.
67. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(19):1420-5.
68. Lang G. *Histotechnik; Praxislehrbuch für die medizinische Analytik.* Wien: Springer Verlag Wien New York; 2012. 270-91 p.
69. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;48(9):876-8.
70. Matthaïou S, Kostakis ID, Kykalos S, Machairas N, Spartalis E, Ntikoudi E, et al. KISS1 and KISS1R expression in primary and metastatic colorectal cancer. *J BUON.* 2018;23(3):598-603.
71. Martin TA, Watkins G, Jiang WG. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(6):503-11.

72. Marot D, Bieche I, Aumas C, Esselin S, Bouquet C, Vacher S, et al. High tumoral levels of Kiss1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):691-702.
73. Schmid K, Wang X, Haitel A, Sieghart W, Peck-Radosavljevic M, Bodingbauer M, et al. KiSS-1 overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2007;450(2):143-9.
74. McNally LR, Welch DR, Beck BH, Stafford LJ, Long JW, Sellers JC, et al. KISS1 over-expression suppresses metastasis of pancreatic adenocarcinoma in a xenograft mouse model. *Clin Exp Metastasis*. 2010;27(8):591-600.
75. Sun YB, Xu S. Expression of KISS1 and KISS1R (GPR54) may be used as favorable prognostic markers for patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2013;43(2):521-30.
76. Kostakis ID, Agrogiannis G, Vaiopoulos AG, Mylona E, Patsouris E, Kouraklis G, et al. A clinicopathological analysis of KISS1 and KISS1R expression in colorectal cancer. *APMIS*. 2015;123(7):629-37.
77. Cho SG, Wang Y, Rodriguez M, Tan K, Zhang W, Luo J, et al. Haploinsufficiency in the prometastasis Kiss1 receptor Gpr54 delays breast tumor initiation, progression, and lung metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(20):6535-46.
78. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:247-69.
79. Chen SQ, Chen ZH, Lin SY, Dai QB, Fu LX, Chen RQ. KISS1 methylation and expression as predictors of disease progression in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):10071-81.
80. Chang SC, Liew PL, Ansar M, Lin SY, Wang SC, Hung CS, et al. Hypermethylation and decreased expression of TMEM240 are potential early-onset biomarkers for colorectal cancer detection, poor prognosis, and early recurrence prediction. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):67.
81. Lam K, Pan K, Linnekamp JF, Medema JP, Kandimalla R. DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866(1):106-20.
82. Kachlik D, Pechacek V, Musil V, Baca V. The venous system of the pelvis: new nomenclature. *Phlebology*. 2010;25(4):162-73.
83. Benninghoff A, Drenckhahn D. *Taschenbuch Anatomie*. 2 ed. München: Elsevier GmbH; 2014 2014.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner und Herrn Prof. Dr. med. Frederick Klauschen für die Überlassung des Themas und für die freundliche, kompetente und geduldige Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Marlies Michl für die Hilfe bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs und die gute Mitbetreuung bedanken.

Bei Frau Sendelhofert und Frau Heier und dem Team der technischen Assistentinnen und Assistenten des Eingangslabors an den Standorten Großhadern und Innenstadt bedanke ich mich vielmals für die Anfertigung der Gewebeschnitte und die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen. Herrn Francesco Taverna danke ich für das zur Verfügung stellen weiterer Daten zur statistischen Auswertung.

Zuletzt möchte ich noch bei meinem Kommilitonen Thomas Schneider für die tatkräftige Unterstützung bei der Archivarbeit bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ehrnsperger, Dr. med. dent. Marianne Gabriele

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Validierung von KISS1 als Biomarker für das pulmonal
metastasierte kolorektale Karzinom**

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

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

Landshut, den 04.04.2023

Ort, Datum

Marianne Ehrnsperger

Unterschrift Doktorandin/Doktorand