

Aus dem Institut für Pathologie und Molekulare Diagnostik  
am Universitätsklinikum Augsburg  
Direktor: Prof. Dr. Bruno Märkl

**Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)**  
**– Ein neuer, vielversprechender Biomarker des Kolonkarzinoms –**  
**Ergebnisse einer retrospektiven Studie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lana Maria Kempkens

aus

Augsburg

2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Bruno Märkl

Mitberichterstatter: PD Dr. Steffen Ormanns  
Prof. Dr. Falk Roeder

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Benedikt Martin

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2024

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1      | Definition des kolorektalen Karzinoms                                 | 5         |
| 1.2      | Epidemiologie   | 5         |
| 1.3      | Risikofaktoren  | 7         |
| 1.4      | Grundlagen der Pathogenese  | 7         |
| 1.4.1    | Adenom-Karzinom-Sequenz   | 8         |
| 1.4.2    | Serratierte Karzinogenese   | 10        |
| 1.5      | Diagnostik und Screening  | 11        |
| 1.6      | Klassifikation des kolorektalen Karzinoms                             | 12        |
| 1.6.1    | TNM Klassifikation  | 12        |
| 1.6.2    | UICC- Stadien   | 14        |
| 1.6.3    | Histopathologische Graduierung (Grading)                              | 15        |
| 1.7      | Therapie des Kolonkarzinoms   | 16        |
| 1.7.1    | Operative Therapie  | 16        |
| 1.7.2    | Systemische Therapie  | 17        |
| 1.8      | Histomorphologische Parameter und Tumorinvasionsfront                 | 18        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>21</b> |
| 2.1      | Zielsetzung   | 21        |
| 2.2      | Patientenkollektiv  | 21        |
| 2.3      | Histologisches Vorgehen   | 22        |
| 2.4      | Definition und Beurteilungskriterien von SARIFA                       | 22        |
| 2.5      | Statistische Analysen   | 26        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>27</b> |
| 3.1      | Klinisch-pathologische Daten  | 27        |
| 3.2      | Erhebungsdauer des SARIFA-Status und Interobserver-Variabilität       | 28        |
| 3.3      | Charakteristika SARIFA-positiver Adenokarzinome                       | 28        |
| 3.4      | Univariate prognostische Analyse                                      | 29        |
| 3.5      | Multivariate Cox-Regressionsanalyse                                   | 31        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>32</b> |
| 4.1      | SARIFA als neuer Biomarker des Kolonkarzinoms                         | 33        |
| 4.2      | SARIFA Status und dessen prognostische Relevanz                       | 36        |
| 4.3      | SARIFA: Biologischer Hintergrund und Funktion                         | 37        |
| 4.4      | SARIFA als möglicher prognostischer Parameter bei weiteren Karzinomen | 38        |
| 4.5      | Inhibierung der Fettsäureoxidation als therapeutischer Ansatz         | 39        |
| 4.6      | Limitationen  | 40        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>42</b> |
|          | Literaturverzeichnis  | 44        |
|          | Publikation   | 51        |
|          | Abbildungsverzeichnis   | 52        |
|          | Tabellenverzeichnis   | 53        |
|          | Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis                                  | 54        |
|          | Danksagung  | 56        |
|          | Eidesstattliche Erklärung   | 57        |

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition des kolorektalen Karzinoms

Nach Definition der Arbeitsgruppe „Staging des kolorektalen Karzinoms“ des World Congress of Gastroenterology werden Tumoren, deren distaler Tumorrand bei Messung mit dem starren Rektosigmoidoskop mehr als 16cm von der Anokutanlinie entfernt liegt, als Kolonkarzinome, die weiter distal gelegenen (16 cm oder weniger) als Rektumkarzinome klassifiziert (1).

## 1.2 Epidemiologie

Weltweit weist das kolorektale Karzinom (KRK) die dritthäufigste Inzidenzrate auf und stellt die zweithäufigste Krebstodesursache dar (2).

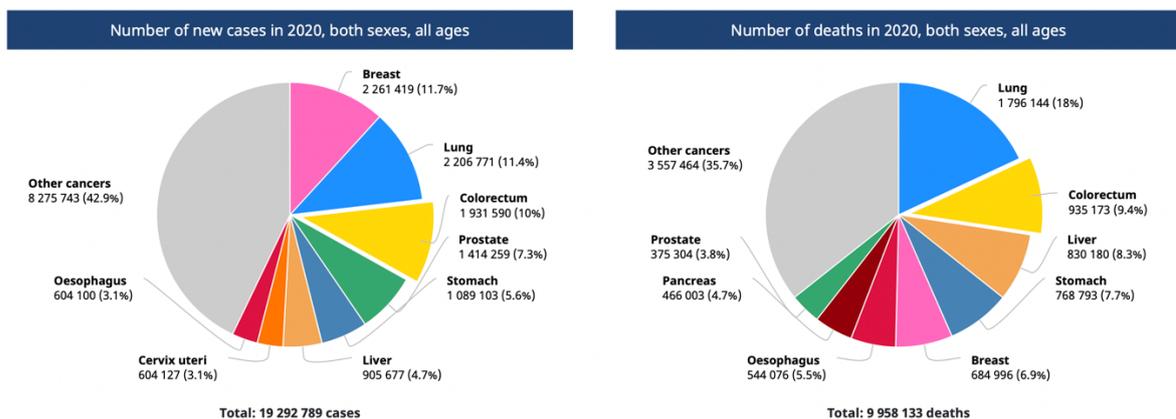


Abbildung 1: Kreisdiagramme, Inzidenz und Mortalität Kolorektales Karzinom Weltweit, GLOBOCAN 2020

Quelle: [https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10\\_8\\_9-Colorectum-fact-sheet.pdf](https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf)

Bis zum Jahr 2030 wird weltweit ein Anstieg der Inzidenz um 60% erwartet; dies entspricht etwa 2,2 Millionen neuen Fällen. In den Industrienationen, welche vom kolorektalen Karzinom am häufigsten betroffen sind, kann eine Stabilisierung bzw. ein Rückgang der Neuerkrankungen beobachtet werden, wohingegen besonders in den Entwicklungsländern eine schnell wachsende Zunahme zu sehen ist (3).

In Deutschland werden jährlich ca. 60.000 Neuerkrankungen und etwa 24.000 Todesfälle durch das kolorektale Karzinom verzeichnet. Damit ist jede achte Krebserkrankung auf Dick- und Mastdarmkarzinome zurückzuführen. Eine von 20 Frauen und einer von 17 Männern wird hierzulande im Laufe des Lebens mit der Diagnose Darmkrebs konfrontiert. Das Risiko zu erkranken, nimmt mit dem Alter stetig zu, sodass das mittlere Erkrankungsalter zwischen 72 (Männer) und 76 Jahren (Frauen) liegt. Seit 2003 kann in Deutschland ein Rückgang der altersstandardisierten Neuerkrankungsrate von Kolorektalkarzinomen beobachten werden, zudem verzeichnet das Robert Koch-Institut einen Rückgang der altersstandardisierten Sterberaten um 20% innerhalb der letzten 10 Jahre. Dies ist besonders auf die seit 2002 eingeführten Vorsorgekoloskopie zurückzuführen. Betrachtet man die anatomische Lage der Tumoren, so sinkt die Karzinomrate in allen Darmabschnitten mit Ausnahme des Colon ascendens. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt aktuell bei 63% (4, 5).

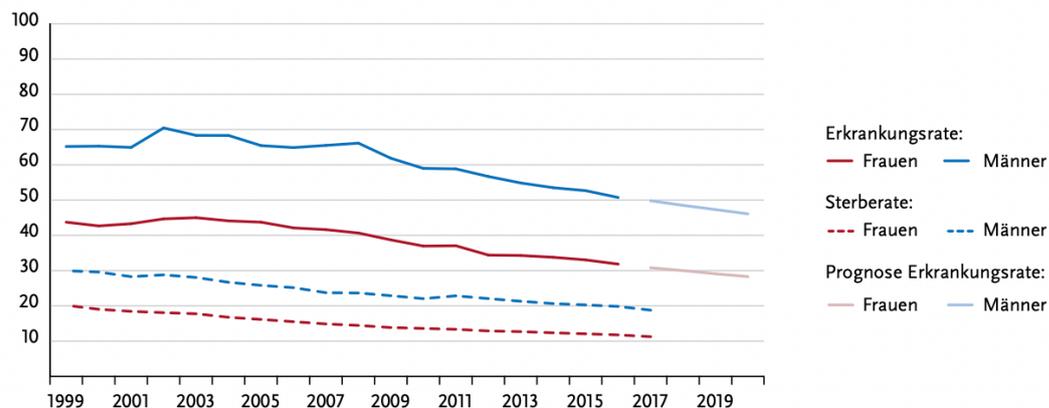


Abbildung 2: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C18-C20, Deutschland 1999-2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020; je 100.000 (alter Europastandard)

Quelle:

[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/kid\\_2019\\_c18\\_c20\\_darm.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c18_c20_darm.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 39, aufgerufen am 31.10.21)

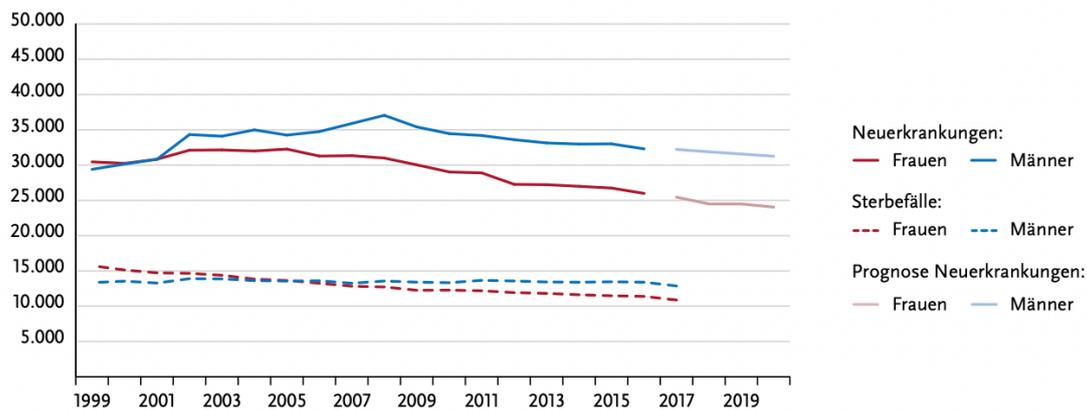


Abbildung 3: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C18-C20, Deutschland 1999-2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020

Quelle:

[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/kid\\_2019\\_c18\\_c20\\_darm.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c18_c20_darm.pdf?__blob=publicationFile) (Seite 39, aufgerufen am 31.10.21)

### 1.3 Risikofaktoren

Die steigende Fallzahl in den Entwicklungsländern ist besonders auf den zunehmend westlich-ähnlichen Lebensstil zurückzuführen (3). Risikofaktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind mittlerweile vielfach untersucht; hierzu zählen mangelnde körperliche Aktivität, ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) sowie das Rauchen von Tabakwaren. Auch Alkoholkonsum und weitere Ernährungsfaktoren wie der Konsum von rotem und verarbeitetem Fleisch sind mit einem erhöhten KRK Risiko assoziiert (6, 7).

### 1.4 Grundlagen der Pathogenese

Etwa 70% der kolorektalen Karzinome entstehen aufgrund spontaner genetischer Mutationen, ca. 20-30% treten familiär gehäuft auf, weniger als 5% sind auf monogen hereditäre Erkrankungen zurückzuführen (FAP- und Lynch-Syndrom). Als familiär gehäuft wird ein vermehrtes Vorkommen von KRK in der Familie ohne eindeutige genetische Ursache bezeichnet (7).

Mehr als 90% der kolorektalen Karzinome sind nach histopathologischer Einteilung Adenokarzinome, auf welche sich diese Arbeit im weiteren Verlauf

bezieht. Die restlichen 10% bilden u.a. neuroendokrine-, adenosquamöse-, undifferenzierte- sowie Plattenepithelkarzinome (8).

Die Entstehung von KRK beginnt in den Krypten des Darmepithels. Dies sind Einstülpungen der Darmschleimhaut, welche die Oberfläche vergrößern und in deren Basis Stammzellen - verantwortlich für die ständige Zellerneuerung im Darm - liegen. Genetische (zum Beispiel Genmutationen oder -amplifikationen) und epigenetische (z.B. abweichende DNA-Methylierung) Veränderungen dieser Stammzellen führen zum Verlust der genetischen und/oder epigenetischen Stabilität und resultieren in sogenannten „aberrant crypt foci“ (ACF). Folgt eine kritische Akkumulation dieser Aberrationen (d.h. Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen), entstehen initiale Krebszellen. Diese sind verantwortlich für die Initiierung, das Fortschreiten, die Metastasierung sowie das Wiederauftreten von Karzinomen.

Basierend auf der Abfolge der pathogenen Mechanismen kann zwischen der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz, die für ca. 70-90% der KRK verantwortlich ist, sowie der serratierten Karzinogenese, auf welche ca. 10-20% der KRK zurückzuführen sind, unterschieden werden. Beiden Wegen der Karzinogenese ist gemeinsam, dass aus makroskopischer Sicht zunächst aus ACF ein Schleimhautpolyp entsteht, der in unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen kann (polyp to colorectal cancer sequence). Diese maligne Transformation von Adenom (=neoplastischer Polyp) zu Karzinom dauert im Schnitt 10 bis 15 Jahre (9-13). Abzugrenzen davon sind angeborene genetische Defekte (z.B. Lynch-Syndrom), bei welchen dieser Prozess deutlich schneller voranschreiten kann.

#### **1.4.1 Adenom-Karzinom-Sequenz**

Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz, das auch als chromosomale Instabilität (CIN) bekannt ist, wurde auf molekularbiologischer Basis erstmals von Fearon und Vogelstein beschrieben (14). Hier stellt das Aneinanderreihen spezifischer Mutationen eine Voraussetzung für die Karzinogenese dar. Die primäre Schlüsselmutation betrifft dabei das APC-(Adenomatöses Polyposis Coli) Gen, das inaktiviert wird. Das Produkt dieses Tumorsuppressorgens ist

unter anderem entscheidend für den Abbau von  $\beta$ -Catenin. Dieses Protein partizipiert am Wnt-Signalweg, welcher stimulierend auf die Zellteilung wirkt. Somit kommt es zu einer unregulierten Proliferation, die zur Entwicklung des „klassischen Adenoms“ führt, einer Vorläuferläsion mit tubulärer, tubulovillöser oder villöser Histologie. Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges kann in fast allen KRK beobachtet werden. Mutationen im APC-Gen können entweder sporadisch oder im Rahmen der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) auftreten.

Das FAP-Syndrom ist ein seltenes, autosomal-dominant vererbtes Syndrom, das aufgrund einer Mutation im APC-Gen zur Entwicklung hunderter Polypen im gesamten Gastrointestinaltrakt führt. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms beträgt bei diesen Patienten 100% und erfordert daher frühzeitige und regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen sowie meist eine prophylaktische Proktokolektomie (15, 16).

Im Verlauf akkumulieren weitere genetische Veränderungen, die zur Progression der Adenom-Karzinom-Sequenz führen. Diese beinhalten meist eine KRAS-Aktivierung (Protoonkogen), eine DCC-(deleted in colorectal cancer) Genmutation sowie einen Verlust der Funktion des SMAD4- und TP53-Gens (Tumorsuppressorgene). Die Produkte dieser Gene nehmen eine wichtige Rolle in den Signalkaskaden ein, die das Zellwachstum kontrollieren; folglich werden Mutationen und die weitere Karzinogenese begünstigt. Das Resultat ist ein chromosomal instabiles (CIN), aber mikrosatellitenstabiles kolorektales Adenokarzinom (12, 17).

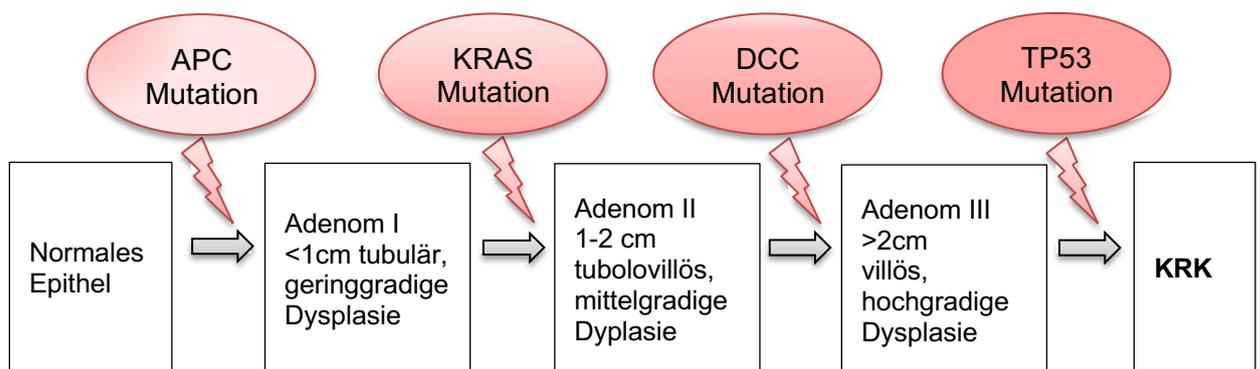


Abbildung 4: Adenom-Karzinom Sequenz basierend auf dem Modell von Fearon und Vogelstein (1990), Darstellung der malignen Transformation durch die Akkumulation einzelner Mutationen.

## 1.4.2 Serratierte Karzinogenese

Erst vor wenigen Jahren wurde das Modell der serratierten Karzinogenese, auch bekannt als alternative Karzinogenese, genauer beschrieben. Aufgrund der Entwicklung moderner diagnostischer Verfahren, wie der flexiblen Endoskopie, war nun eine Kontrolle der Vorläuferläsionen im kurzfristigen Verlauf mit vertretbarer Patientenbelastung möglich. Dadurch konnten diese neuen Pfade der Tumorentstehung und somit die Heterogenität des KRK bewiesen werden.

Die serratierte Karzinogenese unterscheidet sich von der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz nicht nur aus histologischer Sicht, sondern auch im molekularpathologischen Profil der Vorläuferläsionen sowie Karzinomen. Zu den serratierten Vorläuferläsionen zählen hyperplastische Polypen sowie sessile serratierte Läsionen (SSL) und traditionelle serratierte Adenome (TSA). Die beiden letzteren Läsionen können zu serratierten Adenokarzinomen entarten. Häufigster Subtyp ist mit 60-75% der hyperplastische Polyp, gefolgt vom SSA mit 20-35%; mit weniger als 1% stellt das traditionelle serratierte Adenom eine seltene Entität dar (17, 18)

Die primäre Schlüsselmutation dieser Sequenz betrifft meist das BRAF- und/oder KRAS-Gen. Beide Protoonkogene spielen eine entscheidende Rolle in der Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaltransduktionskaskade (12). Die MAPK gehört zur Familie der Serin-Threonin-Kinasen und ermöglicht eine Kommunikation zwischen Zellmembran und Zellkern, um Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle zu kontrollieren (19). Zudem folgen epigenetische Veränderungen, wie Hypermethylierung von CpG-Inseln\* auf Tumorsuppressorgenen, die zum sog. „Silencing“ dieser Gene führen. Ein Beispiel für ein häufig betroffenes Tumorsuppressorgen ist das MLH1. Hierbei handelt es sich um ein Mismatch-repair-Gen (MMR-Gen), dessen Inaktivierung zur Mikrosatelliteninstabilität (MSI) führt.

Daher wird die serratierte Karzinogenese häufig als „CpG island methylation phenotype“ (CIMP) bezeichnet.

\*CpG-Inseln: kurze Abschnitte auf der eukaryotischen DNA, mit gehäufte Wiederholung der Nukleotidfolge Cytosin-Guanin.

Abhängig davon, welche Gene vom „Silencing“ betroffen sind, können sowohl mikrosatellitenstabile als auch -instabile kolorektale Karzinome aus der serratierten Karzinogenese resultieren. Eine Mikrosatelliteninstabilität entsteht stets, wenn MMR-Gene, die für DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich sind, betroffen sind (18).

## **1.5 Diagnostik und Screening**

Da das KRK keine auffälligen oder charakteristischen Frühsymptome aufweist, sind die ersten anamnestischen Hinweise meist unspezifische Symptome. Hierzu gehören u.a. plötzliche Veränderungen der Stuhlgewohnheiten mit anhaltender oder sich abwechselnder Obstipation und Diarrhö, rektale Blutabgänge oder Leistungsabfall. Spätsymptome können eine tumorbedingte Ileussyndromatik, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber sein.

Da ca. 10% der KRK tastbar sind, beinhaltet die Basisdiagnostik immer die digital-rektale Untersuchung (20). Goldstandard zur Detektion kolorektaler Polypen und Karzinome ist die Koloskopie mit Biopsieentnahme (21). Die Sensitivität dieses Verfahrens für kolorektale Karzinome liegt bei über 95% (22). Eine komplette endoskopische Untersuchung des Kolons ist obligat, da bei bis zu 7% der Patienten synchron weitere Karzinome des Dick- und Enddarms vorliegen (23). Falls nur eine inkomplette Koloskopie durchgeführt werden kann - z.B. aufgrund einer tumorbedingten Stenose - ist alternativ eine Computertomografie (CT)- oder Magnetresonanz (MR)-Kolonografie möglich. Nach gesicherter histopathologischer Diagnose folgt zur Ausbreitungsdiagnostik eine Abdomensonografie zum Ausschluss einer hepato-genen Metastasierung, sowie eine konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax zum Ausschluss einer pulmonalen Metastasierung. Handelt es sich um ein Rektumkarzinom, sind zudem die starre Rektoskopie, eine rektale Endosonografie und eine Magnetresonanztomografie (MRT) des Beckens essenzieller Bestandteil des Tumorstaging. Bei unklaren Befunden sollte eine Computertomografie von Abdomen, Becken und/oder Thorax durchgeführt werden, da bei ca. 20% der Patienten mit neu diagnostiziertem kolorektalen Karzinom bereits Fernmetastasen vorliegen. Vergleichsstudien konnten beweisen, dass eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) aufgrund der

eingeschränkter Sensitivität für die Detektion von Lymphknotenmetastasen (29-85%) den erwähnten bildgebenden Verfahren zum initialen Staging nicht überlegen ist (21, 24).

Für zukünftige Verlaufskontrollen in der Nachsorge wird vor Therapiebeginn der Tumormarker CEA (carcino-embryonales Antigen) gemessen, welcher bei einem Teil der Patienten mit KRK erhöht ist. Präoperativ erhöhte Werte normalisieren sich bei kompletter Tumorentfernung, ein erneuter Anstieg ist hinweisgebend für ein Rezidiv. Hierbei ist der Verlauf aussagekräftiger als absolute Werte (20).

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Da im Frühstadium häufig ein kurativer Behandlungsansatz möglich ist, kommt der Sekundärprävention besondere Bedeutung zu. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit KRK im Frühstadium (Stadium I und II) liegt bei 90%, wohingegen nur ca. 13% der Patienten mit weiter fortgeschrittener Erkrankung diesen Zeitraum überleben (25).

Das KRK ist eine stark altersabhängige Tumorentität, daher wird laut internationalen Leitlinien für Personen ohne erhöhtes Risiko ein Screening ab dem 50. Lebensjahr empfohlen. Bei Risikopatienten, wie z.B. familiär gehäuften Vorkommen von Darmkrebs, sollte dieses schon früher erfolgen. Mögliche Untersuchungen sind ein Stuhltest auf okkultes Blut, die Koloskopie oder die flexible Sigmoidoskopie. Das Standardverfahren in Deutschland ist die Vorsorgekoloskopie, welche bei unauffälligem Befund alle 10 Jahre wiederholt werden sollte. Fallkontrollstudien konnten zeigen, dass durch die regelmäßige Vorsorge die Inzidenz von KRK um 53-72% und die krankheitsspezifische Mortalität um 31% reduziert werden konnte (21, 25).

## **1.6 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms**

### **1.6.1 TNM Klassifikation**

Bedeutende Klassifikationssysteme für maligne Tumore sind die TNM-Klassifikation sowie die darauf basierende Stadieneinteilung (sog. Staging) der „Union Internationale Contra le Cancer“ (UICC). TNM ist die Abkürzung der englischen Wörter „Tumor, Node, Metastasis“, wobei die erste Kategorie die

Infiltrationstiefe des Primärtumors, die zweite den Lymphknotenstatus (d.h. das Fehlen oder Vorliegen von Lymphknotenmetastasen) und die dritte das Fehlen oder Vorliegen von Fernmetastasen beschreibt (26).

Ursprünglich wurde die TNM-Klassifikation entwickelt, um die Prognose von malignen Erkrankungen abzuschätzen. Im Verlauf wurden zudem therapeutische Strategien sowie die Einteilung von Patienten für klinische Studien auf diesem Klassifikationssystem aufgebaut (27). In zahlreichen Studien konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass der TNM-Status als Goldstandard zur Einteilung von Patienten in prognostische Subgruppen unzureichend ist und weitere Parameter miteingeschlossen werden müssen (28-31).

Die TNM-Klassifikation wird wie folgt angegeben (32):

| <b>TNM</b> | <b>Ausdehnung</b>   |
|------------|---|
| <b>Tx</b>  | Primärtumor kann nicht beurteilt werden   |
| <b>T0</b>  | Kein Anhalt für Primärtumor   |
| <b>Tis</b> | Carcinoma in situ   |
| <b>T1</b>  | Infiltration der Submukosa  |
| <b>T2</b>  | Infiltration der Muscularis propria   |
| <b>T3</b>  | Infiltration der Subserosa (intraperitoneale Anteile), Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes (sekundär retroperitoneale Anteile) |
| <b>T4</b>  | Perforation des viszeralen Peritoneums (T4a) oder Infiltration anderer Organe/Strukturen (T4b)  |
| <b>Nx</b>  | Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden   |
| <b>N0</b>  | Keine regionären Lymphknotenmetastasen  |
| <b>N1</b>  | 1-3 regionäre Lymphknoten betroffen   |
| <b>N2a</b> | 4-6 regionäre Lymphknoten betroffen   |
| <b>N2b</b> | ≥ 7 regionäre Lymphknoten betroffen   |

|            |   |
|------------|---|
| <b>M0</b>  | Keine Fernmetastasen  |
| <b>M1a</b> | Fernmetastasen: nur ein Organ betroffen                           |
| <b>M1b</b> | Fernmetastasen: mehr als ein Organ betroffen                      |
| <b>M1c</b> | Fernmetastasen im Peritoneum, mit oder ohne Befall anderer Organe |

Der Begriff „invasive Läsion“ unterscheidet sich im Dick- und Enddarmbereich erheblich von anderen gastrointestinalen Tumoren. Allgemein spricht man von einem invasiven Karzinom, sobald die unter den Epithelzellen gelegene Basalmembran von den Tumorzellen durchbrochen wurde und somit Potential zur Metastasierung besteht. Beim KRK hingegen besteht erst ab einer Invasion der tiefer gelegenen Submukosa (klassifiziert als pT1) das Risiko der Metastasenbildung. Daher fallen unter die nicht-invasive Staging-Kategorie „Carcinoma in situ“ (pTis) sowohl intraepitheliale (maligne Zellen begrenzt von intakter Basalmembran) als auch intramukosale Karzinome (maligne Zellen durchbrechen die Basalmembran und erreichen die darunterliegende Lamina propria mucosae (33); da es sich hierbei um eine umstrittene Diagnose handelt, wird das intramukosale Karzinom von den meisten westlichen Pathologen unter high grade Dysplasie subsummiert).

Der histopathologische Lymphknotenstatus (pN-Status) ist ein bedeutender prognostischer Faktor des Kolonkarzinoms und entscheidend für die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie. Um diesen sicher bestimmen zu können, sollten mindestens 12 regionale Lymphknoten zur Begutachtung vorliegen. Eine geringere Lymphknotenausbeute birgt ein hohes Risiko falsch-negativer Ergebnisse und somit eines insuffizienten Stagings (34, 35), kann allerdings auch Ausdruck einer schlechten immunologischen Reaktion sein (36).

### 1.6.2 UICC- Stadien

Die UICC-Stadieneinteilung vereint verschiedene Faktoren der TNM-Klassifikation, gibt Auskunft über die Ausbreitung maligner Tumoren und

berücksichtigt sowohl Therapiemöglichkeiten als auch Prognose der Tumorerkrankung (7).

Die UICC-Klassifikation wird wie folgt angegeben (21):

| <b>UICC 2010</b>   | <b>T</b> | <b>N</b> | <b>M</b> |
|--------------------|----------|----------|----------|
| <b>Stadium 0</b>   | Tis      | N0       | M0       |
| <b>Stadium I</b>   | T1/ T2   | N0       | M0       |
| <b>Stadium II</b>  | T3/ T4   | N0       | M0       |
| <b>IIA</b>         | T3       | N0       | M0       |
| <b>IIB</b>         | T4a      | N0       | M0       |
| <b>IIC</b>         | T4b      | N0       | M0       |
| <b>Stadium III</b> | jedes T  | N1/ N2   | M0       |
| <b>IIIA</b>        | T1/2     | N1       | M0       |
|                    | T1       | N2a      | M0       |
| <b>IIIB</b>        | T3/ T4   | N1       | M0       |
|                    | T2/ T3   | N2a      | M0       |
|                    | T1/ T2   | N2b      | M0       |
| <b>IIIC</b>        | T4a      | N 2a     | M0       |
|                    | T3/ T4a  | N 2b     | M0       |
|                    | T4b      | N1/ N2   | M0       |
| <b>Stadium IV</b>  | jedes T  | jedes N  | M1       |
| <b>IVA</b>         | jedes T  | jedes N  | M1a      |
| <b>IVB</b>         | jedes T  | jedes N  | M1b      |

### 1.6.3 Histopathologische Graduierung (Grading)

Bei der postoperativen histopathologischen Untersuchung wird der Differenzierungsgrad kolorektaler Karzinome bestimmt. Der Tumorgrad wird unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils der Drüsenformation im Tumor angegeben. Hierbei gilt, dass sog. „high-grade“ Karzinome mit einer frühen lymphogenen Metastasierung assoziiert sind. Kolorektale Karzinome mit einer hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) haben eine signifikant

günstigere Prognose als Karzinome mit niedriggradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-N) oder Mikrosatellitenstabilität (MSS).

Die Grading-Kategorien können wie folgt eingeteilt werden (20, 21, 37):

- a) Low-grade-Karzinome: G1 = gut differenziert; G2 = mäßig differenziert.
- b) High-grade-Karzinome: G3 = schlecht differenzierte muzinöse und nichtmuzinöse Adenokarzinome; G4 = Siegelringzellkarzinome, kleinzellige und undifferenzierte Karzinome.

## **1.7 Therapie des Kolonkarzinoms**

### **1.7.1 Operative Therapie**

Chirurgischer Standard beim Kolonkarzinom ist die radikale En-bloc-Resektion des Tumors mit dem Ziel der R0-Resektion unter Mitentfernung des regionalen Lymphabflussgebietes nach zentraler Gefäßligatur. Zudem wird aktuell eine komplette mesokolische Exzision (CME) empfohlen, da hierdurch die Anzahl der entfernten Lymphknoten erhöht wird und diese in der Kolonkarzinomchirurgie mit der Prognose korreliert (7). In aktuellen Studien wird reevaluiert, ob die CME trotz erhöhten intraoperativen Risiko der konventionellen Kolektomie überlegen ist (38, 39). Die R0-Resektion bezeichnet eine Exzision, bei der kein Tumorgewebe an den Resektionsrand heranreicht, andernfalls handelt es sich um eine R1-Resektion. Auch wenn eine R0-Resektion bereits als kurative Resektion gilt, ist das eigentliche Ziel eine „R0-wide“ Resektion, bei welcher der zirkumferentielle Sicherheitsabstand zum Tumor  $\geq 1\text{mm}$  beträgt (7).

Nur bei nicht-invasiven Karzinomen bis zum TNM Stadium T1 ist eine alleinige endoskopische Resektion möglich (40). Metaanalysen haben gezeigt, dass laparoskopische und offene Verfahren aus onkologischer Sicht als gleichwertig anzusehen sind. Vorteile der laparoskopischen Therapie sind geringere postoperative Schmerzen, geringerer perioperativer Blutverlust, eine schnellere Rückkehr der Darmmotilität und ein kürzerer Krankenhausaufenthalt. Die Indikation sollte daher patientenabhängig gestellt werden (41, 42). Für neue

Operationsverfahren, wie das DaVinci-Telesystem, fehlt aktuell ausreichende Evidenz (21).

Das Resektionsausmaß ist abhängig von Tumorlokalisierung sowie Gefäßversorgung des betroffenen Darmsegments. Liegt der Primärtumor im Zökum oder Colon ascendens, handelt es sich um eine Hemikolektomie rechts, bei Karzinomen im Colon transversum um eine Querkolonresektion einschließlich beider Flexuren und bei Lokalisation im Colon descendens oder proximalen Colon Sigmoideum, um eine Hemikolektomie links. Bei Karzinomen des mittleren und distalen Sigmas wird eine radikale Sigmaresektion durchgeführt. Falls das Karzinom im Grenzbereich der Lymphabflussgebiete (z.B. in einer Kolonflexur) liegt, muss eine erweiterte Hemikolektomie oder subtotale Kolektomie mit radikaler Lymphadenektomie durchgeführt werden.

Bei lokal inoperablen Karzinomen können limitierte Resektionsverfahren bzw. Bypass-Verfahren angewandt werden (43). Resektable Leber- und Lungenmetastasen können mit kurativer Zielsetzung chirurgisch entfernt werden, bei nicht resektablen Lebermetastasen können lokalablativ Verfahren, wie die Radiofrequenzablation (RFA), angewandt werden. Große Beobachtungsstudien konnten zeigen, dass nach vollständiger chirurgischer Entfernung (R0-Resektion) von Lebermetastasen das 5-Jahres-Überleben bei 20-45% liegt (21, 44).

### **1.7.2 Systemische Therapie**

Laut aktuellen Leitlinien sollte nach R0-resezierten Kolonkarzinomen im UICC-Stadium III eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, da sich in zahlreichen randomisierten Studien ein signifikanter Überlebensvorteil für diese Patientengruppe zeigte (7).

Bei kurativ operierten Karzinomen im UICC-Stadium II kann ebenfalls eine adjuvante Therapie erfolgen, sollte aber vom Mikrosatellitenstatus des Tumors sowie weiteren Risikofaktoren abhängig gemacht werden (z.B. T4-Stadium der TNM-Klassifikation, Tumorperforation oder - Okklusion, Notfalloperationen oder weniger als 12 untersuchten Lymphknoten). Aufgrund mangelnder prospektiver Datenlage zum Zusammenhang der genannten Risikocharakteristika und dem Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie sollte die Indikation streng gestellt werden.

Wenn eine Chemotherapie geplant ist, wird diese möglichst zeitnah postoperativ eingeleitet. Standard bei UICC-Stadium II ist eine Monotherapie mit Fluoropyrimidinen, Im UICC-Stadium III erfolgt eine kombinierte Oxaliplatin-basierte Therapie im FOLFOX (5-Fluorouracil + Folinsäure + Oxaliplatin) oder CAPOX/XELOX (Capecitabin + Oxaliplatin) Schema, wodurch die Mortalität um bis zu 20% gesenkt werden kann. Die palliative Therapie bei bereits oligometastasierten Kolonkarzinomen basiert auf partizipativer Entscheidungsfindung unter Berücksichtigung des Patientenwillens sowie dem Allgemeinzustand des Patienten und sollte im Rahmen einer Tumorkonferenz interdisziplinär festgelegt werden. Neben der bereits erwähnten chirurgischen Intervention mit dem Ziel der maximalen Tumor- bzw. Metastasenresektion, stehen basierend auf molekularbiologischer Tumordiagnostik verschiedenste systemische Therapieregime in Form von Chemo- oder Immuntherapie zur Auswahl. Bei reduziertem Allgemeinzustand des Patienten steht eine supportive Therapie im Vordergrund (7, 20, 21, 44).

## **1.8 Histomorphologische Parameter und Tumorinvasionsfront**

Morphologische Eigenschaften des KRK und deren prognostische Relevanz sind aktueller Gegenstand der Forschung und von zunehmender klinischer Bedeutung. Die bekanntesten sind das Tumor Budding, die Tumor Border Configuration (TBC), Poorly Differentiated Clusters (PDC) und die Tumor-Stroma Ratio (TSR) (28, 45-47).

Tumor Budding liegt vor, wenn isolierte Tumorzellen oder Zellcluster von bis zu 5 Krebszellen (japanische Publikationen definieren die Obergrenze bei 4 Zellen) sich von neoplastischen Drüsen abgelöst haben und in der Tumorinvasionsfront (Übergang von Normalgewebe zum Karzinom) liegen. Diese Tumorknospen (sog. tumor buds) weisen meist stammzellähnliche Eigenschaften auf, weshalb man von einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) der Zellen ausgeht. Dies bedeutet, dass Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften übergehen und Tumor Budding somit vermutlich die morphologische Manifestation der EMT ist. In Grundlagenarbeiten und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Tumor Budding und besonders dessen Ausmaß ein bedeutender unabhängiger prognostischer Marker ist und mit dem Auftreten von

Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie einer verkürzten krebsspezifischen Überlebenszeit einhergeht (28, 48-51). Das diskohäsive Wachstum dieser Tumorknospen scheint der erste Schritt und somit ein früher Hinweis einer Metastasierung zu sein (52).

Nach der Zusammenfassung der „International Tumor Budding Consensus Conference“ (ITBCC) von Lugli et. al (2016) kann das Ausmaß anhand der vorliegenden tumor buds pro  $0.785 \text{ mm}^2$  in drei Gruppen unterteilt werden:

- 4 buds= low budding (Bd1)
- 5-9 buds= intermediate budding (Bd2)
- 10 or more buds= high budding (Bd3)

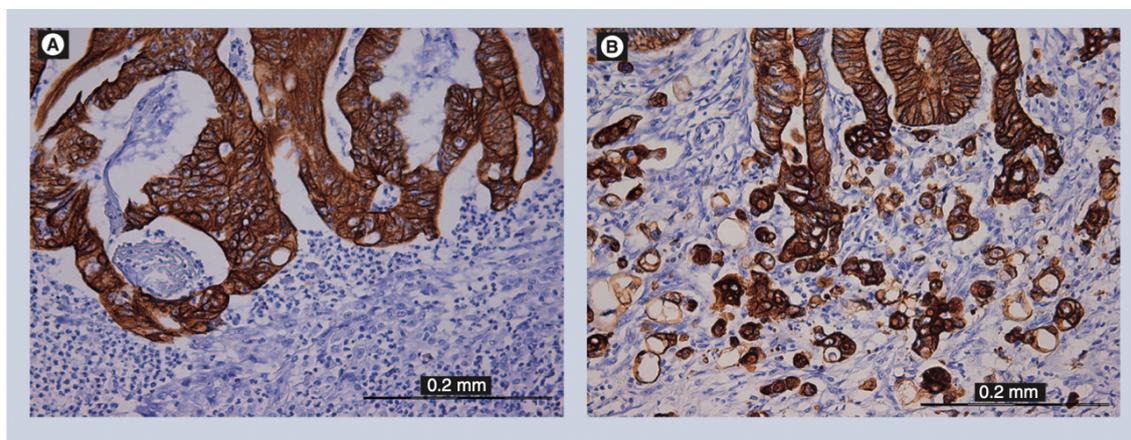


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung (pan cytokeratin) eines Kolonkarzinompräparats zur Evaluierung des Tumor Buddings. Kein Hinweis für Tumor Budding (Bild A) versus ausgeprägten Befund von Tumor Budding (Bild B)

Quelle: Märkl B, Arnholdt HM. Prognostic significance of tumor budding in gastrointestinal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(10):1521-33.

Auch Poorly Differentiated Clusters (definiert als kleine Gruppen von  $\geq 5$  Tumorzellen ohne glanduläre Differenzierung) bedingen weitere prognostisch ungünstige histopathologische Eigenschaften und ein schlechteres klinisches Outcome (47, 53).

Die Tumor Border Configuration beschreibt, dass eine irreguläre, infiltrierende Tumordinvasionsfront im Gegensatz zu einem klar begrenzten, expansiv-verdrängenden Tumorrund auf einen aggressiven Verlauf hinweist und mit einer erhöhten Neigung zur Metastasierung einhergeht (46).

Bei der TSR hingegen wird der Anteil an Stroma im Verhältnis zum Anteil entarteter Zellen gemessen. Hierbei kann zwischen „stroma-high“ (>50% Stroma) und „stroma-low“ ( $\leq 50\%$ ) Karzinomen unterschieden werden, wobei ein hoher Stromaanteil einen negativen prognostischen Faktor darstellt (45).

Trotz der einzeln nachgewiesenen prognostischen Relevanz der jeweiligen Marker sind diese - mit Ausnahme des Tumor Buddings - aufgrund uneinheitlicher Definitionen oder unzureichender Gesamtdatenlage noch nicht fest im klinischen Alltag etabliert. Das therapeutische Vorgehen sowie die Prognose des Kolonkarzinoms beruhen primär weiterhin auf der TNM-Klassifikation (31).

Im Rahmen der histopathologischen Routinediagnostik kolorektaler Karzinome fanden sich im eigenen Vorgehen Areale der Tumorinvasionsfront, welche keine Stromareaktion zu angrenzenden Adipozyten zeigten. Zudem wurde ein gehäuftes Auftreten zusammen mit prognostisch ungünstigen histomorphologischen Eigenschaften beobachtet und daher die These aufgestellt, dass dieses spezifische Merkmal Einfluss auf die Prognose haben könnte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zielsetzung**

Basierend auf Vorarbeiten aus dem Institut für Pathologie und Molekulare Diagnostik der Universitätsklinik Augsburg und der histomorphologischen Beurteilung von Adenokarzinomen des Kolons im klinischen Alltag, wurde SARIFA (Stroma AReaktive Ivasion Front Areas) definiert. Anschließend wurde die Hypothese aufgestellt, dass SARIFA-positive Kolonkarzinome häufiger mit aggressiven Malignitätskriterien (z.B. Gefäßinfiltration, Lymphknotenmetastasen, fortgeschrittenes T-Stadium) sowie einer schlechteren Gesamtprognose einhergehen und SARIFA einen unabhängigen prognostischen Marker für Kolonkarzinome darstellt.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist, diese Hypothese an einem geeigneten Patientenkollektiven retrospektiv zu analysieren.

### **2.2 Patientenkollektiv**

Es konnten 196 Patienten, die an lokal fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Kolons zwischen Januar 2002 und Dezember 2011 am Universitätsklinikum Augsburg operativ behandelt wurden, für die vorliegende Studie herangezogen werden. Einschlusskriterien waren ein Primärtumor, welcher durch histologische Untersuchung als pT3/4 nach TNM klassifiziert wurde, die Abwesenheit von Fernmetastasen (M0), sowie ein tumorfreier operativer Resektionsrand (R0). Die Patienten wurden unabhängig von ihrem Lymphknotenstatus (N+/-) inkludiert und die postoperative Überlebenszeit betrug mindestens drei Monate. Ausschlusskriterien waren sowohl Karzinome des Rektums, als auch eine präoperative Chemo- oder Radiotherapie. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Karzinome des Kolons untersucht, da es durch die häufig angewandte präoperative Strahlentherapie bei rektalen Karzinomen zu einer starken Gewebeveränderung und folglich Veränderung der histologischen Beurteilung kommt. Zur Einteilung der Tumorage in rechts- bzw. linksseitig wurde der Cannon-Böhm-Punkt als anatomische Grenze gewählt. Das Ausmaß des Tumor Buddings wurde anhand der Kriterien der ITBCC bestimmt.

Grundlegende klinisch-pathologische Patienteninformationen (Geschlecht, Alter, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Tumorgraduierung) sowie Follow-up-Daten wurden dem Tumorregister des Universitätsklinikums Augsburg entnommen und zusätzlich durch Daten aus den Patientenakten komplettiert. Das Studienprotokoll wurde durch das interne Review Board des Universitätsklinikums Augsburg begutachtet und befürwortet (5.5.2020, BKF 2017-12).

### **2.3 Histologisches Vorgehen**

Nach operativer Entfernung des Primärtumors wurde das Gewebe zum Erhalt des ursprünglichen Zustandes mittels Formalin für mindestens 12 Stunden chemisch fixiert. Das Formalin bestand aus 4% Formaldehyd in isoton gepufferter Kochsalzlösung. Anschließend folgte die Einbettung in flüssiges Paraffin, welches nach der Aushärtung in 3µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträgern fixiert wurde. Um diese färben zu können, musste das Paraffin wieder gelöst und das Gewebe mit Alkohol hydriert werden. Die in dieser Studie angewandte Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist der histopathologische Standard im klinischen Alltag. Dabei stellen sich azidophile Strukturen, wie das Zytoplasma oder Kollagenfasern rot und basophile Strukturen, wie der Zellkern blau dar.

### **2.4 Definition und Beurteilungskriterien von SARIFA**

SARIFA wird definiert als ein Areal der Tumorinvasionsfront, bestehend aus einer Tumordrüse oder einem Zellcluster von mindestens 5 Zellen, das in direktem Kontakt zu Adipozyten ohne separierende Stromareaktion (Fibroblastenproliferation, Kollagenbildung oder Histozytenreaktion) steht.

Anhand dieser Definition wurden die untersuchten Tumoren in SARIFA-positiv bzw. SARIFA-negativ eingeteilt. Selbst wenn nur ein SARIFA, also eine Tumordrüse in direktem Kontakt zu Adipozyten vorlag, wurde der Tumor als SARIFA-positiv klassifiziert.

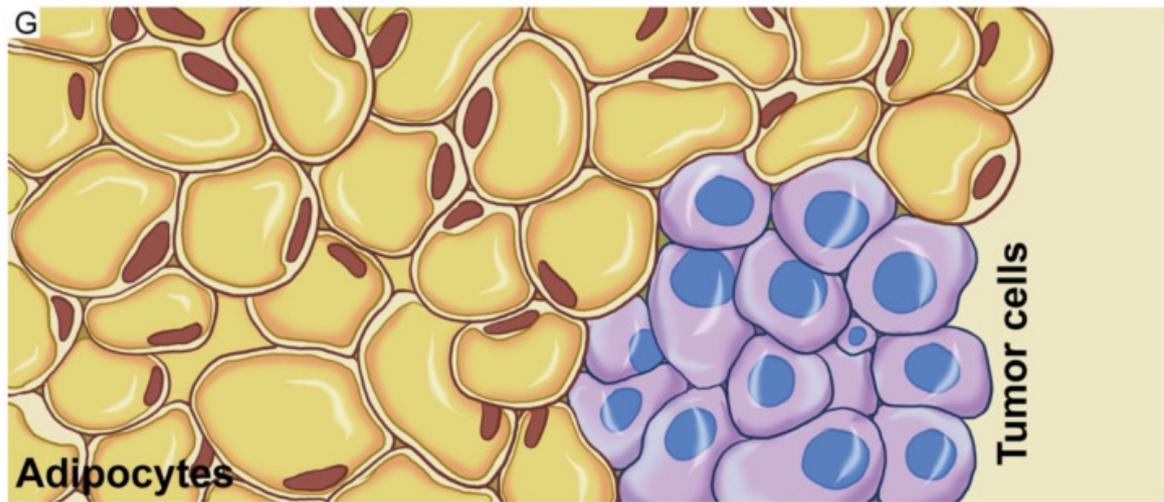


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines SARIFA Areals. Die Tumorzellen stehen in direktem Kontakt zu Adipozyten, ohne eine separierende Stromareaktion zu zeigen.

Aus: Martin B. et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)-A New Easily to Determine Biomarker in Colon Cancer-Results of a Retrospective Study. *Cancers (Basel)*. 2021

Alle Gewebeschnitte wurden unabhängig durch zwei Pathologen des Instituts für Pathologie und Molekulare Diagnostik der Universitätsklinik Augsburg beurteilt, ohne Einsicht in die Ergebnisse des jeweils anderen Pathologen oder den klinischen Verlauf des Patienten zu haben. Exemplarisch für jeden Patienten wurde ein Paraffinschnitt mit HE-Färbung des Primärtumors ausgewählt und unter einem herkömmlichen Lichtmikroskop untersucht. SARIFA wurde i.d.R. im Bereich der Invasionsfront untersucht, lediglich in wenigen Fällen trat SARIFA in der Submukosa auf.

Die Ergebnisse wurden nach Abschluss der Begutachtung abgeglichen, im Falle einer Diskrepanz zwischen den Pathologen wurden die Fälle gemeinsam durch ein Doppelkopfmikroskop neu geprüft und ein Konsensus festgelegt. Dies war in 7 der 196 Fällen notwendig (3.5%).

Zur genauen Bemessung des Zeitaufwandes zur Erhebung des SARIFA Status wurden 40 Objektträger nach Abschluss der initialen Begutachtung erneut bewertet und die Dauer gemessen.

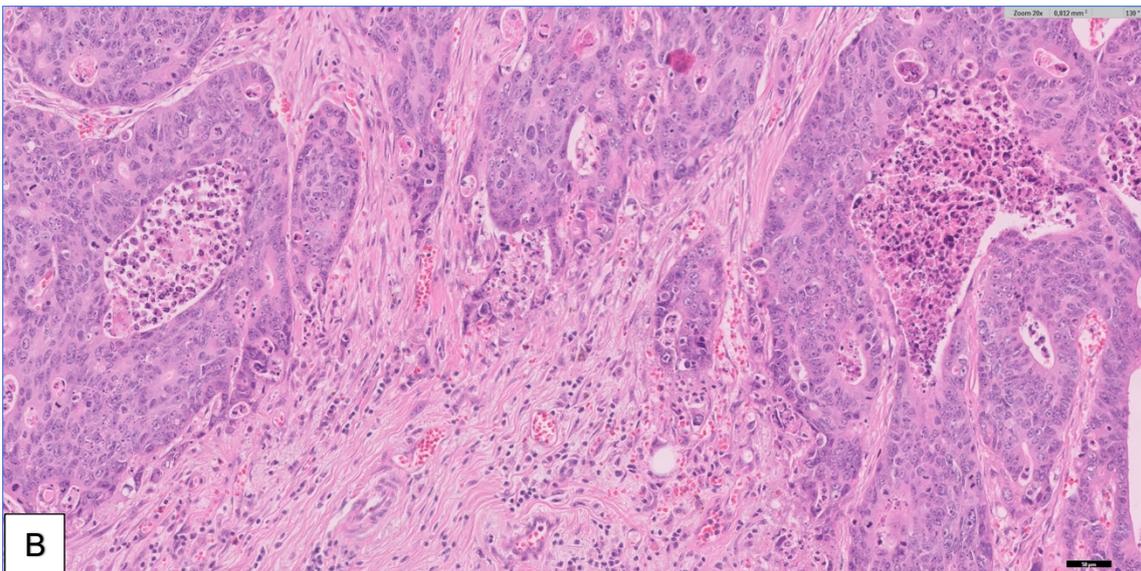
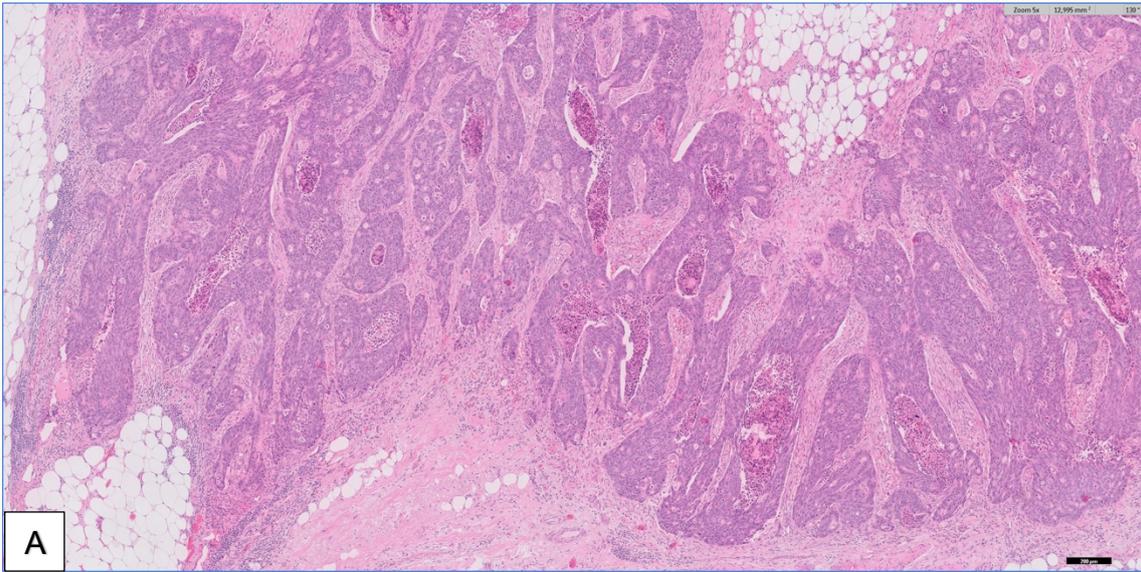


Abbildung 7: HE-Schnitte SARIFA-negativer Karzinome (A: Skalierung 200  $\mu\text{m}$ ; B: Skalierung 50  $\mu\text{m}$ )

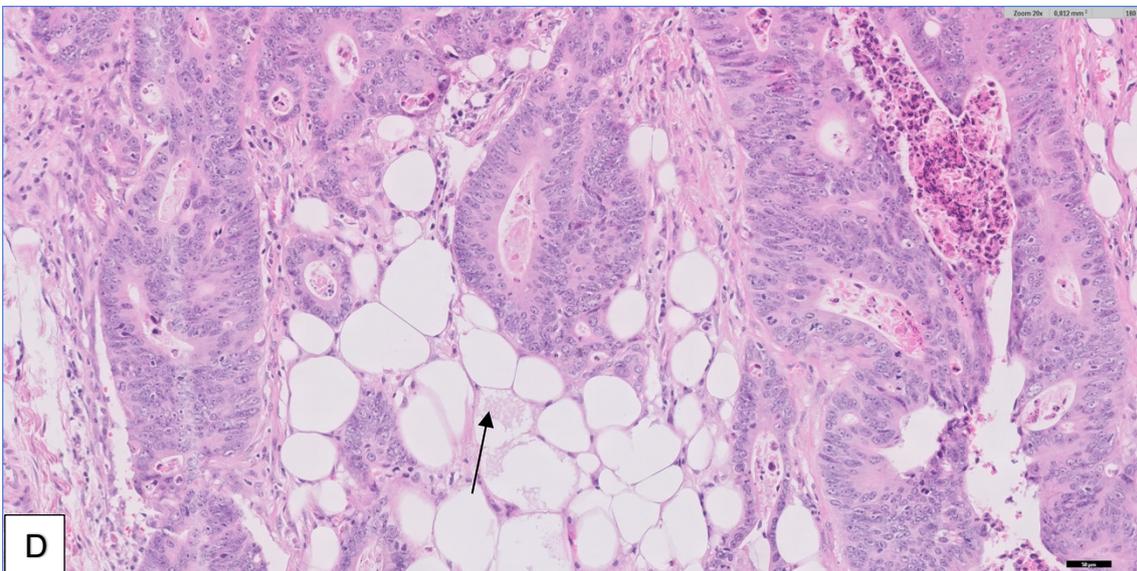
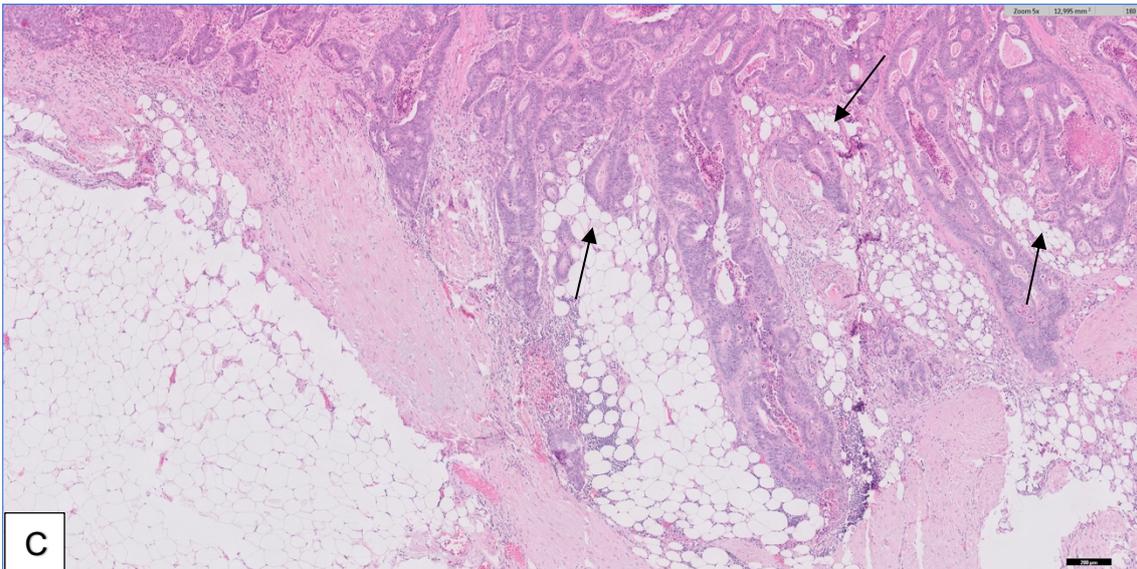


Abbildung 8: HE-Schnitte SARIFA-positiver Karzinome. Pfeile kennzeichnen Fettzellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumorgewebe liegen. (C: Skalierung 200  $\mu\text{m}$ ; D: Skalierung 50  $\mu\text{m}$ )

## 2.5 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programmes Statistical Package for the Social Sciences (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Der Vergleich kategorialer Variablen erfolgte mittels des Chi-Quadrat- oder Fisher-Tests, stetige und ordinal skalierte Variablen zweier Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test gegenübergestellt. Um die Interraterreliabilität zu beurteilen, wurden Kappa-Statistiken ( $\kappa$ ) berechnet (<0.2 mangelhafte, 0.21-0.40 geringe, 0.40-0.60 moderate, 0.61-0.80 gute und > 0.80 sehr gute Übereinstimmung) (54). Mittels log-Rank Test wurden Kaplan-Meier-Schätzer verglichen, ein multivariates Cox- Regressionsmodell wurde angewendet, um die Unabhängigkeit univariater Risikofaktoren zu beurteilen. Bei allen Berechnungen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p-Wert <0,05) als Signifikanzniveau festgelegt, mittels Bonferroni Holm Methode wurden die p-Werte für multiple Testungen korrigiert (55).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinisch-pathologische Daten

Insgesamt konnten 196 Patienten in die Studie eingeschlossen werden, 58% davon waren Männer. Zum Zeitpunkt der Diagnose betrug das mittlere Erkrankungsalter des Studienkollektivs  $70,1 \pm 11,3$  Jahre und der mittlere Nachbeobachtungszeitraum  $5,3 \pm 3,5$  Jahre (Median: 6,4 Jahre). Innerhalb der Follow-up Periode sind 81 Patienten (41%) verstorben. Es wurden 31 (16%) der Tumore als SARIFA-positiv und 164 (84%) als SARIFA-negativ klassifiziert.

**Tabelle 1: Klinisch-pathologische Daten**

| Variable   | Gesamtkollektiv<br>n = 196 |     | SARIFA-<br>positive<br>(n=31) |    | SARIFA-<br>negative<br>(n=165) |     | p-Wert       |
|--|----------------------------|-----|-------------------------------|----|--------------------------------|-----|--------------|
| <b>Alter (Jahre), Mittel <math>\pm</math> SD</b>         | 70.1 $\pm$ 11.3            |     | 68.1 $\pm$ 7.9                |    | 70.3 $\pm$ 12.0                |     | 0.129        |
| <b>Follow-up (Jahre), Mittel <math>\pm</math> SD</b>     | 5.3 $\pm$ 3.5              |     | 5.4 $\pm$ 3.8                 |    | 5.4 $\pm$ 3.4                  |     | 0.581        |
| <b>Entfernte Lymphknoten, Mittel <math>\pm</math> SD</b> | 24 $\pm$ 13                |     | 27 $\pm$ 17                   |    | 23 $\pm$ 13                    |     | 0.254        |
| <b>positive Lymphknoten, Mittel <math>\pm</math> SD</b>  | 1.2 $\pm$ 2.3              |     | 2.6 $\pm$ 4.0                 |    | 0.9 $\pm$ 1.7                  |     | <b>0.002</b> |
| <b>Geschlecht</b>  |                            |     |                               |    |                                |     | 0.843        |
|  | weiblich                   | 83  | 42%                           | 14 | 45%                            | 69  | 42%          |
|  | männlich                   | 113 | 58%                           | 17 | 55%                            | 96  | 58%          |
| <b>T-Status</b>  |                            |     |                               |    |                                |     | 0.229        |
|  | pT3                        | 172 | 88%                           | 15 | 81%                            | 147 | 89%          |
|  | pT4                        | 24  | 12%                           | 6  | 19%                            | 18  | 11%          |
| <b>N-Status</b>  |                            |     |                               |    |                                |     | <b>0.009</b> |
|  | negativ                    | 119 | 61%                           | 12 | 39%                            | 107 | 65%          |
|  | positiv                    | 77  | 39%                           | 19 | 61%                            | 58  | 35%          |
| <b>Grading</b>   |                            |     |                               |    |                                |     | <b>0.020</b> |
|  | low grade                  | 137 | 70%                           | 16 | 52%                            | 121 | 73%          |
|  | high grade                 | 59  | 30%                           | 15 | 48%                            | 44  | 27%          |
| <b>Gefäßinvasion</b>                                     |                            |     |                               |    |                                |     | 0.098        |
|  | negativ                    | 176 | 90%                           | 25 | 81%                            | 151 | 91%          |
|  | positiv                    | 20  | 10%                           | 6  | 19%                            | 14  | 9%           |
| <b>Lymphgefäßinvasion</b>                                |                            |     |                               |    |                                |     | 0.602        |
|  | negative                   | 164 | 84%                           | 25 | 81%                            | 139 | 84%          |
|  | positive                   | 32  | 16%                           | 6  | 19%                            | 26  | 16%          |
| <b>Tumor Budding</b>                                     |                            |     |                               |    |                                |     | <b>0,004</b> |
|  | Bd1                        | 161 | 82%                           | 20 | 65%                            | 141 | 86%          |
|  | Bd2                        | 23  | 12%                           | 6  | 19%                            | 17  | 10%          |
|  | Bd3                        | 12  | 6%                            | 5  | 16%                            | 7   | 4%           |
| <b>Lage</b>  |                            |     |                               |    |                                |     | 0,841        |

|   |              |     |     |    |     |     |              |
|---|--------------|-----|-----|----|-----|-----|--------------|
|   | rechtsseitig | 120 | 61% | 20 | 65% | 100 | 61%          |
|   | linksseitig  | 76  | 39% | 11 | 36% | 65  | 39%          |
| <b>MSS</b>                                  |              |     |     |    |     |     | 0.773        |
|   | stabil       | 172 | 88% | 28 | 90% | 144 | 87%          |
|   | instabil     | 24  | 12% | 3  | 10% | 21  | 13%          |
| <b>Fernmetastasen</b>                       |              |     |     |    |     |     | 0.624        |
|   | nein         | 158 | 81% | 24 | 77% | 134 | 81%          |
|   | ja           | 38  | 19% | 7  | 23% | 31  | 19%          |
| <b>Verstorben</b>                           |              |     |     |    |     |     | 0.113        |
|   | nein         | 115 | 59% | 14 | 45% | 101 | 61%          |
|   | ja           | 81  | 41% | 17 | 55% | 64  | 39%          |
| <b>Krankheitsspezifische Überlebenszeit</b> |              |     |     |    |     |     | <b>0.014</b> |
|   | Überleben    | 173 | 88% | 23 | 74% | 150 | 91%          |
|   | Verstorben   | 23  | 12% | 8  | 26% | 15  | 9%           |
| <b>Fünf-Jahres-Überleben (n=152)</b>        |              |     |     |    |     |     | 0.272        |
|   | Überleben    | 92  | 60% | 13 | 50% | 79  | 63%          |
|   | Verstorben   | 60  | 40% | 13 | 50% | 47  | 37%          |

Legende: Die p-Werte zeigen Unterschied zwischen Stroma reaktiven und areaktiven Tumoren (SARIFA).  
MSI= Microsatelliteninstabiler Status; MSS= Microsatellitenstabiler Status; SD= Standardabweichung (standard deviation)

### 3.2 Erhebungsdauer des SARIFA-Status und Interobserver-Variabilität

Der minimale Zeitaufwand der 40 zufällig ausgewählten und zur Bestimmung der Untersuchungsgeschwindigkeit erneut begutachteten Objektträger betrug 13 Sekunden, das Maximum 40 Sekunden. Die mittlere Erhebungsdauer lag bei  $21 \pm 6$  Sekunden.

Bei 4% der zu beurteilenden Fälle gab es bezüglich des SARIFA-Status eine Diskrepanz zwischen den Untersuchern. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Pathologen lag bei  $\kappa=0.87$  und war somit nach Cohen (1960) als sehr gut einzustufen.

### 3.3 Charakteristika SARIFA-positiver Adenokarzinome

SARIFA-positive Tumore wiesen vermehrt prognostisch ungünstige histopathologische Eigenschaften auf (Tabelle 1). Hierzu zählten sowohl das gehäufte Auftreten von Lymphknotenmetastasen als auch eine höhere Gesamtzahl dieser ( $p=0.009$  /  $p=0.002$ ). Es waren 61% der LK-positiven Tumoren auch SARIFA-positiv. Zudem ergab der Vergleich des

histopathologischen Differenzierungsgrades (Grading) zwischen SARIFA-positiven und -negativen Tumoren einen signifikanten Unterschied hinsichtlich einer schlechteren Graduierung SARIFA-positiver Tumore ( $p=0.02$ ). Von den als „high grade“ klassifizierten Tumoren waren 48% SARIFA-positiv und 27% SARIFA-negativ. SARIFA-positive Tumore waren zudem mit dem Vorliegen von Tumor Budding assoziiert ( $p=0.004$ ).

### 3.4 Univariate prognostische Analyse

Patienten mit SARIFA-positiven Tumoren hatten im Vergleich zu Patienten mit SARIFA-negativen Tumoren eine signifikant kürzere krankheitsspezifische Überlebenszeit ( $p=0.008$ , Abbildung 8). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes sind 26% der Patienten mit SARIFA-positiven und 9% der Patienten mit SARIFA-negativen Tumoren an den Folgen des Kolonkarzinoms verstorben. Bei der Gesamt-Überlebenszeit (OS) zeichnete sich ein Trend zu einer kürzeren Überlebenszeit bei Patienten mit SARIFA-positiven Tumoren ab ( $p=0.100$ , Abbildung 9).

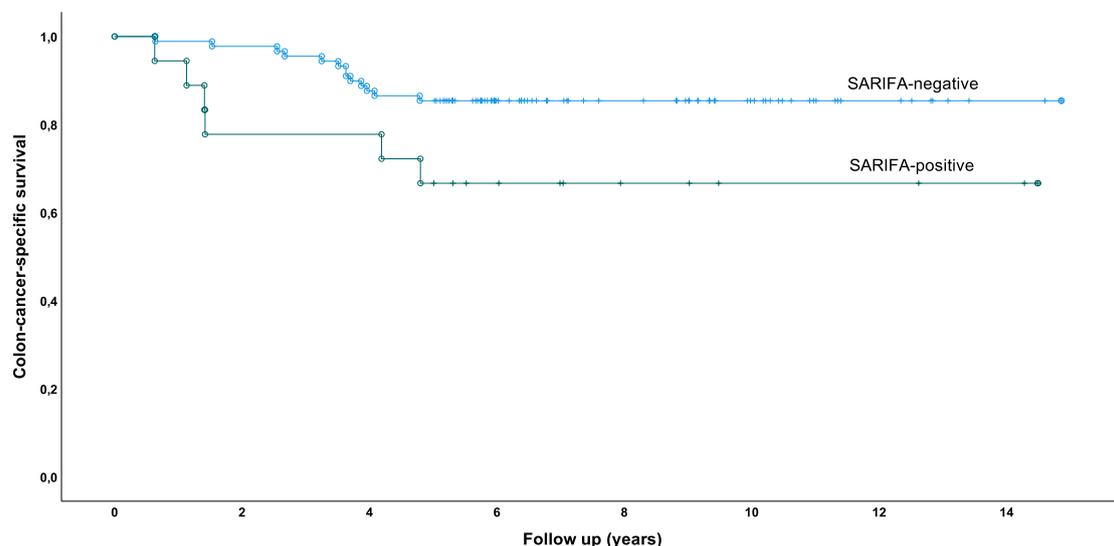


Abbildung 8: Kaplan-Meier Kurven zum Vergleich der krankheitsspezifischen Überlebenszeit (colon-cancer-specific survival) in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

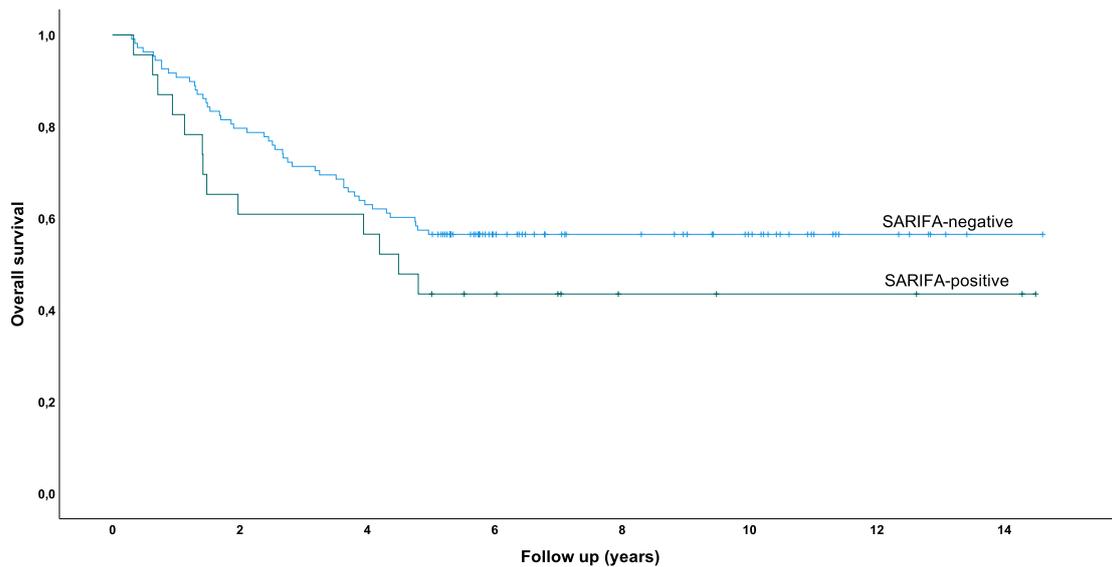


Abbildung 9: Kaplan-Meier Kurven zum Vergleich der Gesamtüberlebenszeit (overall survival) in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

Ein direkter Zusammenhang zwischen SARIFA-positiven Tumoren und dem Auftreten von Fernmetastasen konnte nicht nachgewiesen werden ( $p=0.650$ , Abbildung 9)

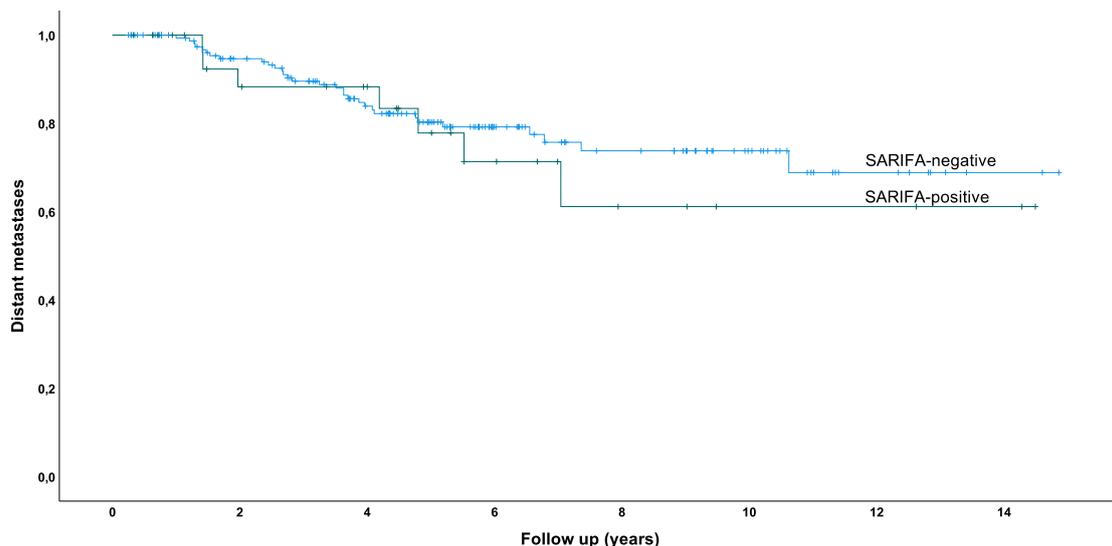


Abbildung 10: Kaplan- Meier Kurve zum Vergleich des Auftretens von Fernmetastasen in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

### 3.5 Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Mittels einer Cox-Regressionsanalyse der krankheitsspezifischen Überlebenszeit wurden die Unabhängigkeit der Variablen Patientenalter, T-Stadium, N-Stadium (positiv vs. negativ), Grading (low vs. high), Gefäß (V)- und Lymphgefäßinfiltration (L), Tumor Budding, Mikrosatellitenstabilität (MSS), Tumorage (rechts- versus linksseitig) und SARIFA-Status geprüft. Die Auswertungen zeigten, dass SARIFA ein unabhängiger prognostischer Indikator für die kolonkrebsspezifische Überlebenszeit ist ( $p=0.012$ ), die Hazard ratio betrug 3.5 (CI 95%: 1.3-9.1;  $n=196$ ). Dahingegen konnte sich SARIFA in diesem Kollektiv nicht als unabhängiger prognostischer Indikator bezüglich der Gesamtüberlebenszeit und dem Auftreten von Fernmetastasen beweisen.

Tabelle 2: Cox-Regressionsanalyse der krankheitsspezifischen Überlebenszeit  
( $n=196$ )

| Variable             | HR  | CI      | p           |
|----------------------|-----|---------|-------------|
| <b>T-status</b>      | 1,4 | 0,4-5,0 | 0,57        |
| <b>N-status</b>      | 1,8 | 0,7-4,6 | 0,26        |
| <b>Age</b>           | 1,1 | 1,0-1,1 | <b>0,02</b> |
| <b>V</b>             | 0,9 | 0,3-3,2 | 0,89        |
| <b>L</b>             | 1,3 | 0,4-4,1 | 0,65        |
| <b>Grading</b>       | 0,9 | 0,4-2,2 | 0,82        |
| <b>Tumor Budding</b> | 0,9 | 0,5-1,9 | 0,88        |
| <b>Location</b>      | 1,9 | 0,8-4,5 | 0,14        |
| <b>MSS</b>           | 0,3 | 0,0-2,6 | 0,29        |
| <b>SARIFA</b>        | 3,5 | 1,3-9,1 | <b>0,01</b> |

## 4 Diskussion

Das Kolonkarzinom ist eine heterogene Erkrankung. Die Prognoseabschätzung des Patienten beruht primär auf der TNM-Klassifikation, obwohl Patienten mit gleichem TNM-Stadium unterschiedlich auf Therapien ansprechen und Langzeitprognosen stark variieren können. Demzufolge hat die TNM-Klassifikation als prognostischer Goldstandard über die letzten Jahre viel Kritik erfahren (30, 31, 56-58). Um eine optimale Therapieplanung zu erreichen, ist daher die Identifizierung weiterer Risikofaktoren notwendig.

Die Tumorinvasionsfront scheint das Tumor-Host-Interface, d.h. die Interaktion zwischen malignen Zellen und Immunsystem, abzubilden (46). Daher wird histomorphologischen Parametern mit besonderem Augenmerk auf die Tumorinvasionsfront vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Mit Ausnahme des Tumor Buddings konnte sich, trotz vielsprechender Einzelresultate, noch kein histomorphologischer Parameter in der Standarddiagnostik durchsetzen (59).

In der vorliegenden Studie wurde ein neuer Biomarker - SARIFA - untersucht und dessen prognostische Relevanz bei Adenokarzinomen des Kolons evaluiert. Hohe Interobserver-Reliabilität, geringer Kosten- und Zeitaufwand sowie die signifikante prognostische Aussagekraft, lassen SARIFA als vielversprechenden histoprognostischen Indikator für Kolonkarzinome erscheinen.

Jeweils ein Paraffinschnitt mit HE-Färbung des Tumors wurde exemplarisch bei allen 196 teilnehmenden Patienten untersucht. Bezogen auf das Gesamtkollektiv waren 16% SARIFA-positiv. Da es sich um eine Pilotstudie handelt waren Fallzahlen und Schnittpräparate noch limitiert. Die Patientenzahlen sind vergleichbar mit klinischen Untersuchungen anderer histopathologischer Parameter bei Kolonkarzinomen (60-63). In prospektiven Folgestudien sollte nun untersucht werden, ob SARIFA als histoprognostischer Parameter in die Standarddiagnostik bei Kolonkarzinomen aufgenommen werden sollte.

#### 4.1 SARIFA als neuer Biomarker des Kolonkarzinoms

Voraussetzung für einen anwendbaren Biomarker ist eine hohe Interobserver-Reliabilität. Aufgrund der einfachen und klaren Definition von SARIFA (ein Areal der Tumorinvasionsfront, bestehend aus einer Tumordrüse oder einem Zellcluster ( $\geq 5$  Zellen), das in direktem Kontakt zu Adipozyten ohne separierendes Stroma steht), konnte eine außerordentlich hohe Übereinstimmung ( $\kappa=0.87$ ) zwischen den Untersuchern erzielt werden. Andere bereits umfangreich untersuchte histomorphologische Marker wie das „Tumor Budding“ oder die „Tumor Border Configuration“ (nach Jass) sind aufgrund uneinheitlicher oder komplizierter Definitionskriterien mit dem Problem einer hohen Interobserver-Variabilität belastet (51, 63-66).

In Bezug auf die Interobserver-Reliabilität konnten sowohl die „Tumor-Stroma Ratio“ als auch der „Poorly Differentiated Cluster grade“ ähnlich gute Ergebnisse wie SARIFA erzielen (45, 47). Anzumerken ist, dass es trotz der sehr guten Übereinstimmung bei SARIFA selten auch ganz vereinzelte, schwer einzuordnende Fälle gab.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für einen nützlichen Biomarker ist die Umsetzbarkeit. Hierbei sollten besonders finanzieller, technischer sowie zeitlicher Aufwand im Vordergrund stehen. Um den SARIFA Status eines Tumors zu bestimmen, konnte ein herkömmlicher Hämatoxylin-Eosin gefärbter Paraffinschnitt genutzt werden. Daher entstanden keine zusätzlichen Kosten außerhalb der Routinediagnostik.

HE-Färbungen sind auch bei den meisten anderen histomorphologischen Biomarkern Standard, es gibt aber Limitationen. Lugli et al. vermerkten in der Zusammenfassung der International Tumor Budding Consensus Conference von 2016, dass peritumorale Entzündungsinfiltrate zur Verschleierung des Tumor Buddings führen können und zudem schwer von reaktiven Stromazellen abzugrenzen sind. Folglich sollten in unklaren Fällen unterstützend immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt werden (28). Ähnlich beschrieben van Pelt et al. (2018) in ihrer Arbeit zur Tumor-Stroma-Ratio, dass die Qualität der HE-Färbung ausschlaggebend ist, um Stromazellen von der glatten Muskulatur der Darmwand zu unterscheiden. Außerdem kann die Erhebung durch nekrotische Areale im Tumor erschwert werden (45).

Der Vorteil von SARIFA gegenüber anderen Parametern ist, dass keine Quantifizierung erfolgen muss. Einzig die Tatsache, ob Tumorzellen an einer Stelle in direktem Kontakt zu Adipozyten stehen, ist von Bedeutung. Bei SARIFA-positiven Tumoren lagen in der vorliegenden Studie meist größere SARIFA Areale vor als definitionsgemäß gefordert, wodurch eine eindeutige Beurteilung möglich war.

Zum Zeitpunkt der Studie war noch unklar, ob die Beurteilung eines Tumorschnittes ausreichend ist, um den SARIFA Status zu bestimmen oder alle Schnitte begutachtet werden sollten. Martin et. al (2021) haben diese Fragestellung an einem weiteren Kollektiv mit 49 Fällen lymphknotenmetastasierter Kolonkarzinome untersucht. In diesem Kollektiv lokal fortgeschrittenere Karzinome wurden 76% aller Fälle (n=29) als SARIFA-positiv gewertet. In 72% dieser 29 Fälle war das morphologische Phänomen in mehr als der Hälfte nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass der SARIFA-positive Status mit der Anzahl der untersuchten Schnitte steigt (67).

Ein innovativer Ansatz für die Auswertung von HE-gefärbten Tumorschnitten ist die Anwendung künstlicher Intelligenz. Darüber berichteten Kather et al. (2019) in einer multizentrischen Studie über Deep Learning (DL) zur Prognoseabschätzung kolorektaler Karzinome. DL ist eine spezielle Methode der Informationsverarbeitung und ein Teilbereich des Machine Learnings. Es werden neuronale Netzwerke genutzt, um große Datensätze zu analysieren. Die Autoren konnten anhand ihrer Datenauswertung zeigen, dass Convolutional Neuronal Networks (CNNs) in der Lage sind, anhand von morphologischen Eigenschaften histologischer Bilder eine prognostische Aussage zu treffen (68, 69).

Vergleichbar untersuchte auch die Arbeitsgruppe von Wulczyn et al. (2021) den Nutzen von Deep Learning zur Prognosebestimmung kolorektaler Karzinome. Auffallend war, dass das Vorliegen schlecht differenzierter Tumorzellcluster, anliegend an Fettgewebe, relevant für die krankheitsspezifische Überlebenszeit im Stadium II-III war. Dieses sogenannte Tumor-Adipose-Feature (TAF) ähnelt der SARIFA Definition. Die meisten der beispielhaft dargestellten TAF-Tumoren wären auch als SARIFA-positiv klassifiziert worden, einige erfüllten die Kriterien jedoch nicht. Auch diese Arbeit stützt somit die Annahme, dass der Einfluss von

Adipozyten auf die Prognose kolorektaler Karzinome größer ist, als bisher angenommen (70).

Eine weitere, jedoch technisch und finanziell deutlich aufwändigere Methode zur Prognoseabschätzung maligner Erkrankungen sind Genexpressionsanalysen. Diese verfolgen das Ziel der weiteren Subklassifizierung zur Abschätzung von möglichen Therapieresistenzen und der Prognose. Calon et al. beschreiben, dass bei kolorektalen Karzinomen besonders die Expression stammzellähnlicher oder mesenchymaler Gene in Tumorstromazellen von Bedeutung sind, da diese auf einen sehr aggressiven Verlauf hinweisen (71, 72).

In Deutschland werden die Kosten für Genexpressionsprofile bisher nur bei Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen durch die Krankenkassen übernommen (Stand Oktober 2021). Exemplarisch sei hier das Testverfahren, Oncotype DX, aufgeführt. Hier wird anhand der Aktivitätsanalyse mehrerer krebsrelevanter Gene im Tumorgewebe, einen Recurrence Score (RS) berechnet. Von dem errechneten RS wird abhängig gemacht, ob die PatientInnen von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Obwohl der RS in die klinischen Guidelines für die Behandlung von Brustkrebs übernommen wurde, herrscht weiterhin Dissens, ob Genexpressionsanalysen bei deutlich höheren Kosten dem traditionellen Grading mit kombinierter Immunhistochemie überlegen sind (73).

Der Nutzen von Oncotype DX bei kolorektalen Karzinomen liegt hauptsächlich darin zu bestimmen, welcher Patient von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert, welches Therapieregime am effektivsten ist und über welchen Zeitraum es verabreicht werden sollte. Primär bezieht sich die Fragestellung auf Patienten im UICC-Stadium II oder III, da bei diesen Gruppen das klinische Outcome sehr variiert. Drei internationale Arbeitsgruppen haben in ähnlichen Studien untersucht, inwieweit die Empfehlungen zu einer Chemotherapie auf Basis traditionell klinisch-pathologischer Daten durch den von Oncotype DX errechneten RS revidiert werden. Die Ergebnisse aller Studien konnten zeigen, dass ein großer Teil der chemotherapeutischen Empfehlungen geändert wurden und besonders eine Übertherapie vermieden werden konnte (74-76).

Zusammenfassend erfüllt SARIFA besonders durch die hohe Interobserver-Reliabilität wichtige Kriterien für einen nützlichen Biomarker. Durch den geringen

finanziellen Aufwand kann SARIFA weltweit erhoben werden und ist weitgehend unabhängig von der technischen Ausstattung des Labors. Die schnelle Ermittlung des SARIFA Status macht eine Anwendung im klinischen Alltag möglich. Zudem ist eine Vergleichbarkeit mit anderen prognostischen Parametern möglich, da die meisten Daten auf HE-Färbungen und deren Bewertung basieren.

## **4.2 SARIFA Status und dessen prognostische Relevanz**

These dieser Arbeit war, dass ein positiver SARIFA Status von fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Kolons mit aggressiven histopathologischen Malignitätskriterien, wie pT4-Stadium, Lymphknotenmetastasen, Gefäß-/Lymphgefäßinfiltration und high-grade Graduierung einhergeht und ein unabhängiger prognostischer Parameter der krebsspezifischen Überlebenszeit ist.

Die Überlebenszeitanalysen ergaben, dass Patienten mit SARIFA-positiven Tumoren eine signifikant kürzere krankheitsspezifische Überlebenszeit ( $p=0.008$ ) hatten als Patienten mit SARIFA-negativen Tumoren. Die Regressionsanalyse konnte zeigen, dass SARIFA ein unabhängiger prognostischer Indikator für die kolonkrebsspezifische Überlebenszeit ist. Das Hazard Ratio betrug 3.5, somit ist bei positivem SARIFA Status die Wahrscheinlichkeit, auf Grund des Karzinoms zu versterben, 3.5-fach höher als bei einem SARIFA-negativen Status.

Das Ausmaß der Risikostratifizierung, d.h. das statistisch errechnete Risiko, dass die Krankheit fortschreitet bzw. dass der Patient an der Krankheit oder deren Komplikationen verstirbt, ist ein wichtiger Faktor, um Patienten zu selektieren, die von einer ausgedehnten Therapie (z.B. einer adjuvanten Chemotherapie) profitieren. Die Bestimmung des SARIFA Status ermöglicht somit eine weitere Identifikation von Hochrisikogruppen, unabhängig vom TNM-Stadium.

Zudem konnte ein gehäuftes Auftreten von Lymphknotenmetastasen, eine höhere Gesamtzahl an befallenen Lymphknoten und ein höherer histopathologischer Differenzierungsgrad (high-grade) bei SARIFA-positiven Tumoren nachgewiesen werden. In Folgearbeiten sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang dieser bedeutenden Tumoreigenschaften besteht.

Tumor Budding ist bereits durch Metaanalysen als unabhängiger prognostischer Faktor bei kolorektalen Karzinomen bestätigt worden (77). Nachdem 2016 im

Rahmen der „International Tumor Budding Consensus Conference“ ein Konsens zur Auswertung des Tumor Budding definiert wurde, erfolgte die Aufnahme in die S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“. Eine relevante Korrelation zwischen SARIFA und Tumor Budding konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Dies dürfte vor allem in der relativ geringen Fallzahl begründet sein. In einer vorausgegangenen Arbeit konnte die Gruppe Martin et al. zeigen, dass die Bestimmung des Tumor Buddings mit einer hohen Interobserver-Variabilität behaftet ist, was die prognostische Aussagekraft untersucherabhängig deutlich mindern kann (66).

### **4.3 SARIFA: Biologischer Hintergrund und Funktion**

Die Hypothese, dass SARIFA ein Biomarker für die Prognose von Kolonkarzinomen ist, konnte durch die vorliegende Studie bekräftigt werden. Die Frage nach den genauen pathophysiologischen Mechanismen bleibt jedoch offen. Koelzer et al. beschreiben, dass die Invasionsfront kolorektaler Karzinome das Tumor-Host Interface widerspiegelt (51). SARIFA stellt daher den histomorphologischen Ausdruck der Interaktion zwischen Tumor, Mikroenvironment und Immunsystem dar.

Der Fokus bisheriger Studien, die den Einfluss von Fettzellen auf Tumorgewebe untersuchten, lag insbesondere auf der parakrinen Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Adipozyten, welche die Tumorgenese stimulieren (78, 79).

Eine weitere Erklärung für den aggressiven Verlauf von SARIFA-positiven Kolonkarzinomen könnte die Annahme von Wen et al. (2017) sein, dass Adipozyten einen modulierenden Effekt auf den Zellmetabolismus und das damit verbundene Tumorwachstum haben. Hierzu zählt insbesondere die Erkenntnis, dass freie Fettsäuren, sekretiert von Adipozyten, als Energielieferant für maligne Zellen dienen. Auch wenn dieser pathophysiologische Mechanismus logisch erscheint, ist der genaue biologische Hintergrund weitaus komplexer und weiterhin nicht vollständig verstanden (80).

Die Energieversorgung eukaryoter Zellen wird über Zellatmung sichergestellt. Häufigstes Ausgangssubstrat ist dabei Glucose, welche in den Mitochondrien über den Prozess der Oxidation zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut wird. Das währenddessen frei gesetzte Adenosintriphosphat (ATP) wird als Energiequelle für Stoffwechselforgänge genutzt (81). Alternativ dazu kann mittels Beta-Oxidation durch Abbau von Fettsäuren ATP freigesetzt und dabei doppelt so viel ATP gewonnen werden (82).

Wen et al. beschreiben, dass die von Adipozyten sekretierten und durch Tumorzellen aufgenommenen Fettsäuren den Mechanismus der Autophagie und der mitochondrialen Fettsäureoxidation (Fatty Acid Oxidation, FAO) stimulieren. Autophagie bezeichnet einen katabolischen Prozess, bei dem intrazelluläre Bestandteile durch Lysosome abgebaut und anschließend verwertet werden, um bei zellulärem Stress (z.B. im Rahmen einer Chemotherapie) einen Zelluntergang vorzubeugen.

Zudem aktivieren Fettsäuren die Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK), welche wiederum die mitochondriale FAO steigert und die glucoseabhängige Zellatmung reduziert (80, 83).

Dieses mitochondriale Remodeling ermöglicht Kolonkarzinomzellen, Fettsäuren als primäres Substrat zur Energiegewinnung zu nutzen und auch bei Nährstoffmangel und zellulärem Stress das Tumorstadium aufrecht zu erhalten.

#### **4.4 SARIFA als möglicher prognostischer Parameter bei weiteren Karzinomen**

Der Einfluss von Fettgewebe auf das Tumorstadium wird auch bei zahlreichen anderen malignen Erkrankungen untersucht (78, 84-88). Carracedo et al. haben bereits 2013 die mitochondriale Plastizität maligner Zellen in Bezug auf die Fettsäureoxidation untersucht und konnten deren Abhängigkeit vom Tumormikroenvironment nachweisen. Zur Aktivierung der Fettsäureoxidation ist eine direkte Interaktion zwischen Krebszellen und Adipozyten notwendig (82).

Fortführende Untersuchungen, ob SARIFA bei weiteren gastrointestinalen bzw. universell bei soliden Tumoren einsetzbar ist, sind daher von großem Interesse. Grosser et al. konnten bereits einen Zusammenhang zwischen SARIFA Status und der Prognose von Magenkarzinomen demonstrieren (89).

#### **4.5 Inhibierung der Fettsäureoxidation als therapeutischer Ansatz**

Anhand der zuvor beschriebenen pathophysiologischen Anpassungsprozesse können künftig neue therapeutische Ansätze entwickelt werden. Hierzu zählt insbesondere die Inhibition der mitochondrialen Fettsäureoxidation, um diese Form der Energiegewinnung von Tumorzellen zu unterbinden.

Ein Schlüsselenzym, das die FAO kontrolliert, ist Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1A (CPT1A). Xiong et al. (2020) konnten nachweisen, dass CPT1A in Kolonkarzinomzellen, die in direktem Kontakt zu Adipozyten stehen, höher exprimiert ist als in jenen, die keinen Kontakt zu Adipozyten haben. Folglich könnte eine Inhibition der CTPA1A-Expression den stimulierenden Effekt von Adipozyten auf Kolonkarzinomzellen unterbinden (90). Diese These konnte durch aktuelle Studien mehrfach bekräftigt werden (91, 92). Bereits untersuchte (in der Behandlung von onkologischen Erkrankungen jedoch noch nicht zugelassene) CTP1-Inhibitoren sind Perhexiline, Etomoxir und Oxfenicine.

Lin et al. (2021) beschreiben zudem, dass in Oxaliplatin-resistenten Tumorzellen eine höhere CTP1A-Expression nachgewiesen werden konnte als in Oxaliplatin-sensitiven Tumorzellen oder nicht-malignen Kolonepithelzellen. Dies belegt die These, dass CTP1-Inhibitoren die Wirksamkeit einer Oxaliplatin-basierten Chemotherapie optimieren (92).

Die Arbeitsgruppe um Peng et. al (2021) konnte noch einen anderen Aspekt beleuchten: Bei Kolonkarzinomen, die bereits Peritonealmetastasen gebildet haben, ist die CTP1A-Expression vermindert.

Stoffwechselforgänge maligner Zellen basieren führend auf dem Prozess der Glykolyse. Die Konzentration freier Fettsäuren war in dieser Arbeit jedoch genauso hoch wie in Kolonkarzinomzellen ohne peritoneale Metastasierung.

In Fibroblasten, die das Tumorgewebe umgaben - Cancer-associated fibroblasts (CAFs) – basierte die Energiegewinnung dagegen primär auf FAO. Es konnte

somit nachgewiesen werden, dass bei Kolonkarzinomen mit peritonealer Metastasierung die CAFs als Energielieferant durch FAO dienen und folglich Proliferation und Invasion maligner Zellen stimulieren.

Daher wurde bereits in dieser Arbeit die Applikation des CTP1-Inhibitors Etomoxir als möglicher therapeutischer Ansatz untersucht und eine Reduktion des Tumorwachstums sowie der Bildung von intraperitonealen Metastasen *in vivo* bestätigt (93).

In der vorliegenden Studie konnte kein direkter Zusammenhang zwischen einem SARIFA-positiven Status und dem Auftreten von Fernmetastasen nachgewiesen werden. Dies ist überraschend, da gerade das krankheitsspezifische Überleben mit dem SARIFA Status assoziiert ist und Kolonkarzinompatienten fast ausschließlich an den Folgen der metastasierten Erkrankung versterben. Das retrospektive Design mit einer lückenhaften Erhebung des Auftretens von Metastasen könnte hier eine Rolle spielen.

Ein SARIFA-positiver Status könnte somit bereits bei der ersten histologischen Aufarbeitung des Tumorgewebes einen generellen Hinweis geben, ob ein Patient von diesen neuen Therapieansätzen profitieren kann.

#### **4.6 Limitationen**

Die vorliegende Arbeit wurde monozentrisch durchgeführt. Somit kann ein möglicher bias, der auf einer lokalen Gegebenheit beruht nicht ausgeschlossen werden.

Der SARIFA Status kann nur bei Patienten ohne neoadjuvante Radio- und/oder Chemotherapie adäquat bestimmt werden, da diese die Zellmorphologie sowie Tumormikroenvironment beeinflussen und zu atrophischen Veränderung der Adipozyten führen. Alternativ könnte in diesen Fällen der SARIFA Status anhand der prätherapeutischen Biopsie bestimmt werden. Hierzu muss jedoch zuvor untersucht werden, ob auch Biopsien aus dem nicht-invasiven Teil des Tumors ausreichend sind, um SARIFA angemessen zu bestimmen.

Gemessen an der hohen Inzidenz des kolorektalen Karzinoms bildet das untersuchte Kollektiv eine verhältnismäßig geringe Fallzahl ab. Nach Abschluss dieser Studie wurden daher 253 weitere Fälle untersucht, bei denen sich die

prognostische Relevanz von SARIFA bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen ebenfalls bestätigte.

Die vorliegende Studie wurde retrospektiv durchgeführt, daher ist abschließend auf die bekannten methodischen Nachteile dieses Studiendesigns hinzuweisen. Um die Ergebnisse zu validieren und ggf. auch auf andere Entitäten zu übertragen, sollten prospektive Studien initiiert werden.

## 5 Zusammenfassung

### **Hintergrund:**

Der klinische Verlauf einzelner Patienten mit Kolonkarzinom innerhalb desselben UICC-Stadiums variiert stark, daher ist es notwendig, neben der TNM-Klassifikation und bereits standardisierten histopathologischen Kriterien (Graduierung, Lymph- und Gefäßinfiltration, Resektionsränder, etc.) weitere Risikofaktoren zu identifizieren.

Histomorphologische Parameter haben über die letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen. Aktuell ist besonders die Tumorinvasionsfront von Interesse, da sie die Tumor-Host-Interface, d.h. die Interaktion zwischen malignen Zellen und Immunsystem, widerspiegelt. Bereits untersuchte Biomarker konnten sich jedoch aufgrund uneinheitlicher Definitionen oder unzureichender Studienlage nur teilweise in der Standarddiagnostik durchsetzen.

Ziel dieser Studie ist, einen neuen, einfach zu erhebenden histomorphologischen Biomarker – SARIFA - vorzustellen und dessen prognostische Relevanz zu prüfen. SARIFA („Stroma AReactive Invasion Front Areas(s)“) wird definiert als ein Areal der Tumorinvasionsfront, bestehend aus einer Tumordrüse oder einem Zellcluster ( $\geq 5$  Zellen), das in direktem Kontakt zu Adipozyten ohne separierendes Stroma steht. Diese Studie soll prüfen, ob SARIFA-positive Tumoren mit einer schlechteren Prognose und aggressiveren histopathologischen Tumorcharakteristika assoziiert sind.

### **Methoden:**

Retrospektiv wurden 196 Fälle von fortgeschrittenen Adenokarzinomen (pT 3/4) des Kolons erfasst. Die Einteilung in SARIFA-positive und -negative Tumoren erfolgte durch die lichtmikroskopische Untersuchung von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebeschnitten und wurde unabhängig von zwei erfahrenen Pathologen durchgeführt. Jeweils ein Gewebeschnitt wurde exemplarisch für einen Patienten untersucht und anschließend die Relevanz SARIFA-positiver Tumoren bezüglich Prognose und assoziierter Charakteristika überprüft.

**Ergebnisse:**

Im untersuchten Kollektiv zeigten sich 16% SARIFA-positive Tumoren. Die Interobserver-Reliabilität lag bei  $\kappa=0,87$  und war somit sehr gut. Patienten mit SARIFA-positiven Status wiesen eine signifikant kürzere krankheitsspezifische Überlebenszeit auf ( $p=0.008$ ) und waren häufiger mit einer höheren histopathologischen Graduierung assoziiert ( $p=0.02$ ). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass SARIFA einen statistisch unabhängigen prognostischen Indikator für die krankheitsspezifische Überlebenszeit darstellt ( $p=0.012$ ). Der Erhebungsaufwand von SARIFA war gering, die durchschnittliche Beurteilung eines Gewebeschnittes nahm  $21 \pm 6$  Sekunden in Anspruch.

**Schlussfolgerung:**

Die vorliegende Arbeit stützt die These, dass SARIFA als prognostisch relevanter histomorphologischer Parameter für das Kolonkarzinom Bedeutung erlangen kann. Vorteile sind die einfache Erhebung, eine hohe Interrater-Reliabilität und eine signifikante krankheitsspezifische prognostische Relevanz. SARIFA sollte daher bei der Klassifizierung von Kolonkarzinomen als Ergänzung zum TNM-System zunehmend miteinbezogen werden.

Zudem sollten weitere Entitäten hinsichtlich des Auftretens von SARIFA untersucht und die initialen Ergebnisse an unabhängigen Kollektiven überprüft werden.

## Literaturverzeichnis

1. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, et al. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol.* 1991;6(4):325-44.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683-91.
4. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *BMJ.* 2014;348:g2467.
5. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD. Krebs in Deutschland 2015/2016. 2019.
6. Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjonneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ.* 2010;341:c5504.
7. Pox CP, Schmiegeler W. [German S3-guideline colorectal carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2013;138(49):2545.
8. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-73.
9. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-99.
10. Wahab SMR, Islam F, Gopalan V, Lam AK. The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2017;16(2):93-102.
11. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019;394(10207):1467-80.
12. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15065.
13. Levine DS, Haggitt RC. Normal histology of the colon. *Am J Surg Pathol.* 1989;13(11):966-84.

14. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
15. Hankey W, Frankel WL, Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(1):159-72.
16. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet.* 2016;5(2):78-83.
17. Munding J, Tannapfel A. Differenzierte Bewertung der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom. *Der Gastroenterologe.* 2013;8(6):495-503.
18. Ijspeert JEG, Vermeulen L, Meijer GA, Dekker E. Serrated neoplasia—role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2015;12(7):401-9.
19. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6(5):322-7.
20. Innere Medizin 2020 : eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2020.
21. Vogl TJ, Pereira PL, Helmberger T, Schreyer AG, Schmiegel W, Fischer S, et al. Updated S3 Guidelines - Diagnosis and Treatment of Colorectal Carcinoma: Relevance for Radiological Diagnosis and Intervention. *Rofo.* 2019;191(4):298-310.
22. Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. *Radiology.* 2011;259(2):393-405.
23. Park SH, Lee JH, Lee SS, Kim JC, Yu CS, Kim HC, et al. CT colonography for detection and characterisation of synchronous proximal colonic lesions in patients with stenosing colorectal cancer. *Gut.* 2012;61(12):1716-22.
24. Leufkens AM, van den Bosch MA, van Leeuwen MS, Siersema PD. Diagnostic accuracy of computed tomography for colon cancer staging: a systematic review. *Scand J Gastroenterol.* 2011;46(7-8):887-94.
25. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging.* 2016;11:967-76.
26. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014;383(9927):1490-502.
27. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):561-9.
28. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the

International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299-311.

29. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology.* 2018;85(1-2):72-84.

30. Dienstmann R, Villacampa G, Sveen A, Mason MJ, Niedzwiecki D, Nesbakken A, et al. Relative contribution of clinicopathological variables, genomic markers, transcriptomic subtyping and microenvironment features for outcome prediction in stage II/III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1622-9.

31. Quirke P, Williams GT, Ectors N, Ensari A, Piard F, Nagtegaal I. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol.* 2007;8(7):651-7.

32. Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren 2020.

33. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology.* 2018;25(6):1454-5.

34. Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol.* 2013;19(46):8515-26.

35. Markl B, Schaller T, Krammer I, Cacchi C, Arnholdt HM, Schenkirsch G, et al. Methylene blue-assisted lymph node dissection technique is not associated with an increased detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2013;26(9):1246-54.

36. Markl B, Schaller T, Kokot Y, Endhardt K, Kretsinger H, Hirschbuhl K, et al. Lymph node size as a simple prognostic factor in node negative colon cancer and an alternative thesis to stage migration. *Am J Surg.* 2016;212(4):775-80.

37. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(2):193-201.

38. Koh FH, Tan KK. Complete mesocolic excision for colon cancer: is it worth it? *J Gastrointest Oncol.* 2019;10(6):1215-21.

39. Croner RS, Ptok H, Merkel S, Hohenberger W. Implementing complete mesocolic excision for colon cancer - mission completed? *Innov Surg Sci.* 2018;3(1):17-29.

40. Saitoh Y, Inaba Y, Sasaki T, Sugiyama R, Sukegawa R, Fujiya M. Management of colorectal T1 carcinoma treated by endoscopic resection. *Dig Endosc.* 2016;28(3):324-9.

41. Liang Y, Li G, Chen P, Yu J. Laparoscopic versus open colorectal resection for cancer: a meta-analysis of results of randomized controlled trials on recurrence. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34(11):1217-24.

42. Ohtani H, Tamamori Y, Arimoto Y, Nishiguchi Y, Maeda K, Hirakawa K. A meta-analysis of the short- and long-term results of randomized controlled trials that compared laparoscopy-assisted and open colectomy for colon cancer. *J Cancer*. 2012;3:49-57.
43. Willis S, Schumpelick V. [Open colon surgery]. *Chirurg*. 2005;76(11):1073-81.
44. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479-516.
45. van Pelt GW, Kjaer-Frifeldt S, van Krieken J, Al Dieri R, Morreau H, Tollenaar R, et al. Scoring the tumor-stroma ratio in colon cancer: procedure and recommendations. *Virchows Arch*. 2018;473(4):405-12.
46. Koelzer VH, Lugli A. The tumor border configuration of colorectal cancer as a histomorphological prognostic indicator. *Front Oncol*. 2014;4:29.
47. Shivji S, Conner JR, Barresi V, Kirsch R. Poorly differentiated clusters in colorectal cancer: a current review and implications for future practice. *Histopathology*. 2020;77(3):351-68.
48. Markl B, Arnholdt HM. Prognostic significance of tumor budding in gastrointestinal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(10):1521-33.
49. Oh BY, Park YA, Huh JW, Yun SH, Kim HC, Chun HK, et al. Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1-3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(1):204-11.
50. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):151-62.
51. Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47(1):4-19.
52. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(2):151-9.
53. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn Pathol*. 2016;11:31.
54. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
55. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of statistics*. 1979:65-70.

56. Quirke P, Cuvelier C, Ensari A, Glimelius B, Laurberg S, Ortiz H, et al. Evidence-based medicine: the time has come to set standards for staging. *J Pathol*. 2010;221(4):357-60.
57. Quirke P, West NP, Nagtegaal ID. EURECCA consensus conference highlights about colorectal cancer clinical management: the pathologists expert review. *Virchows Arch*. 2014;464(2):129-34.
58. van de Velde CJ, Boelens PG, Borrás JM, Coebergh JW, Cervantes A, Blomqvist L, et al. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. *Eur J Cancer*. 2014;50(1):1 e-e34.
59. Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2):2767-810.
60. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(12):3706-12.
61. Hansen TF, Kjaer-Frifeldt S, Lindebjerg J, Rafaelsen SR, Jensen LH, Jakobsen A, et al. Tumor-stroma ratio predicts recurrence in patients with colon cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Acta Oncol*. 2018;57(4):528-33.
62. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A, Branca G, Baron L, Tuccari G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol*. 2014;45(2):268-75.
63. Jass JR, Ajioka Y, Allen JP, Chan YF, Cohen RJ, Nixon JM, et al. Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996;28(6):543-8.
64. Martin B, Schafer E, Jakubowicz E, Mayr P, Ihringer R, Anthuber M, et al. Interobserver variability in the H&E-based assessment of tumor budding in pT3/4 colon cancer: does it affect the prognostic relevance? *Virchows Arch*. 2018;473(2):189-97.
65. Hacking S, Angert M, Jin C, Kline M, Gupta N, Cho M, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: An institutional interobserver reliability and prognostic study of colorectal adenocarcinoma cases. *Ann Diagn Pathol*. 2019;43:151420.
66. Martin B, Mayr P, Ihringer R, Schafer EM, Jakubowicz E, Anthuber M, et al. Interobserver Variability in the Assessment of Tumor Budding in pT 3/4 Colon Cancer: Improvement by Supporting Immunohistochemistry? *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(9).
67. Martin B, Grosser B, Kempkens L, Miller S, Bauer S, Dhillon C, et al. Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)-A New Easily to Determine Biomarker in Colon Cancer-Results of a Retrospective Study. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19).

68. Chan HP, Samala RK, Hadjiiski LM, Zhou C. Deep Learning in Medical Image Analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1213:3-21.
69. Kather JN, Krisam J, Charoentong P, Luedde T, Herpel E, Weis CA, et al. Predicting survival from colorectal cancer histology slides using deep learning: A retrospective multicenter study. *PLoS Med.* 2019;16(1):e1002730.
70. Wulczyn E, Steiner DF, Moran M, Plass M, Reihls R, Tan F, et al. Interpretable survival prediction for colorectal cancer using deep learning. *NPJ Digit Med.* 2021;4(1):71.
71. Hofmann W-K, Ottmann OG, Hoelzer D. Globale Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays: Diagnostik und Klassifikation von Tumorerkrankungen. *Dtsch Arztebl International.* 2003;100(5):271-.
72. Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47(4):320-9.
73. Acs G, Kiluk J, Loftus L, Laronga C. Comparison of Oncotype DX and Mammostrat risk estimations and correlations with histologic tumor features in low-grade, estrogen receptor-positive invasive breast carcinomas. *Mod Pathol.* 2013;26(11):1451-60.
74. Oki E, Watanabe J, Sato T, Kagawa Y, Kuboki Y, Ikeda M, et al. Impact of the 12-gene recurrence score assay on deciding adjuvant chemotherapy for stage II and IIIA/B colon cancer: the SUNRISE-DI study. *ESMO Open.* 2021;6(3):100146.
75. Srivastava G, Renfro LA, Behrens RJ, Lopatin M, Chao C, Soori GS, et al. Prospective multicenter study of the impact of oncotype DX colon cancer assay results on treatment recommendations in stage II colon cancer patients. *Oncologist.* 2014;19(5):492-7.
76. You YN, Rustin RB, Sullivan JD. Oncotype DX((R)) colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III colon cancer: A review of the evidence. *Surg Oncol.* 2015;24(2):61-6.
77. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2016;115(7):831-40.
78. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(10):1533-41.
79. Wu Q, Li B, Li Z, Li J, Sun S, Sun S. Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):95.
80. Wen YA, Xing X, Harris JW, Zaytseva YY, Mitov MI, Napier DL, et al. Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer. *Cell Death Dis.* 2017;8(2):e2593.

81. Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013;46(15):1339-52.
82. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):227-32.
83. De Oliveira MP, Liesa M. The Role of Mitochondrial Fat Oxidation in Cancer Cell Proliferation and Survival. *Cells.* 2020;9(12).
84. Hu H, Cai Y, Huang J, Zhang J, Deng Y. Visceral adipose tissue and the risk of colorectal adenomas: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Cancer Prev.* 2015;24(6):462-9.
85. Nassar ZD, Aref AT, Miladinovic D, Mah CY, Raj GV, Hoy AJ, et al. Periprostatic adipose tissue: the metabolic microenvironment of prostate cancer. *BJU Int.* 2018;121 Suppl 3:9-21.
86. Quail DF, Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol.* 2019;15(3):139-54.
87. Bernard JJ, Wellberg EA. The Tumor Promotional Role of Adipocytes in the Breast Cancer Microenvironment and Macroenvironment. *Am J Pathol.* 2021;191(8):1342-52.
88. Golan T, Parikh R, Jacob E, Vaknine H, Zemser-Werner V, Hershkovitz D, et al. Adipocytes sensitize melanoma cells to environmental TGF-beta cues by repressing the expression of miR-211. *Sci Signal.* 2019;12(591).
89. Grosser B, Gluckstein MI, Dhillon C, Schiele S, Dintner S, VanSchoiack A, et al. Stroma Areactive Invasion Front Areas (SARIFA) - a new prognostic biomarker in gastric cancer related to tumor-promoting adipocytes. *J Pathol.* 2021.
90. Xiong X, Wen YA, Fairchild R, Zaytseva YY, Weiss HL, Evers BM, et al. Upregulation of CPT1A is essential for the tumor-promoting effect of adipocytes in colon cancer. *Cell Death Dis.* 2020;11(9):736.
91. Rodriguez-Gonzalez JC, Hernandez-Balmaseda I, Declerck K, Perez-Novo C, Logie E, Theys C, et al. Antiproliferative, Antiangiogenic, and Antimetastatic Therapy Response by Mangiferin in a Syngeneic Immunocompetent Colorectal Cancer Mouse Model Involves Changes in Mitochondrial Energy Metabolism. *Front Pharmacol.* 2021;12:670167.
92. Lin D, Zhang H, Liu R, Deng T, Ning T, Bai M, et al. iRGD-modified exosomes effectively deliver CPT1A siRNA to colon cancer cells, reversing oxaliplatin resistance by regulating fatty acid oxidation. *Mol Oncol.* 2021;15(12):3430-46.
93. Peng S, Chen D, Cai J, Yuan Z, Huang B, Li Y, et al. Enhancing cancer-associated fibroblast fatty acid catabolism within a metabolically challenging tumor microenvironment drives colon cancer peritoneal metastasis. *Mol Oncol.* 2021;15(5):1391-411.

## Publikation

Martin B, Grosser B, **Kempkens L**, Miller S, Bauer S, Dhillon C, Banner BM, Brendel EM, Sipos É, Vlasenko D, Schenkirsch G, Schiele S, Müller G, Märkl B.

Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)-A New Easily to Determine Biomarker in Colon Cancer-Results of a Retrospective Study.

Cancers (Basel). 2021 Sep 29;13(19):4880.

## **Abbildungsverzeichnis**

### **Abbildung 1:**

Kreisdiagramme, Inzidenz und Mortalität Kolorektales Karzinom Weltweit, GLOBOCAN 2020

### **Abbildung 2:**

Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht, ICD-10 C18-C20, Deutschland 1999-2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020; je 100.000 (alter Europastandard)

### **Abbildung 3:**

Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C18-C20, Deutschland 1999-2016/2017, Prognose (Inzidenz) bis 2020

### **Abbildung 4:**

Adenom-Karzinom Sequenz basierend auf dem Modell von Fearon und Vogelstein

### **Abbildung 5:**

Immunhistochemisch (pan cytokeratin) gefärbte Bilder kolorektaler Karzinome ohne Tumor budding (Bild A) und mit ausgeprägtem Tumor budding (Bild B)

### **Abbildung 6:**

Schematische Darstellung eines SARIFA-positiven Falles

### **Abbildung 7:**

H&E Bilder SARIFA-positiver und SARIFA-negativer Fälle

### **Abbildung 8:**

Kaplan-Meier Kurven zum Vergleich der krankheitsspezifischen Überlebenszeit (colon-cancer-specific survival) in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

### **Abbildung 9:**

Kaplan-Meier Kurven zum Vergleich der Gesamtüberlebenszeit (overall survival) in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

### **Abbildung 10:**

Kaplan-Meier Kurve zum Vergleich des Auftretens von Fernmetastasen in Abhängigkeit vom SARIFA-Status.

## **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:** Klinisch-pathologische Daten

**Tabelle 2:** Cox-Regressionsanalyse der krankheitsspezifischen Überlebenszeit

## Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

ACF= Aberrant crypt foci

APC= Adenomatöses Polyposis Coli

ATP= Adenosintriphosphat

BMI= Body-Mass-Index

CAFs= Cancer-associated Fibroblasts

CAMPOX= Capecitabin + Oxaliplatin

CEA= Carcino-Embryonales Antigen

CPT-1A = Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1A

CIMP= CpG Island Methylation Phenotype

CIN= Chromosomale Instabilität

CME= Complete Mesocolic Exzision

CNNs= Convolutional Neuronal Networks

CpG= Cytosine-Phosphorsäure-Guanine

cT= clinical Tumor Stage

CT= Computertomografie

DCC= Deleted in Colorectal Cancer

DL= Deep Learning

DNA= Desoxyribonukleinsäure/-acid

EMT= Epithelial-mesenchymal Transition

FAO= Fatty Acid Oxidation

FAP= Familiäre Adenomatöse Polyposis

FOLFOX= 5-Fluorouracil + Folinsäure + Oxaliplatin

HE= Hämatoxylin-Eosin

i.d.R.= In der Regel

ITBCC= International Tumor Budding Consensus Conference

3-KAT= 3-Ketoacylthiolase

KRAS= Kirsten Rat Sarcoma

KRK= Kolorektales Karzinom

LK= Lymphknoten

MAPK= Mitogen Activated Protein Kinase

MMR= Mismatch-Repair

MRT= Magnetresonanztomografie

MSI-H= hochgradige Mikrosatelliteninstabilität  
MSI-N= niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität  
MSS= Mikrosatellitenstabilität  
OS= Overall Survival  
PDC= Poorly Differentiated Clusters  
PET= Positronen-Emissions-Tomografie  
pN= histopathologischer Lymphknotenstatus  
pT= histopathologischer Tumorstatus  
RFA= Radiofrequenzablation  
RS= Recurrence Score  
SARIFA= Stroma AReactive Invasion Front Areas  
SD= Standard Deviation  
SSA= sessile serratierte Adenome  
SSPS= Statistical Package for the Social Sciences  
TAF= Tumor-Adipose Feature  
TBC= Tumor Border Configuration  
Tis= Carcinoma in situ  
TNM= Tumor Node Metastasis  
TSA= traditionelle serratierte Adenome  
TSR= Tumor-Stroma Ratio  
UICC= Union for International Cancer Control  
 $\mu\text{m}$ = Mikrometer  
 $\kappa$ = Kappa

## Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht realisierbar gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Märkl danke ich für die Anregung zu diesem interessanten Thema und die Betreuung der Arbeit. Insbesondere die Begeisterung, die Sie mir für das wissenschaftliche Arbeiten vermittelt haben, wird mich weiterhin begleiten. Danke, dass Ihre Türe stets offen stand für Fragen, konstruktive Diskussionen und wertvolle Ratschläge. Ich hoffe, ich werde auch in Zukunft noch häufig durch diese Türe treten können.

Ich danke Herrn Dr. Martin für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Freund, für seine uneingeschränkte Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt hat.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

**Stroma AReactive Invasion Front Areas (SARIFA)  
– Ein neuer, vielversprechender Biomarker des Kolonkarzinoms –  
Ergebnisse einer Retrospektiven Studie**

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.

Neusäß, den 20.04.2024

Lana Maria Kempkens

---

Unterschrift der Doktorandin