

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



**Immunhistochemische Validierung von Biomarker NDRG1
für die peritoneale und hepatische Metastasierung
beim kolorektalen Karzinom**

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

vorgelegt von

Meliha Wasem

aus

Bijeljina, Bosnien und Herzegowina

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Neumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Axel Kleespies

Mitbetreuung durch den
promovierten
Mitarbeiter: Dr. Florian Bösch

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2024

„Laufe in Sandalen, bis daß dir die Weisheit Schuhe einbringt.“

-Avicenna

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann, für die ausgezeichnete Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mitdoktoranden Maximilian Dullinger für die Zusammenarbeit bedanken.

Inhalt

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 1.1 | <i>Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms</i> | <i>7</i> |
| 1.2 | <i>Metastasierung des KKR und Symptome.....</i> | <i>11</i> |
| 1.3 | <i>Prävention und Prognose.....</i> | <i>13</i> |
| 1.4 | <i>(Proto-)Onkogene RAS und BRAF</i> | <i>14</i> |
| 1.5 | <i>Biomarker und NDRG1.....</i> | <i>15</i> |
| 1.6 | <i>Fragestellung.....</i> | <i>16</i> |
| 2 | Material und Methoden..... | 18 |
| 2.1 | <i>Patientenkollektiv.....</i> | <i>18</i> |
| 2.2 | <i>Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie.....</i> | <i>18</i> |
| 2.3 | <i>Statistik.....</i> | <i>19</i> |
| 3 | Ergebnisse | 21 |
| 3.1 | <i>Vergleich der Patientenkohorten</i> | <i>21</i> |
| 3.2 | <i>Gesamtüberleben (Overall survival)</i> | <i>24</i> |
| 3.3 | <i>Überlebenskurven in Abhängigkeit von der NDRG1-Expression</i> | <i>29</i> |
| 3.3.1 | <i>Bestimmung der H-Scores.....</i> | <i>29</i> |
| 3.3.2 | <i>Überlebenskurven für NDRG1 (H-Score Zytoplasma)</i> | <i>33</i> |
| 3.3.3 | <i>Überlebenskurven für NDRG1 (H-Score Zellkerne).....</i> | <i>36</i> |
| 4 | Diskussion | 41 |
| 4.1 | <i>Limitationen der Studie.....</i> | <i>41</i> |
| 4.2 | <i>Expression des NDRG1 in KKR ist kein absoluter prognostischer Wert.....</i> | <i>42</i> |
| 4.3 | <i>Bedeutung der NDRG1-Expression bei der Metastasierung des KKR.....</i> | <i>43</i> |
| 4.4 | <i>Schlussfolgerung und Ausblick</i> | <i>44</i> |
| 5 | Zusammenfassung | 46 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6 | Literaturverzeichnis | 47 |
| | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis..... | 56 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 58 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 59 |

1 Einleitung

Der Begriff „Krebs“ umfasst ein weites Spektrum an verschiedenen Erkrankungen, die zwar das unkontrollierte Zellwachstum gemeinsam haben, jedoch bezüglich Prävention, Screening, Therapie und Rehabilitation stark variieren. Die absolute Inzidenz an Krebserkrankungen hat sich in Deutschland seit den 1970er-Jahren fast verdoppelt. Dieser Anstieg an Krebsneuerkrankungen lässt sich hauptsächlich durch den demografischen Wandel erklären [1].

Insgesamt leben in Deutschland ungefähr 4 Millionen Menschen, die an Krebs erkrankt sind oder waren [2]. Mehr als die Hälfte der Fälle lässt sich auf drei Krebsarten zurückführen. Brustkrebs ist mit 22 % die häufigsten Krebsart, gefolgt von Prostatakrebs mit 15 % und dem kolorektalen Karzinom (KRK) mit 12 % [3].

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

Die maligne Neoplasie des Mast- und Dickdarms, das KRK, bildet die zweithäufigste Todesursache durch Krebsleiden in den Industriestaaten. Die geringe Überlebenschance der KRK-Patienten wird maßgeblich durch das Auftreten von hämatogenen Fernmetastasen bestimmt, so sind bei 20 % der KRK-Patienten bereits bei Erstdiagnose Metastasen vorhanden. Die hepatische Metastasierung wird dabei am meisten beobachtet [4]. Neben der Leber finden sich seltener auch Metastasen in der Lunge, dem Peritoneum und in den Knochen [5]. Biomarker, die mit dem Auftreten und der Lokalisation von Fernmetastasen korrelieren, könnten einen erheblichen Einfluss auf das therapeutische Vorgehen und die Nachsorge der Patienten haben [6].

Vor allem in der geriatrischen Bevölkerung ist das KRK verbreitet (Abbildung 1) und liegt unter den Häufigkeiten der verschiedenen Krebsarten bei Frauen der Altersgruppe über 85 Jahren an zweiter Stelle und bei Männern der Altersgruppe von 70 bis 89 Jahren an dritter Stelle. Mehrere Studien haben erwiesen, dass durch das Vorsorge-screening die Inzidenzraten beim KRK zurückgegangen sind [7,8]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die meisten Fälle von Darmkrebs durch ein Screening potenziell

Einleitung

vermieden werden könnten [9]. Auch ist die Inzidenz neuer Fälle in den letzten Jahren zurückgegangen, mit Ausnahme von den unter 50-Jährigen [10].

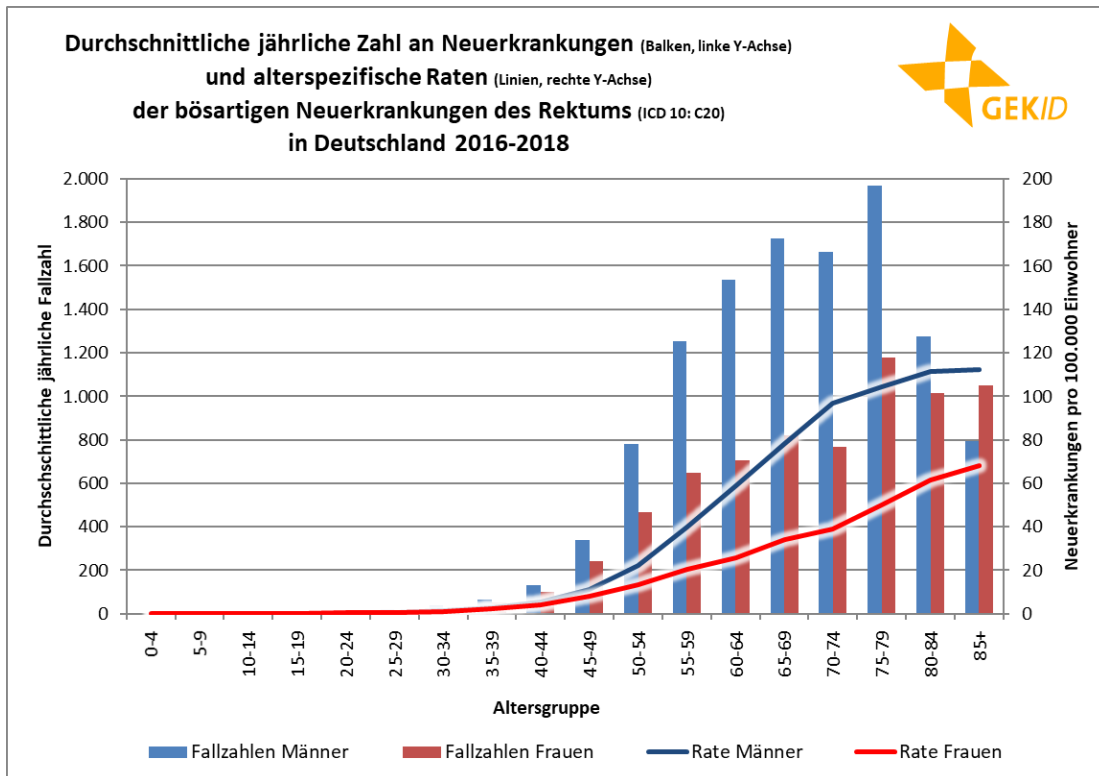


Abbildung 1: Jährliche Inzidenz des Darmkrebses in Deutschland 2016-2018 in den verschiedenen Alterskohorten [11]

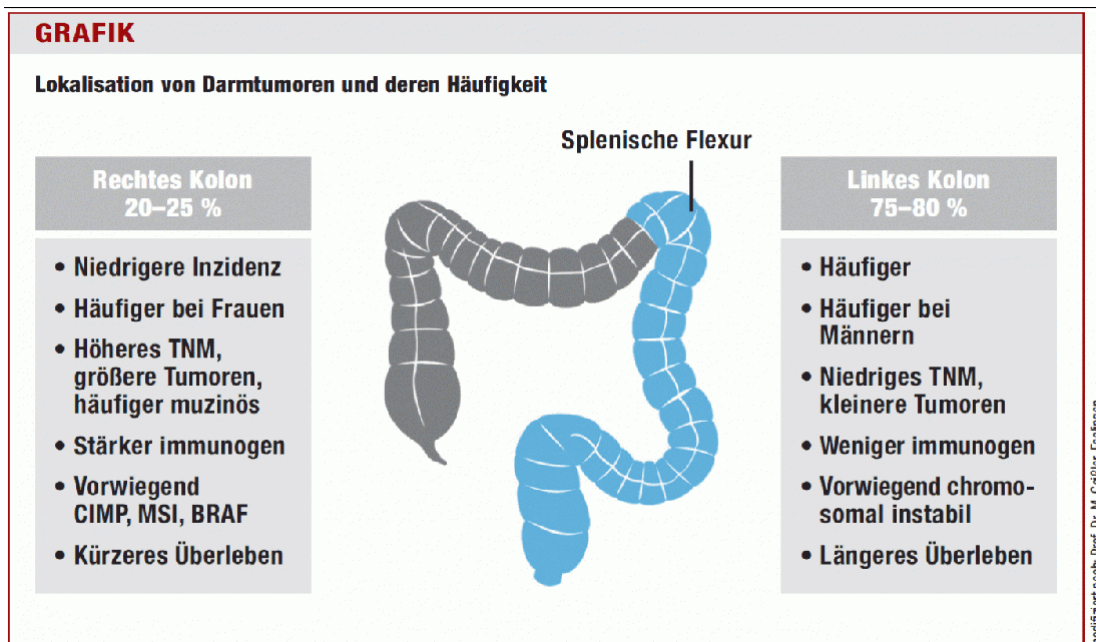


Abbildung 2: Lokalisationen des kolorektalen Karzinoms [12]

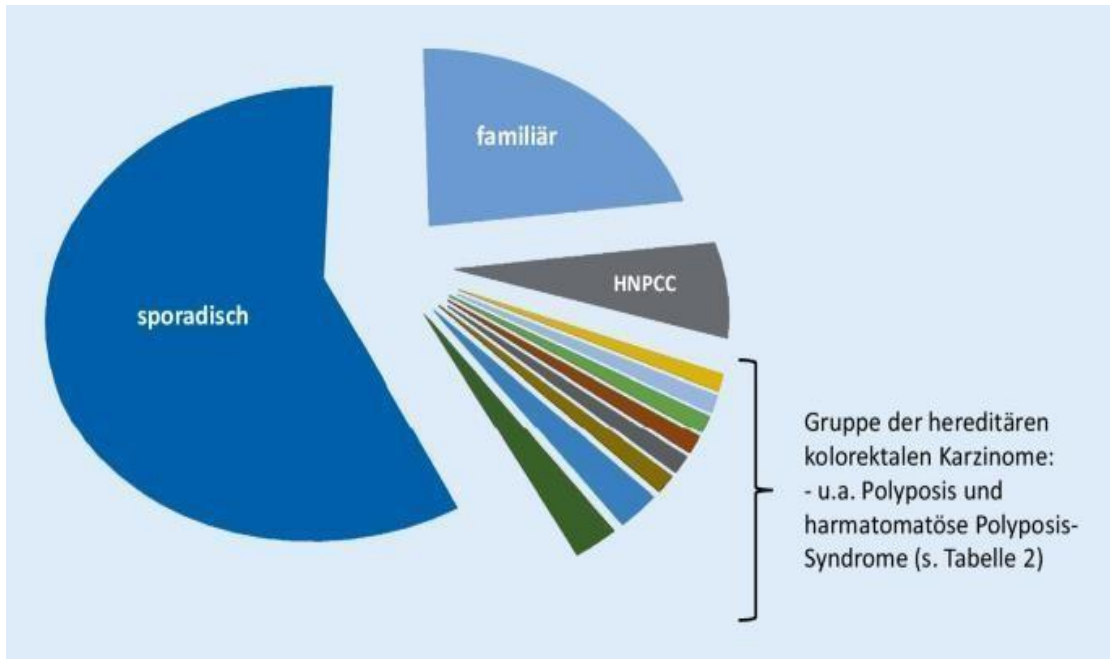
Ein Großteil der KRK entstehen auf dem Boden einer epithelialen Dysplasie und umfasst Karzinome des Kolons (mehr als 16 cm oral der Anokutanlinie, d.h. der äußeren Begrenzung des Anus, sie bezeichnet den Übergang der Anahaut zur Epidermis) und des Rektums (weniger als 16 cm entfernt von der Anokutanlinie). Am häufigsten treten Karzinome des Rektums (50 %) auf, gefolgt von Karzinomen des Colon sigmoideums (30 %) [13].

Die Vorstufe des KRK ist das Adenom der Dickdarmschleimhaut, also eine autonome Proliferation des Mukosaepithels mit einem exophytischen, d.h. in das Darmlumen wachsenden tubulären oder villösen Adenom. Seltener existieren auch flache Adenome. Die Mehrzahl der Adenome liegt im Sigmoid und Kolon [14]. Dabei werden proximale Neoplasien seltener entdeckt. Dadurch entwickeln sich diese häufiger zum Karzinom als distale Neoplasien (Abbildung 2) [15].

Die Ursachen für KRK sind vielfältig und in mehr als der Hälfte aller Fälle ist die Erkrankung auf eine sporadische Entstehung zurückzuführen (Abbildung 3), neben einer familiären Häufung in 20 % der Fälle sind Keimbahnmutationen bestimmter Risikogene wie bei der „familiären adenomatösen Polyposis“ (FAP) und dem

Einleitung

„Hereditären non-polypösen Kolonkarzinom“ (HNPCC) die Ursache [16,17]. Außerdem spielt in sehr seltenen Fällen auch die MUTYH (mutY DNA Glykosylase)-assoziierte Polyposis als Ursache der KRK eine Rolle [18].



| Hereditäre KRK | Definition | Molekularpathologische Untersuchung | Vorsorge |
|--|---|--|--|
| <i>HNPCC/Lynch-Syndrom</i> | Anamnestisch durch Bethesda- oder Amsterdam-Kriterien | DNA-Mismatch-Reparatur-Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 oder Mikrosatelliteninstabilität | Genetische Beratung, ggf. mit prädiktiver Testung; ab dem 25. Lebensjahr jährliche Koloskopie; keine prophylaktische Operation |
| <i>Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)</i> | Familienanamnese/Polyposis coli | APC-Keimbahnmutation | Ab dem 10. Lebensjahr genetische Beratung und prädiktive Testung. Jährliche Koloskopie bis zur kontinenserhaltenden Proktokolektomie (nach Abschluss der Pubertät) |
| <i>Attenuierte FAP (AFAP)</i> | Familienanamnese/abgeschwächte Polyposis coli | APC-Keimbahnmutation | Jährliche Koloskopie, bei endoskopisch nicht beherrschbarer Polyposis Kolektomie |
| <i>MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP)</i> | Phänotyp wie AFAP, jedoch keine APC-Mutation | <i>MUTYH</i> -Keimbahnmutation | Ab dem 18.–20. Lebensjahr prädiktive Testung nach humangenetischer Beratung. Jährliche Koloskopie, bei endoskopisch nicht beherrschbarer Polyposis Kolektomie |
| <i>Peutz-Jeghers-Syndrom</i> | Hamartomatöse Polypen und Pigmentflecken | Mutation im <i>STK11</i> -Gen | Generelle Überwachungsempfehlungen bestehen nicht aufgrund spärlicher Datenlage |
| <i>Familiäre Juvenile Polyposis</i> | Juvenile Polypen | Mutation im <i>SMAD4</i> -Gen oder <i>BMPR1A</i> -Gen | |
| <i>Cowden-Syndrom</i> | Multiple Hamartome | Mutation im <i>PTEN</i> -Gen | |
| <i>Hyperplastisches Polyposis-Syndrom</i> | >20 hyperplastische bzw. serratierte Polypen | Unbekannt | |
| <i>Erbliche gemischte Polyposis</i> | Mischung verschiedener Polypentypen | Assoziation mit einem Abschnitt auf Chromosom 15 | |

HNPCC hereditäres nonpolypöses kolorektales Karzinom, *KRK* kolorektale Karzinome

Abbildung 3: Ätiologie des KRK [19]

Die Progression zum Karzinom wird in der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ charakterisiert, diese wird auch als „Chromosomeninstabilitäts (CIN) Pathway“ bezeichnet. Es

Einleitung

wird davon ausgegangen, dass zur Adenomentstehung der funktionelle Verlust des *APC*-Gens verantwortlich ist. *APC* ist ein Tumorsuppressorprotein, das die proteasomale Degradation des Transkriptionsfaktors β -Catenin initiiert. *APC*-Defekte führen zu einer unkontrollierten Proliferation der hochprismatischen Zellen des resorptiven Epithels, der Enterozyten [20]. Eine somatische Mutation und der Verlust der Heterozygotie („Loss of Heterozygosity“, LOH) auf Chromosom 5 des *APC*-Gens hat eine Inaktivierung des Gens zur Folge [21].

Dazu können weitere genetischen Veränderungen auftreten, wie eine Mutation von „Kirsten Rat Sarcoma“ (*KRAS*) auf Chromosom 12q [22], eine Mutation im TGF- β -2-Rezeptor und LOH von Chromosom 18q mit Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene [23]. Eine weitere Mutation, LOH von Chromosom 17q, und eine p53-Mutation führen schließlich zu einem manifesten Karzinom [24].

Neben der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bestehen noch weitere Pfade der Karzinomentwicklung. Ein Beispiel ist der „serratierte Karzinogeneseweg“, dessen Vorläuferläsion die Entität des „sessilen serratierten Adenoms“ (SSA) ist. Ein weiterer Pfad ist ein „Mischtyp“, der molekulare Charakteristika der beiden o.g. Pfade aufweist und dessen Vorläuferläsion das „traditionelle serratierte Adenom“ (TSA) ist [25]. Initial liegt bei der für die serratierten Route eine Mutation im *RAF*-Protein (*BRAF*-Gen) oder im *KRAS*-Gen vor, dies hat eine Seneszenz mit CpG-Methylierung und konsekutiven Genausfällen, z.B. *MLH1*, *MGMT* bzw. *p16*, zur Folge [26].

1.2 Metastasierung des KKR und Symptome

Metastasen sind Absiedlungen eines Primärtumors, die auf verschiedenen Wegen in andere Organe gelangen können. Tumorstammzellen lösen sich von ihrem ursprünglichen Tumor, infiltrieren ins Nachbargewebe (Invasion), dringen in Blutgefäße und Lymphgewebe ein (Circulation) und werden durch den Blutstrom verschleppt (Extravasation, Kolonisation). Dort können sich die Tumorzellen teilen und weiteres Gewebe schädigen (Abbildung 4) [27].

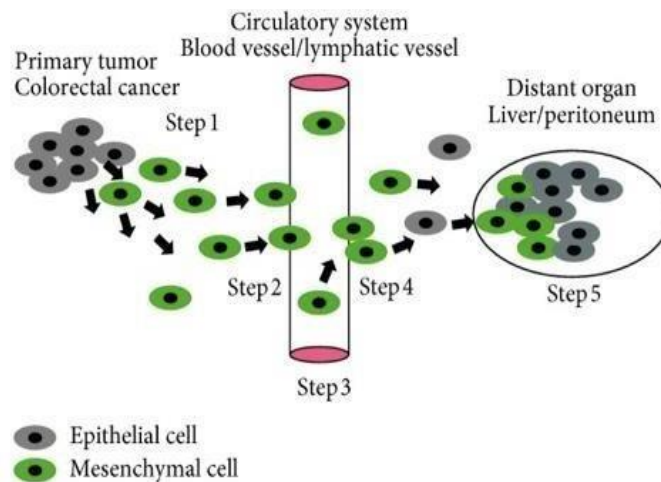


Abbildung 4: Invasions-Metastasen-Kaskade [28]

Insgesamt werden bei jedem zweiten KKK-Patienten im Laufe seiner Erkrankung Lebermetastasen diagnostiziert. Bei 25 % der Patienten sind diese bereits bei der Diagnosestellung zu finden [29]. Somit ist die Leber die häufigste Lokalisation für Metastasen eines KKK [30]. Zweithäufigster Metastasierungsort ist die Lunge [31]. Seltenere treten Metastasen im Peritoneum und im Gehirn auf [32].

Ein verglichen mit der Lebermetastase selteneres Ereignis, dafür aber mit schlechterer Prognose verbunden, ist die Peritonealkarzinose. Liegt der Tumor in intraperitonealen Darmabschnitten, kann er im Tumorstadium 4 (T4) durch die Adventitia und Serosa in das Peritoneum durchbrechen und es können sich Metastasen absiedeln [33]. Liegt der Tumor in einem retroperitoneal gelegenen Darmsegment, kann sich der Tumor per continuitatem in das angrenzende Gewebe ausbreiten.

Das Metastasierungsverhalten der lymphogenen Metastasen erfolgt über das Lymphabflussgebiet entlang der Arteria ileocolica, Arteria colica dextra, sinistra oder media sowie der Arteria sigmoideae. Tumoren des Colon ascendens und transversum nutzen die Wege entlang der Arteria mesenterica superior und ihrer Äste. Tumoren des Colon descendens hingegen metastasieren entlang der Arteria mesenterica inferior. Rektumkarzinome breiten sich über paraaortale Lymphknoten aus, die des mittleren Drittels metastasieren über Lymphknoten der Beckenwand und die des unteren Drittels über inguinale Lymphknoten [34]. Lymphknotenmetastasen beim KKK sind ein wichtiger

Einleitung

prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben des Patienten und selektieren Kandidaten für multimodale Therapieansätze [35].

Die Symptome des KRK entwickeln sich meist langsam und der Patient ist anfangs beschwerdefrei. Der Beginn der Beschwerden hängt mit der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors zusammen. So macht sich eine Stenose im Colon descendens schneller bemerkbar als im Colon ascendens. Neben typischer Symptomatik bei einem fortgeschrittenen KRK, wie u.a. Blut im Stuhl, Veränderung der Stuhlgewohnheiten, kolikartige Schmerzen und tastbare Verhärtungen im Bauchraum [36,37], können auch unspezifische Symptome auftreten wie Gewichtsverlust oder Symptome einer Anämie, die allgemein auf ein malignes Geschehen hinweisen.

1.3 Prävention und Prognose

Zur primären Prävention als protektive Maßnahme zur Verhinderung des KRK wird zu einer Umstellung auf einen gesunden Lebensstil geraten. So gelten eine regelmäßige körperliche Aktivität und eine Reduktion des Body Mass Index (BMI) als vorrangige Ziele. Weiterhin werden ein vermehrter Konsum von Obst und Gemüse, ballaststoffreiche Kost, wenig rotes Fleisch, auch Alkohol- und Nikotinabstinenz etc. empfohlen [38].

Als sekundäre Präventionsmaßnahme gilt es, rechtzeitig KRK-Vorläufer zu erkennen, meist mithilfe eines Screenings. So wird eine Koloskopie ab dem 55. Lebensjahr empfohlen, auch ein Stuhltest als Nachweis von okkultem Blut (FOBT) ist möglich, Sensitivität und Selektivität dieser Tests variieren jedoch stark [37]. Bei genetischer Prädisposition oder positiver Familienanamnese kann eine Koloskopie auch im jüngeren Alter erfolgen.

Die tertiäre Prävention dient der Tumornachsorge und Erkennung von Lokalrezidiven und hat das Ziel, den Rückfall durch Früherkennung von Rezidiven zu verhindern. Ferner sind auch Rehabilitationsmaßnahmen für tumorbedingte Folgeerkrankungen mit einbegriffen [39].

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie Tumorstadium, Infiltrationstiefe der Darmwand, Qualität der operativen Therapie und Vorhandensein von Fern- und Lymphknotenmetastasen. Durch neue Chemotherapie- und Antikörperregime sowie durch Fortschritte der chirurgischen Behandlung konnte die mediane Überlebenszeit der Patienten mit metastasiertem KRK in den letzten 20 Jahren verdoppelt werden [40].

1.4 (Proto-)Onkogene *RAS* und *BRAF*

(Proto-)Onkogene haben meist eine physiologische Funktion und können im physiologischen Zellgeschehen aktiviert und deaktiviert werden. Ihre Aufgabe ist es in der Regel, Zellteilung, Proliferation und Differenzierung zu regulieren. Durch Mutationen kommt es zu einer unkontrollierten Aktivität, welche zu einem autonomen Wachstum der Zelle führt. Onkogene sind die krebserzeugende Form des Protoonkogens (nicht-aktivierte Wildtyp-Form). Protoonkogene gehen meist durch eine „Missense Mutation“, Duplikation oder Translokation in ihre aktivierte Form über [41]. Zwei dieser Protoonkogene sind *BRAF* und *KRAS*. *BRAF* (8-10 % der KRK-Patienten) ist assoziiert mit einer aggressiven Form des KRK-Phänotyps, während *KRAS* (35-45 % der KRK-Patienten) zur Aktivierung des MAPK-Signalweges führt. Dadurch geht der antiproliferative Effekt der EGFR-Antikörper verloren [42].

BRAF ist ein Protoonkogen, das die gleichnamige Serin/Threonin Kinase B-Raf kodiert und in mutierter Form bei einigen malignen Tumoren nachweisbar ist. Bei Darmkrebs gibt es mehrere Varianten von *BRAF*-Mutationen. Der häufigste Typ ist V600E [43]. Die Mutation ist bei 5-15 % der KRK nachweisbar und ist mit Nikotinkonsum, höherem Alter und dem weiblichen Geschlecht verbunden und mit einem fortgeschrittenen Krebsstadium assoziiert [43,44].

Mehrere Studien berichten über einen Zusammenhang zwischen den *KRAS*-Mutationen und einer schlechten Prognose von KRK [45]. Aktivierte *KRAS*-Mutationen werden in 35-45 % der KRK-Fälle berichtet und treten in Codon 12 und 13 auf, dabei wird das Aspartat durch Glycin substituiert [46]. *KRAS*-mutierte KRK werden bei Patienten mit rechtsseitiger Lokalisation und Tumoren in höherem Stadium beobachtet [47]. *KRAS* gehört zur RAS-Genfamilie und codiert für ein monomeres G-Protein, das eine

Einleitung

wichtige Rolle in der Proliferation von malignen Tumoren spielt. Es greift in die Signaltransduktionswege ein, welche das Zellwachstum und die Differenzierung regulieren. Es ist ein membrangebundenes GTP/GDP-bindendes Protein mit intrinsischer GTPase-Aktivität. Die meisten Mutationen finden bei *KRAS* 85 %, seltener bei *NRAS* 15 % und *HRAS* <1% statt [48].

1.5 Biomarker und NDRG1

Biomarker (BM) sind Parameter, die biologische Prozesse messbar machen und als Indikator für verschiedene Krankheiten hinzugezogen werden können. Sie sind objektive und quantifizierbare Merkmale biologischer Prozesse [49]. Ein prognostischer BM liefert Hinweise auf den individuellen Verlauf der Erkrankung. Eine *BRAF*-Mutation ist ein prognostischer Biomarker für das KRK, der bei Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität (MSS), besonders im Stadium III, mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist [50].

Es gibt verschiedene Arten von BM, so helfen prädiktive BM die individuell geeignete Therapieoption für den Patienten auszuwählen. Es wird beispielsweise vor der Therapie mit einem Anti-EGFR-Antikörper (AK) das *KRAS*-Gen untersucht. Nur wenn dieses Gen keine Mutation aufweist, kann eine Therapie mit einem gegen den EGF-Rezeptor gerichteten AK erfolgreich sein. So fungiert das *KRAS* Wildtyp-Gen als prädiktiver BM bei dieser Therapie.

Das „N-myc downregulated gene 1“ (*NDRG1*), welches auch unter den Namen *Drg1*, *PROXY-1*, *RTP*, *RIT42* und *Cap43* bekannt ist, ist ein Gen, das an der Zelldifferenzierung beteiligt ist und unter Hypoxie hochreguliert wird. Außerdem ist es ubiquitär im Zytosol vorhanden und wird u.a. durch Metallionen einschließlich Eisen, das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) und verschiedene Stressreize hochreguliert [51–53].

NDRG1 kodiert für ein Protein von 43 kDa aus 394 Aminosäuren. Es ist Teil der Familie der „n-myc herunterregulierten Gene“, die zur Alpha/Beta-Hydrolase-Superfamilie gehören, jedoch ohne ein hydrolytisches katalytisches Zentrum [54]. Weitere Mitglieder sind *NDRG2*, *NDRG3* und *NDRG4*. Doch im Gegensatz zu *NDRG1* sind diese gewebespezifisch [51].

Einleitung

NDRG1 ist ein eisenregulierter Wachstums- und Metastasierungssuppressor, der bei einer Reihe von Tumoren, darunter Bauchspeicheldrüsen-, Prostata- und Brust- und Dickdarmkrebs, eine negative Korrelation mit dem Fortschreiten des Krebses aufweist [55]. Es wurde aber auch in früheren Forschungsarbeiten gezeigt, dass NDRG1 ein Tumorpromotor bei aggressivem Brustkrebs ist [56]. Obwohl NDRG1 oft als „Tumor-metastasierungssuppressor“ in Erscheinung getreten ist, ist seine Rolle im Krebsprozess widersprüchlich [57]. NDRG1 greift in die Zelldifferenzierung ein und beeinflusst das Tumorwachstum und die Metastasierung von KRK. Doch trotz allem bleibt bis jetzt der genaue Mechanismus von NDRG1 bei KRK unaufgeklärt. Zwar zeigen viele Experimente an Krebszelllinien, dass eine Veränderung der Expression des NDRG1 mit der Entwicklung von KRK verbunden ist, dennoch ist eine geringere Anzahl an klinischen Daten verfügbar, um gezielt patientenbezogene Aussagen machen zu können [58].

Auch als ein mutmaßliches Tumormetastasen-Promoter-Gen, das als Marker eine frühe Metastasierung von KRK vorhersagen kann, ist *NDRG1* in der Diskussion. Bis jetzt ist nur sicher, dass die Expression von *NDRG1* nicht durch Alter und Geschlecht beeinflusst wird [59]. Es wird auch vermutet, dass NDRG1 an der Angiogenese und an Mechanismen beteiligt ist, die zur Resistenz gegen bestimmte Krebsmedikamente führen [60].

1.6 Fragestellung

Ziel der heutigen Forschung ist, geeignete prognostische und diagnostische Biomarker zu identifizieren. Das Protein, „N-myc downstream regulated gene 1“ (NDRG1), mit dem sich die vorliegende Arbeit befasst, ist ein Kandidat für einen neuen prognostischen Parameter des KRK, dessen Funktion in der Krebsentstehung Gegenstand aktueller Forschung ist. NDRG1 ist mit der Karzinogenese assoziiert, an Zelldifferenzierung selbst beteiligt und auch prognostisch für verschiedene Metastasen zu sein scheint. NDRG1 ist aufgrund seines wachstumshemmenden Verhaltens als Metastassuppressor ins Licht der Forschung gerückt [61,62].

Studien zum KRK hinsichtlich der NDRG1-Expression sind spärlich vorhanden. Außerdem gibt es generell zahlreiche widersprüchliche Studienergebnisse zu NDRG1.

Einleitung

Laut Joshi et al. ist aufgrund seiner kontextabhängigen und pleiotropen Funktionen NDRG1 nur unzureichend verstanden [63] und es sind generell weitere Studien nötig, da die Auswirkungen von NDRG1 auf die Tumordinvasion und die dahinterstehenden Mechanismen kaum verstanden sind [64].

Diese Arbeit befasst sich mit der immunhistochemischen Validierung des Biomarkers NDRG1 für die peritoneale (PER) und hepatische (HEP) Metastasierung beim KHK. Mit der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob NDRG1 mit unterschiedlichen Metastasierungsmustern korreliert.

Dazu sollten Daten von geeigneten Patienten herausgesucht und je nach Metastasierungsmuster, M0 = ohne Metastasen, HEP = Lebermetastasen, PER = Peritonealmetastasen oder PER/HEP = Leber- und Peritonealmetastasen, in die jeweiligen Kohorten eingeteilt. Anhand entsprechender Gewebsschnitte im pathologischen Institut sollte sichergestellt werden, dass auch entsprechendes Tumorgewebe vorhanden ist. Daraufhin sollten aus den dazugehörigen Paraffinblöcken im Archiv der Pathologie neue Histopräparate angefertigt werden. Diese wurden dann immunhistochemisch gefärbt, mikroskopisch ausgewertet und mit dem Metastasenstatus der Patienten verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU und der Viszeralchirurgie wurden die vier folgenden Patientenkohorten identifiziert: Patienten ohne Metastasen (M0), mit Lebermetastasen (HEP), mit Peritonealmetastasen (PER) und Patienten sowohl mit Leber- als auch mit Peritonealmetastasen.

In der Datenbank der Viszeralchirurgie konnten 106 Patienten identifiziert werden, die am KRK erkrankt waren und sich zwischen 2003 und 2016 einer Resektion unterzogen haben, die letzten Nachuntersuchungen erfolgten 2019. Die Patienten wurden mit dem Tumorregister abgeglichen und in Kohorten eingeteilt. Anschließend wurden die entsprechenden Hämatoxilin-Eosin-(HE-)gefärbten Schnitte aus dem Pathologischen Archiv herausgesucht und erneut mikroskopiert, um geeignete tumortragende Paraffinblöcke zu identifizieren. Von diesen Blöcken wurden Leerschnitte (ungefärbte Schnittpräparate des in Paraffin eingebetteten Gewebematerials) angefertigt, die dann immunhistochemisch gefärbt wurden.

2.2 Durchführung und Auswertung der Immunhistochemie

Für die NDRG1-Immunhistochemie wurde ein monoklonaler NDRG1 Rabbit anti-Human Antikörper (Abcam, Großbritannien, ab133572) verwendet. Es fand eine Hitzevorbehandlung mit Target Retrieval Solution (Agilent Technologies, S1699) statt. Anschließend wurde der Primärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Als Detektionssystem wurde das ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit (Vector Laboratories, Newark, USA; MP-7401) verwendet. Die Färbung wurde mit Chromogen DAB+ (Agilent Technologies; K3468) und die Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories; H-3401) durchgeführt.

Die Auswertung der mit Anti-NDRG1 gefärbten Schnitte erfolgte doppelverblindet zusammen mit Prof. Dr.med. Neumann. Diskordante Fälle wurden gemeinsam mikroskopiert und ein Konsensus-Score wurde erstellt.

Zur Beurteilung wurde der Histoscore (H-Score) verwendet. Beim H-Score handelt es sich um ein semiquantitatives Verfahren, in dem der Anteil der Zellen anhand der Intensität ihrer immunhistochemischen Markierung im Vergleich zum umliegenden Gewebe in Gruppen unterteilt wird (Tabelle 1): Als schwache Anfärbung wurde eine Anfärbung von weniger als 30 % der Zellkerne und des Zytoplasmas, als moderate Anfärbung 30-70 % und als starke Anfärbung über 70 % definiert (Abbildung 5). Die jeweilige Prozentzahl wird mit dem jeweiligen Gruppenwert multipliziert und anschließend zu den anderen Gruppen addiert.

$$\text{H-Score} = \text{„\% in 0“} \times 0 + \text{„\% in 1“} \times 1 + \text{„\% in 2“} \times 2 + \text{„\% in 3“} \times 3$$

Diese Rechnung ergibt einen semiquantitativen Wert, mit dem die Färbeintensität und Menge der angefärbten Zellen pro Schnitt verglichen werden kann.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung nach Anfärbeintensitäten

| | Gruppe 0 | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gruppe 3 |
|--|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Intensität der Anfärbung [%] | Keine 0 | Schwach < 30 | Moderat 30-70 | Stark > 70 |
| Multiplikationsfaktor | 0 | 1 | 2 | 3 |

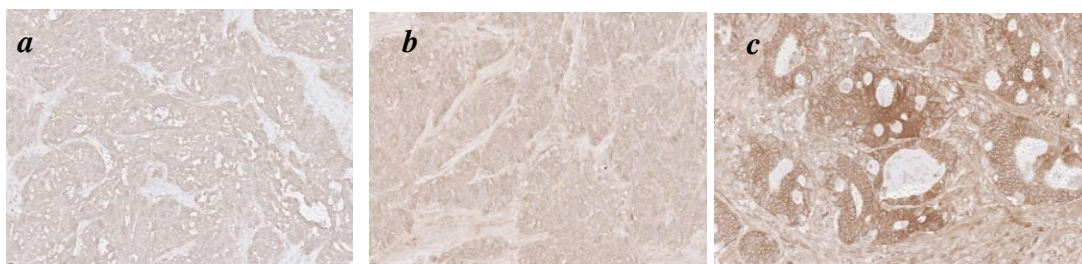


Abbildung 5: NDRG1-Immunhistochemische Färbung (a) schwache Färbung, (b) mäßige Färbung, (c) starke Färbeintensität

2.3 Statistik

Für die Beschreibung von kontinuierlichen Variablen wurde der Median zusammen mit Minimum und Maximum angegeben. Für die Beschreibung von kategorialen Variablen wurden die Häufigkeiten und der Anteil angegeben. Um zu testen, ob kontinuierliche Variablen zwischen zwei Gruppen signifikant unterschiedlich sind, wurde der

Material und Methoden

Mann-Whitney-U-Test verwendet. Wurden mehr als zwei Gruppen auf Unterschiede getestet, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei kategorialen Variablen, zwischen zwei oder auch mehreren Gruppen, fand Fisher's exakter Test Anwendung. Überlebenskurven wurden als Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Statistisch signifikante Unterschiede in Überleben zwischen zwei oder mehreren Gruppen wurden mittels Logs rank-Test getestet. p-Werte unter 0,05 werden als ein statistisch signifikantes Ergebnis gewertet.

3 Ergebnisse

Die Analysen wurden mit den Daten von 106 Patienten durchgeführt. Diese Kohorte wurde je nach Metastasenlokalisierung in 4 verschiedene Gruppen unterteilt: Die Gruppe „M0“ bestand aus 31 (29,2 %) Patienten ohne Metastasen. Die anderen 3 Gruppen beinhalteten jeweils Patienten mit Metastasen, entweder in der Leber (Gruppe HEP, n=30 (28,3 %)) oder im Peritoneum (Gruppe PER, n=25 (23,6 %)) oder sowohl in der Leber als auch im Peritoneum (Gruppe HEP+PER, n=20 (18,9 %)).

3.1 Vergleich der Patientenkohorten

Die Charakteristika dieser 106 Patienten sind in Tabelle zusammengefasst. Von den Patienten waren 55 (51,9%) weiblich und 51 (48,1%) männlich. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Geschlechtsverteilung zwischen den Gruppen ($p=0,84$). Das mediane Alter in der Kohorte war 66 Jahre, wobei das Alter zwischen 34 und 90 Jahren variierte. Das Alter der Patienten der Gruppen unterschied sich nicht signifikant ($p=0,32$). Die Seite, an der der Primärtumor aufgetreten ist, war zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,62$).

Tabelle 2: Patientencharakteristika

| Charakteristik | Alle Patienten (n=106) | M0 (n=31) | HEP (n=30) | PER (n=25) | HEP + PER (n=20) | P* |
|------------------------------|------------------------|-------------|------------|------------|------------------|--------|
| Geschlecht | | | | | | |
| Männlich | 51 (48,1%) | 16 (51,6%) | 15 (50,0%) | 10 (40,0%) | 10 (50,0%) | 0,8378 |
| Weiblich | 55 (51,9%) | 15 (48,4%) | 15 (50,0%) | 15 (60,0%) | 10 (50,0%) | |
| Alter (Jahre) | 66 (34-90) | 66 (43-90) | 71 (40-84) | 65 (46-83) | 65 (34-88) | 0,3165 |
| Seite des Primärtumors | | | | | | |
| Rechts | 35 (33,0%) | 8 (25,8%) | 8 (26,7%) | 11 (44,0%) | 8 (40,0%) | 0,6191 |
| Links | 64 (60,4%) | 20 (64,5%) | 21 (70,0%) | 12 (48,0%) | 11 (55,0%) | |
| Mittig | 7 (6,6%) | 3 (9,7%) | 1 (3,3%) | 2 (8,0%) | 1 (5,0%) | |
| T-Stadium | | | | | | |
| 0 | 1 (0,9%) | 1 (3,2%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | <0,001 |
| 1 | 7 (6,6%) | 6 (19,4%) | 1 (3,3%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | |
| 2 | 8 (7,5%) | 6 (19,4%) | 2 (6,7%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | |
| 3 | 55 (51,9%) | 14 (45,2%) | 25 (83,3%) | 5 (20,0%) | 11 (44,0%) | |
| 4 | 35 (33,0%) | 4 (12,9%) | 2 (6,7%) | 20 (80,0%) | 9 (36,0%) | |
| N-Stadium | | | | | | |
| 0 | 33 (31,1%) | 19 (61,3%) | 9 (30,0%) | 3 (12,0%) | 2 (10,0%) | <0,001 |
| 1 | 34 (32,1%) | 6 (19,4%) | 11 (36,7%) | 12 (48,0%) | 5 (25,0%) | |
| 2 | 39 (36,8%) | 6 (19,4%) | 10 (33,3%) | 10 (40,0%) | 13 (65,0%) | |
| Zeitpunkt der Metastasierung | | | | | | |
| Keine | 31 (29,2%) | | | | | 0,1864 |
| Synchron | 52 (49,1%) | 0 (0,0%) | 22 (73,3%) | 14 (56,0%) | 16 (80,0%) | |
| Metachron | 23 (21,7%) | 0 (0,0%) | 8 (26,7%) | 11 (44,0%) | 4 (20,0%) | |
| Graduierung | | | | | | |
| 1 | 1 (0,9%) | 3 (9,7%) | 1 (3,3%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0,6467 |
| 2 | 57 (53,8%) | 17 (54,8%) | 16 (53,3%) | 13 (52,0%) | 11 (55,0%) | |
| 3 | 44 (41,5%) | 11 (35,5%) | 13 (43,4%) | 12 (48,0%) | 8 (40,0%) | |
| 4 | 1 (0,9%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 1 (5,0%) | |
| Perforation | | | | | | |
| Nein | 94 (88,7%) | 31 (100,0%) | 29 (96,7%) | 22 (88,0%) | 12 (60,0%) | <0,001 |
| Ja | 12 (11,3%) | 0 (0,0%) | 1 (3,3%) | 3 (12,0%) | 8 (40,0%) | |

*Der p-Wert bezieht sich auf den Test, ob zwischen den Gruppen M0, HEP, PER und HEP+PER Unterschiede vorliegen. #Die Gruppe M0 wurde von dem Test ausgeschlossen. Kontinuierliche Variablen wurden als Median (Minimum-Maximum) und kategoriale Variablen als Häufigkeit (%) zusammengefasst.

Ergebnisse

So wiesen die Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied in der T-Kategorie auf: In den Gruppen mit Metastasen gab es mehr Patienten in einem höheren T-Stadium (Infiltrationstiefe in die Darmwand) als in der M0-Gruppe ($p < 0,001$). In den Patientengruppen mit Fernmetastasen ist auch das N-Stadium (Befall lokoregionärer Lymphknoten) in der Regel höher als in der Gruppe ohne Fernmetastasen ($p < 0,001$).

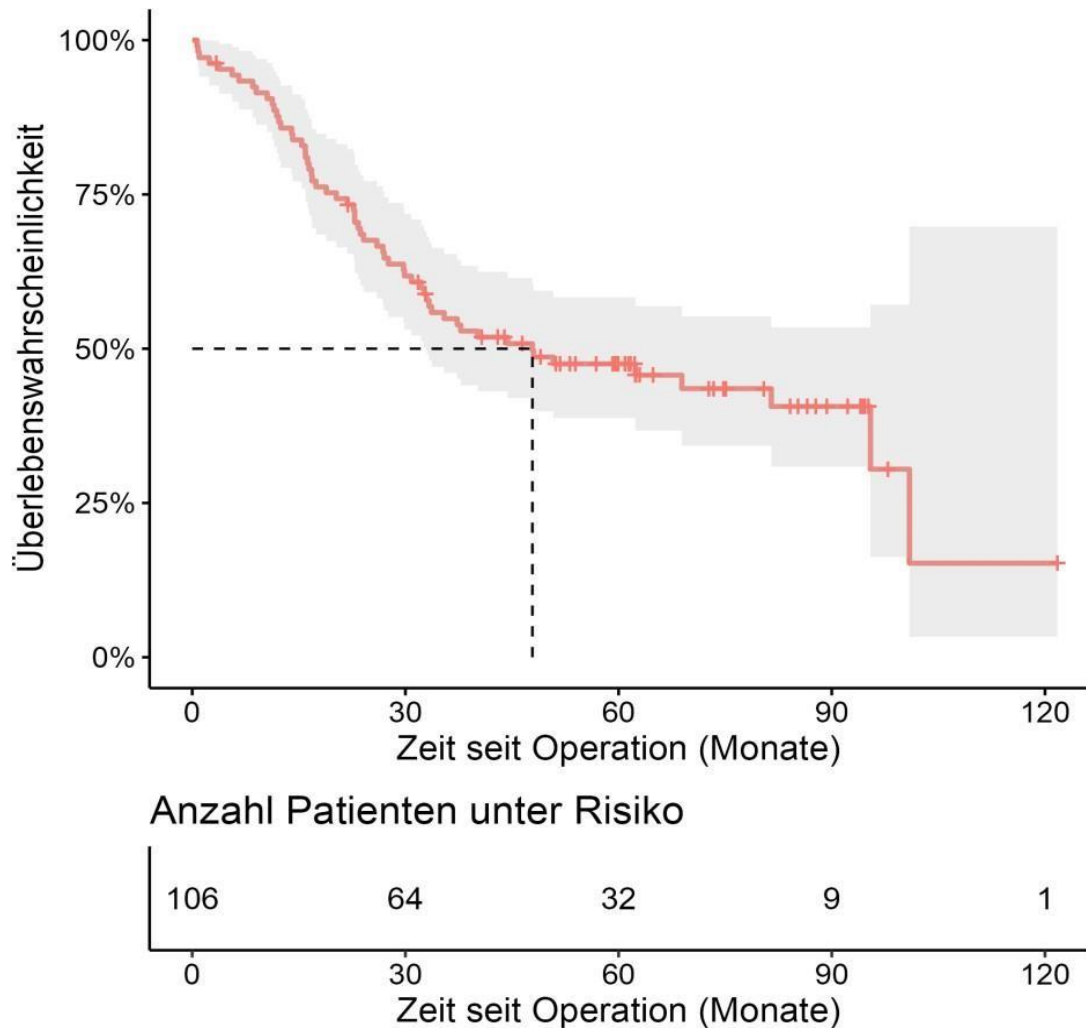
Was den Zeitpunkt der Metastasierung angeht (synchron vs. metachron), unterscheiden sich die Gruppen mit Metastasierung nicht signifikant voneinander ($p = 0,19$). Den meisten Tumoren wurde ein Grad 2 oder 3 zugeordnet. Die Graduierung unterscheidet sich nicht statistisch signifikant zwischen den 4 Patientengruppen (0,65). Eine Perforation wurde in der M0-Gruppe gar nicht und in der HEP+PER-Gruppe bei 8 (40 %) Patienten nachgewiesen. Der Unterschied in der Anzahl der Patienten mit Perforation ist zwischen den Gruppen statistisch signifikant ($p < 0,001$). In der Gruppe ohne Fernmetastasen werden keine Perforationen beobachtet im Gegensatz zur Gruppe mit Fernmetastasen. Die meisten Perforationen sind in der Gruppe der Patienten, die sowohl Leber- als auch Peritonealmetastasen haben.

Sowohl die meisten Lebermetastasen (83,3 %) als auch ein gleichzeitiger Befall von Leber und Peritoneum (44,0 %) waren bei Patienten im UICC-Stadium III nachweisbar. Im Stadium IV konnte eine Häufung von Peritonealmetastasen festgestellt werden. 80 % aller Metastasen des Peritoneums sind allein in diesem Stadium zu finden, auch ein gemeinsamer Befall von Leber und Peritoneum (HEP+PER) ist im Stadium IV gehäuft (36 % aller HEP+PER) vorzufinden.

Nur bei 6,6 % aller Patienten wurde der Primärtumor im Colon transversum (in der Tabelle als Lokalisation „mittig“ angegeben) diagnostiziert. Von diesen 7 Patienten sind nur bei 4 Fernmetastasen gefunden worden, wovon die Hälfte Peritonealmetastasen (PER) waren.

3.2 Gesamtüberleben (Overall survival)

Das Überleben in der gesamten Kohorte der 106 Patienten ist in Abbildung 6 dargestellt. Das mediane Überleben in der Kohorte lag bei 48 Monaten nach einem operativen Eingriff. Insgesamt sind in diesem Zeitraum von den 106 Patienten 59 (55,7 %) verstorben. Die Abbildung zeigt die Anzahl der Patienten, die auch nach 30, 60, 90 und 120 Monaten noch leben. Der grau schattierte Bereich stellt das 95 %-Konfidenz-



zintervall zu der Überlebenskurve dar.

Abbildung 6: Gesamtüberleben in der Patientenkohorte

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=106; Die gestrichelte Linie zeigt das mediane Überleben nach dem operativen Eingriff, grau ist das 95%-Konfidenzintervall der Überlebenskurve

Ergebnisse

Abbildung 7 zeigt das Überleben in den 4 Gruppen M0, HEP, PER und HEP+PER. Das längste Überleben wird in der M0-Gruppe beobachtet, wo insgesamt 4 Patienten im Beobachtungszeitraum verstarben. In der HEP-Gruppe überlebten im Beobachtungszeitraum mehr Patientinnen und Patienten (im Median 82 Monate, insgesamt 15 Todesfälle) als in den beiden Gruppen PER und HEP+PER, wo das mediane Überleben 23 Monate (PER, 22 Todesfälle) bzw. 25 Monate (HEP+PER, 18 Todesfälle) betrug. Insgesamt weisen die Überlebenskurven einen statistisch signifikanten Unterschied auf ($p < 0,001$). Aufgrund der zum Teil nur sehr kleinen Gruppengröße wurde auf die Darstellung der Konfidenzintervalle verzichtet.

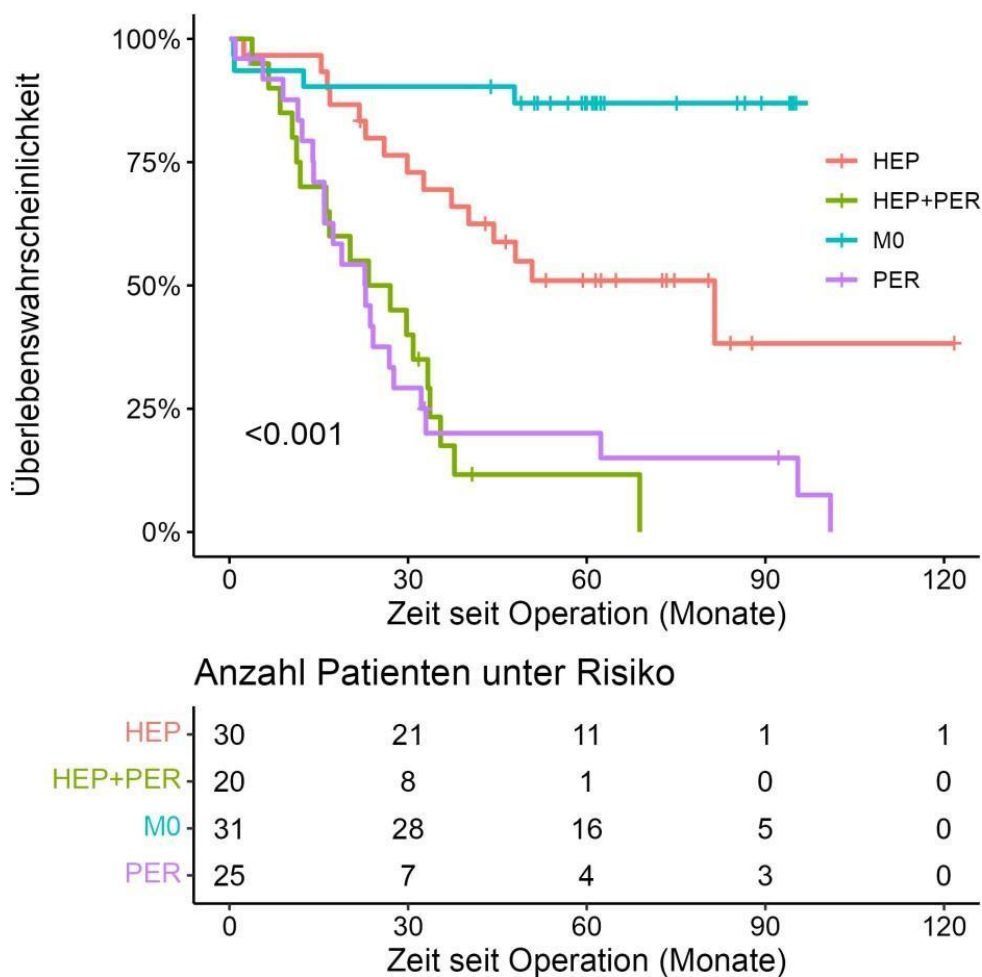


Abbildung 7: Gesamtüberleben in der Patientenkohorte nach Gruppen

Kaplan Meyer Überlebenskurve; Die gestrichelte Linie zeigt das mediane Überleben nach dem operativen Eingriff; M0 (KRK-Patienten ohne Metastasen), HEP (KRK-Patienten mit Lebermetastasen), PER (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) und HEP+PER (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum).

Ergebnisse

In weiteren Analysen wurden die Gruppen HEP, HEP+PER und PER in unterschiedlichen Kombinationen miteinander verglichen. Abbildung 8 zeigt das Überleben für die Gruppen HEP+PER und PER. Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied im medianen Überleben zwischen den beiden Patientengruppen ($p=0,9$). Zusätzliche Lebermetastasen verschlechtern das Überleben bei den Patienten mit peritonealen Metastasen nicht.

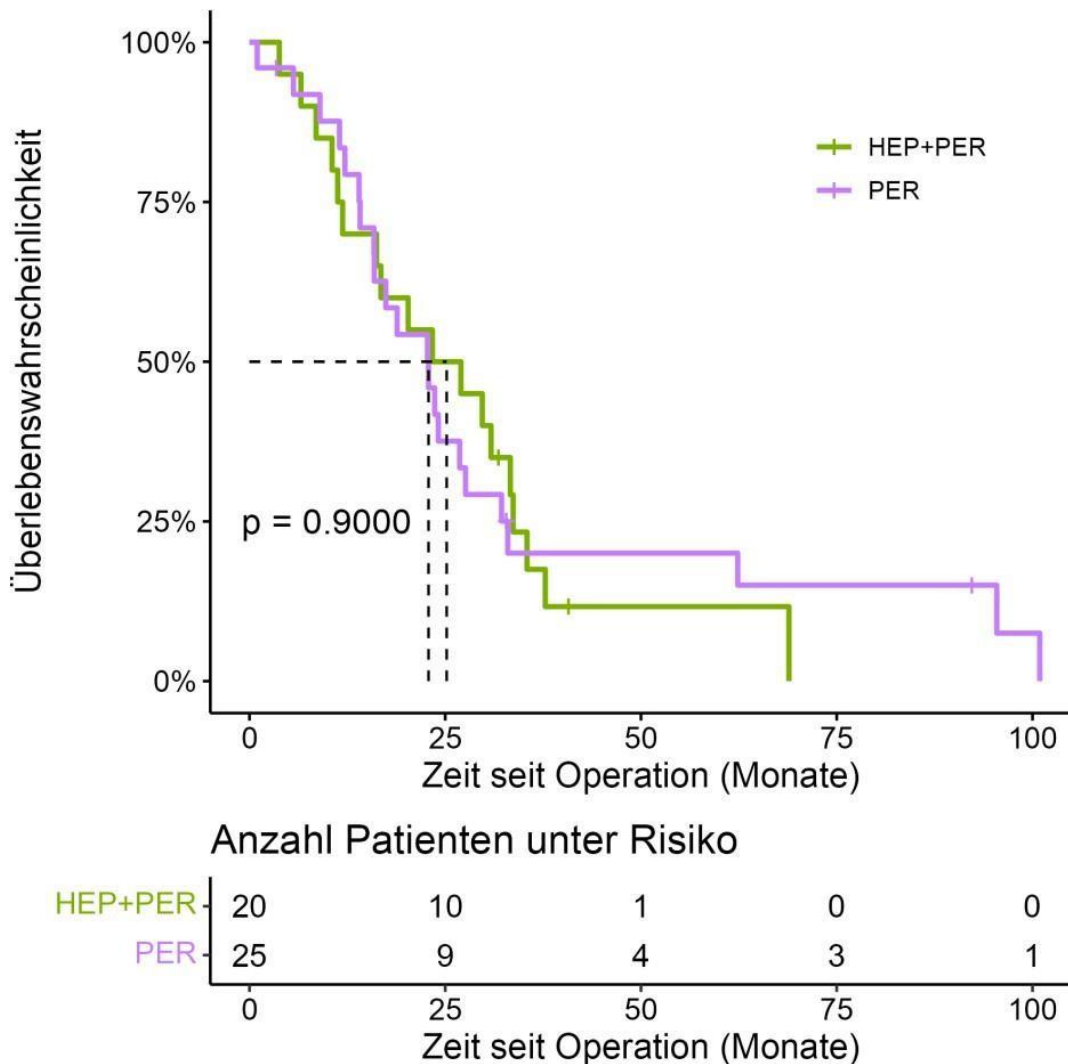


Abbildung 8: Medianes Überleben und Gesamtüberleben in den Gruppen PER und HEP+PER

Kaplan Meyer Überlebenskurve; Die gestrichelten Linien zeigen das mediane Überleben nach dem operativen Eingriff; PER (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) und HEP+PER (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum).

Ergebnisse

Abbildung 9 zeigt das Gesamtüberleben in den Gruppen HEP und HEP+PER. Es gab einen statistisch signifikanten Unterschied im Überleben zwischen den beiden Patientengruppen ($p < 0,0001$). Dabei zeigt die Patientengruppe mit Lebermetastasen deutlich besseres Überleben als die Gruppe mit Leber- und peritonealen Metastasen. Zusätzliche peritoneale Metastasen verschlechtern das Überleben signifikant.

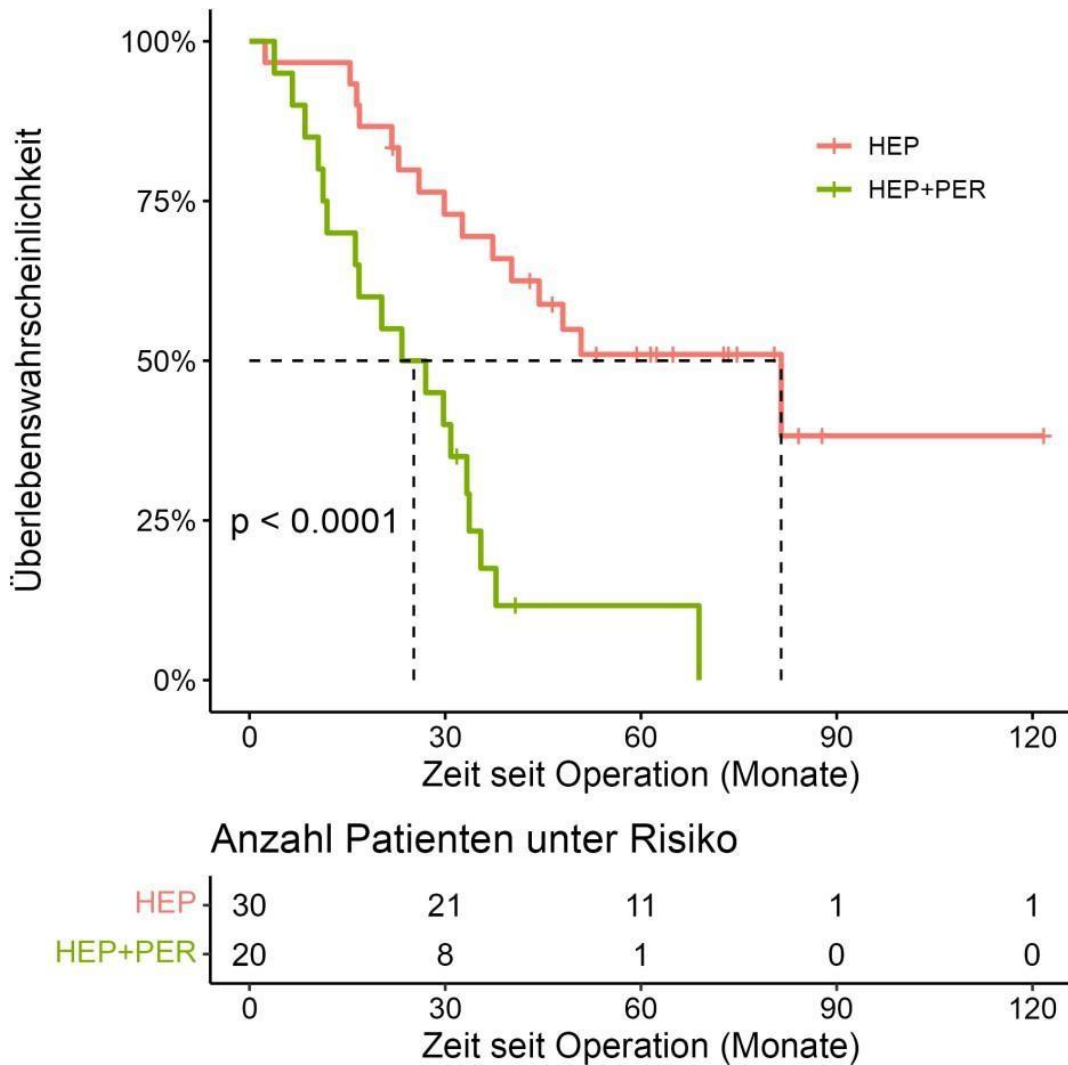


Abbildung 9: Gesamtüberleben in den Gruppen HEP und HEP+PER

Kaplan Meyer Überlebenskurve; Die gestrichelten Linien zeigen das mediane Überleben nach dem operativen Eingriff; HEP (KRK-Patienten mit Lebermetastasen), HEP+PER (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum).

Ergebnisse

In Abbildung 10 ist das Überleben in den Gruppen HEP und PER dargestellt. Es gibt einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil in der Gruppe mit Lebermetastasen verglichen mit den Patienten mit peritonealen Metastasen ($p=0,0007$).

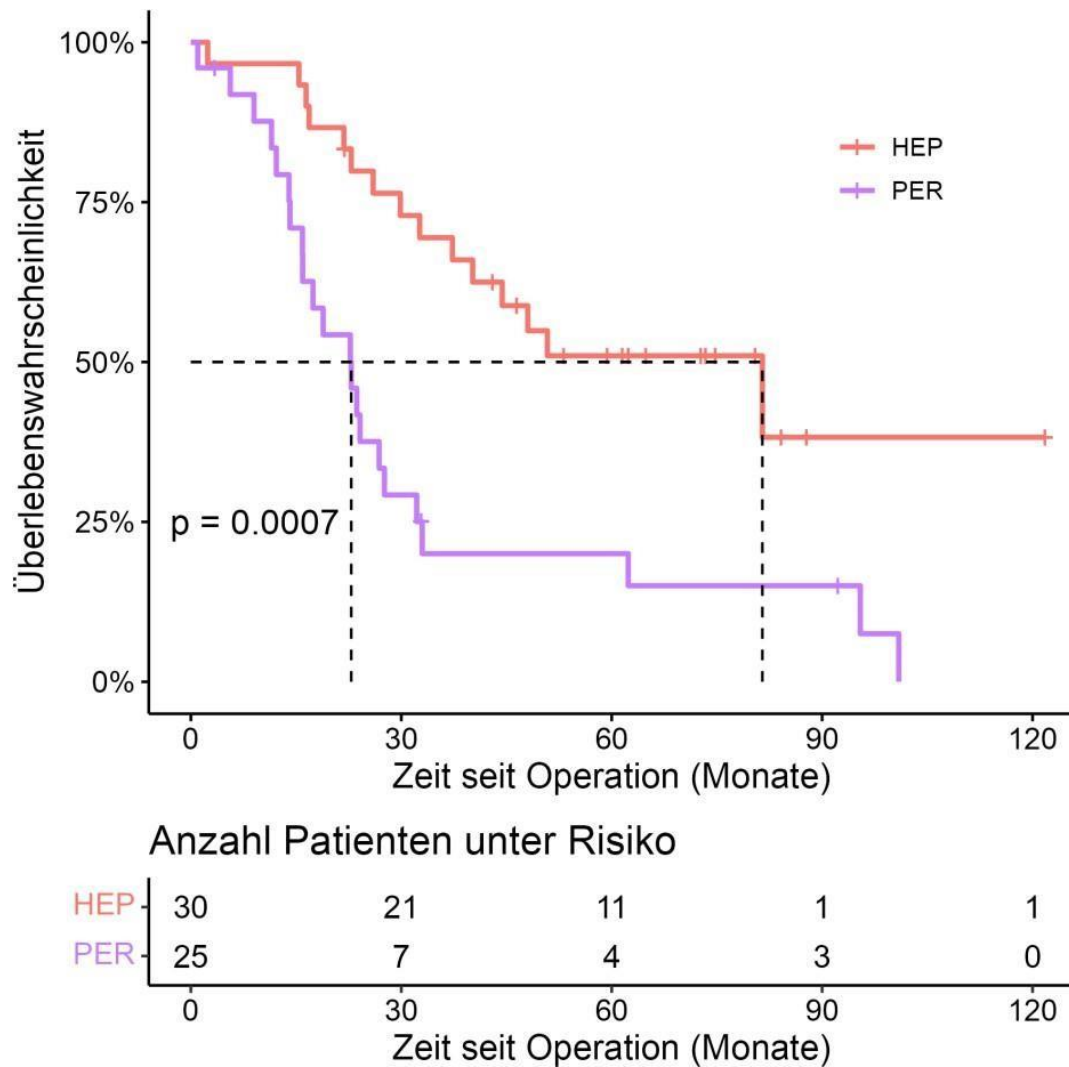


Abbildung 10: Gesamtüberleben in den Gruppen HEP und PER

Kaplan Meyer Überlebenskurve; Die gestrichelte Linie zeigt das mediane Überleben nach dem operativen Eingriff; HEP (KRK-Patienten mit Lebermetastasen), PER (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen)

3.3 Überlebenskurven in Abhängigkeit von der NDRG1-Expression

Um den Anteil am Gesamtüberleben der verschiedenen Patientenkohorten grafisch darzustellen, wurden Überlebenskurven (engl. survival curves) erstellt. Innerhalb der Patientenkohorten konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Expression des NDRG1 einen Rückschluss auf das Überleben zulässt.

3.3.1 Bestimmung der H-Scores

Damit zwei gleich große Gruppen von Patienten verglichen werden können, wurde der Median des H-Scores nach der Markierung des NDRG1 in den Zellkernen und im Zytoplasma als Trennlinie zwischen den Gruppen definiert. Der mediane H-Score für das Zytoplasma lag bei 180 und für die Zellkerne bei 45. Somit wurden zwei Gruppen gebildet. Diese beiden Gruppen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: H-Scores für Zytoplasma und Zellkerne

| H-Score | n | Median (Min - Max) | n < Median | n ≥ Median |
|------------|-----|-----------------------|------------|------------|
| Zytoplasma | 106 | 180 (90 - 280) | 54 | 52 |
| Zellkerne | 105 | 45 (15 - 200) | 54 | 51 |

Weiterhin sind die H-Score-Werte der Gruppen in Abbildung 11 (für Zytoplasma) und Abbildung 12 (für Kerne) dargestellt. Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied im H-Score für Zytoplasma zwischen den Patientengruppen ($p=0,7999$). Das Gleiche gilt für den H-Score für Kerne ($p=0,1424$).

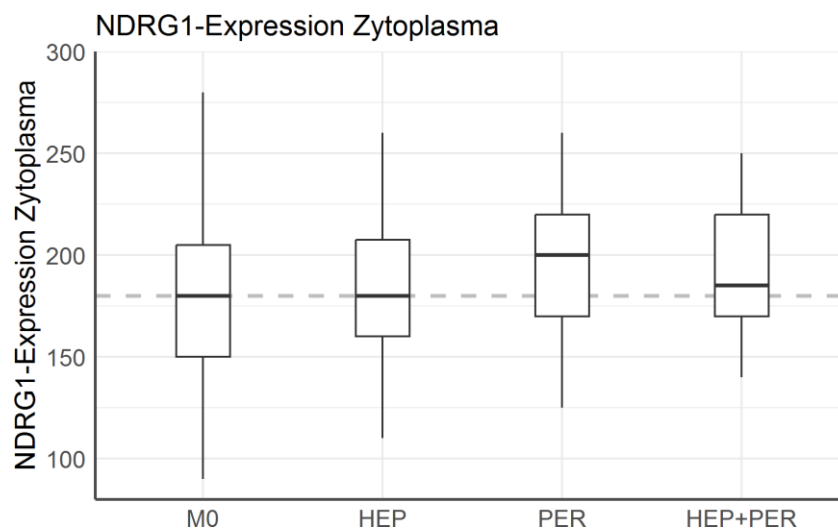


Abbildung 11: H-Score für die Expression von NDRG1 im Zytoplasma

N=106; nach immunhistochemischer Färbung des Tumors, Berechnung des H-Scores; M0 = KRK-Patienten ohne Metastasen; HEP (KRK-Patienten mit Lebermetastasen); PER (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen); HEP+PER (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum); gestrichelte Linie: Median über Gesamtkohorte.

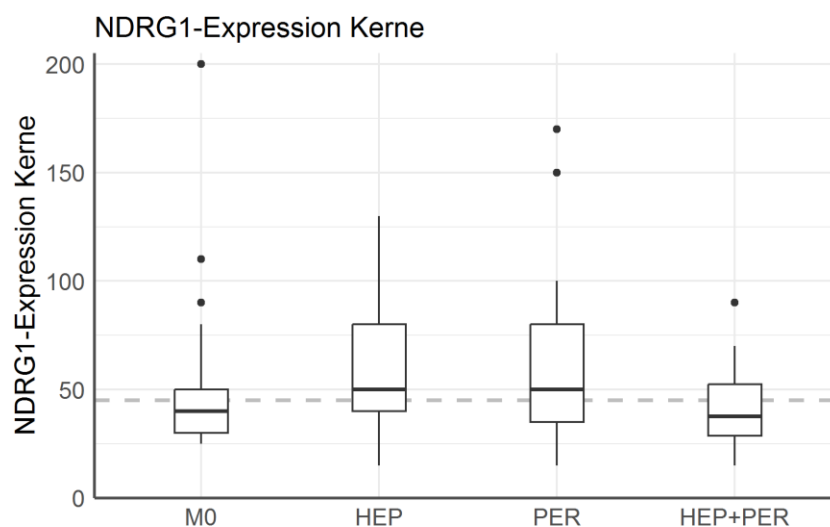


Abbildung 12: H-Score für die Expression von NDRG1 in den Kernen

N=106; nach immunhistochemischer Färbung des Tumors, Berechnung des H-Scores; M0 = KRK-Patienten ohne Metastasen; HEP (KRK-Patienten mit Lebermetastasen); PER (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen); HEP+PER (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum); gestrichelte Linie: Median über Gesamtkohorte.

Ergebnisse

Tabelle und Tabelle zeigen die Patientencharakteristika für die beiden Gruppen, die durch den Split am Median des H-Scores entstanden sind. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede der Patientencharakteristika zwischen den entstandenen Gruppen.

Tabelle 4: Patientencharakteristika in Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zur H-Score-Zytoplasma-Gruppe

| Charakteristik | H-Score <180 (n=54) | H-Score ≥180 (n=52) | P |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Gruppe | | | |
| M0 | 16 (29,6%) | 15 (28,8%) | 0,9927 |
| HEP | 16 (29,6%) | 14 (26,9%) | |
| PER | 12 (22%) | 13 (25,0%) | |
| HEP+PER | 10 (18,5%) | 10 (19,2%) | |
| Geschlecht | | | |
| Männlich | 30 (55,6%) | 21 (40,4%) | 0,1259 |
| Weiblich | 24 (44,4%) | 31 (59,6%) | |
| Alter (Jahre) | 64 (34-84) | 68 (40-90) | 0,1801 |
| Seite des Primärtumors | | | |
| Rechts | 17 (31,5%) | 18 (34,6%) | 0,1931 |
| Links | 31 (57,4%) | 33 (63,5%) | |
| Mittig | 6 (11,1%) | 1 (1,9%) | |
| T-Stadium | | | |
| 0 | 0 (0,0%) | 1 (1,9%) | 0,9999 |
| 1 | 4 (7,4%) | 3 (5,8%) | |
| 2 | 4 (7,4%) | 4 (7,7%) | |
| 3 | 28 (51,9%) | 27 (51,9%) | |
| 4 | 18 (33,3%) | 17 (32,7%) | |
| N-Stadium | | | |
| 0 | 17 (31,5%) | 16 (30,8%) | 0,2193 |
| 1 | 21 (38,9%) | 13 (25,0%) | |
| 2 | 16 (29,6%) | 23 (44,2%) | |
| Zeitpunkt der Metastasierung | | | |
| Keine | 16 (29,6%) | 15 (28,8%) | 0,2692 |
| Metachron | 15 (27,8%) | 8 (15,4%) | |
| Synchron | 23 (42,6%) | 29 (55,8%) | |
| Metastasierung | | | |
| Keine | 16 (29,6%) | 15 (28,8%) | 0,9999 |
| Metastasiert | 38 (70,4%) | 37 (71,2%) | |
| Graduierung | | | |
| 1 | 4 (7,4%) | 0 (0,0%) | 0,1753 |
| 2 | 29 (53,7%) | 28 (53,8%) | |
| 3 | 21 (38,9%) | 23 (44,2%) | |
| 4 | 0 (0,0%) | 1 (1,9%) | |

Ergebnisse

| Charakteristik | H-Score <180 (n=54) | H-Score ≥180 (n=52) | P |
|----------------|---------------------|---------------------|--------|
| Perforation | | | |
| Nein | 45 (83,3%) | 49 (94,2%) | 0,1236 |
| Ja | 9 (16,7%) | 3 (5,8%) | |

Tabelle 5: Patientencharakteristika in Abhängigkeit von der H-Score-Kern-Gruppe

| Charakteristik | H-Score <45 (n=54) | H-Score ≥45 (n=51) | P |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| Gruppe | | | |
| M0 | 21 (38,9%) | 10 (19,6%) | 0,0619 |
| HEP | 12 (22,2%) | 17 (33,3%) | |
| PER | 9 (16,7%) | 16 (31,4%) | |
| HEP+PER | 12 (22,2%) | 8 (15,7%) | |
| Geschlecht | | | |
| Männlich | 25 (46,3%) | 26 (51,0%) | 0,6979 |
| Weiblich | 29 (53,7%) | 25 (49,0%) | |
| Alter (Jahre) | 65 (34-84) | 70 (40-90) | 0,0772 |
| Seite des Primärtumors | | | |
| Rechts | 18 (33,3%) | 17 (33,3%) | 0,6029 |
| Links | 31 (57,4%) | 32 (62,7%) | |
| Mittig | 5 (9,3%) | 2 (3,9%) | |
| T-Stadium | | | |
| 0 | 0 (0,0%) | 1 (2,0%) | 0,5447 |
| 1 | 5 (9,3%) | 2 (3,9%) | |
| 2 | 5 (9,3%) | 3 (5,9%) | |
| 3 | 25 (46,3%) | 29 (56,9%) | |
| 4 | 19 (35,2%) | 16 (31,4%) | |
| N-Stadium | | | |
| 0 | 19 (35,2%) | 14 (27,5%) | 0,6281 |
| 1 | 17 (31,5%) | 16 (31,4%) | |
| 2 | 18 (33,3%) | 21 (41,2%) | |
| Zeitpunkt der Metastasierung | | | |
| Keine | 21 (38,9%) | 10 (19,6%) | 0,0971 |
| Metachron | 10 (18,5%) | 12 (23,5%) | |
| Synchron | 23 (42,6%) | 29 (56,9%) | |
| Metastasierung | | | |
| Keine | 21 (38,9%) | 10 (19,6%) | 0,0346 |
| Metastasiert | 33 (61,1%) | 41 (80,4%) | |
| Graduierung | | | |
| 1 | 2 (3,7%) | 2 (3,9%) | 0,9090 |
| 2 | 30 (55,6%) | 26 (51,0%) | |
| 3 | 22 (40,7%) | 22 (43,1%) | |
| 4 | 0 (0,0%) | 1 (2,0%) | |

Ergebnisse

| Charakteristik | H-Score <45 (n=54) | H-Score ≥45 (n=51) | P |
|----------------|--------------------|--------------------|--------|
| Perforation | | | |
| Nein | 47 (87,0%) | 46 (90,2%) | 0,7617 |
| Ja | 7 (13,0%) | 5 (9,8%) | |

3.3.2 Überlebenskurven für NDRG1 (H-Score Zytoplasma)

3.3.2.1 KRK-Patienten ohne Metastasierung (M0)

Abbildung 13 zeigt das Gesamtüberleben in der M0-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für Zytoplasma, dabei wurde der Gesamtmedian als Grenze der Gruppenzugehörigkeit verwendet. Im Beobachtungszeitraum wurde in der gesamten M0-Gruppe ein Überleben von 80 % festgestellt. Ein statistisch signifikanter Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,9615$) bestand jedoch nicht.

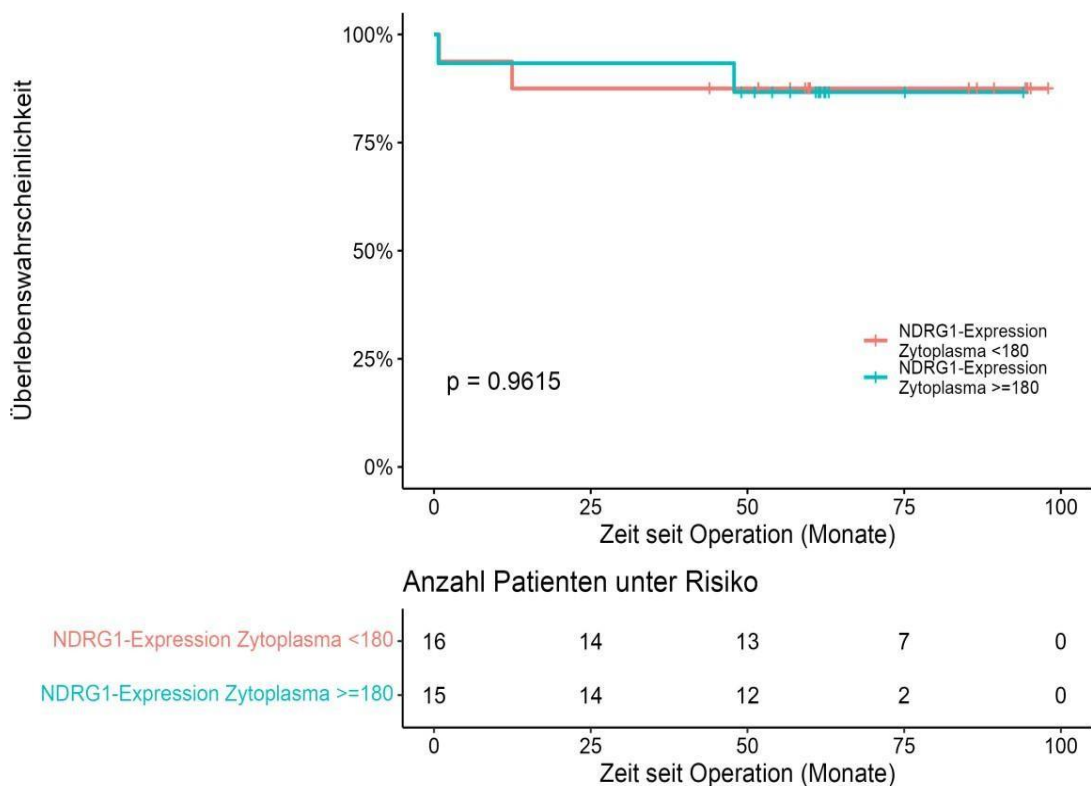


Abbildung 13: Gesamtüberleben in der M0-Gruppe (KRK-Patienten ohne Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma

Kaplan Meyer Überlebenskurve; $n=31$; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 im Zytoplasma und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 180.

Ergebnisse

3.3.2.2 KRK-Patienten mit alleiniger Lebermetastasierung (HEP)

Abbildung 14 zeigt das Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für Zytoplasma. Zwar gibt es keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,1168$), die Überlebensrate in der H-Score-Gruppe <180 war in den ersten 80 Monaten höher als in der H-Score-Gruppe ≥ 180 . Dies belegt auch das mediane Überleben in der Gruppe mit H-Score < 180 mit 82 Monaten und in der Gruppe mit H-Score ≥ 180 mit nur 39 Monaten. Allerdings glichen sich die Überlebensraten in den beiden Gruppen nach 80 Monaten plötzlich an, da 7 Patienten in der <180 Gruppe fast zeitgleich verstarben.

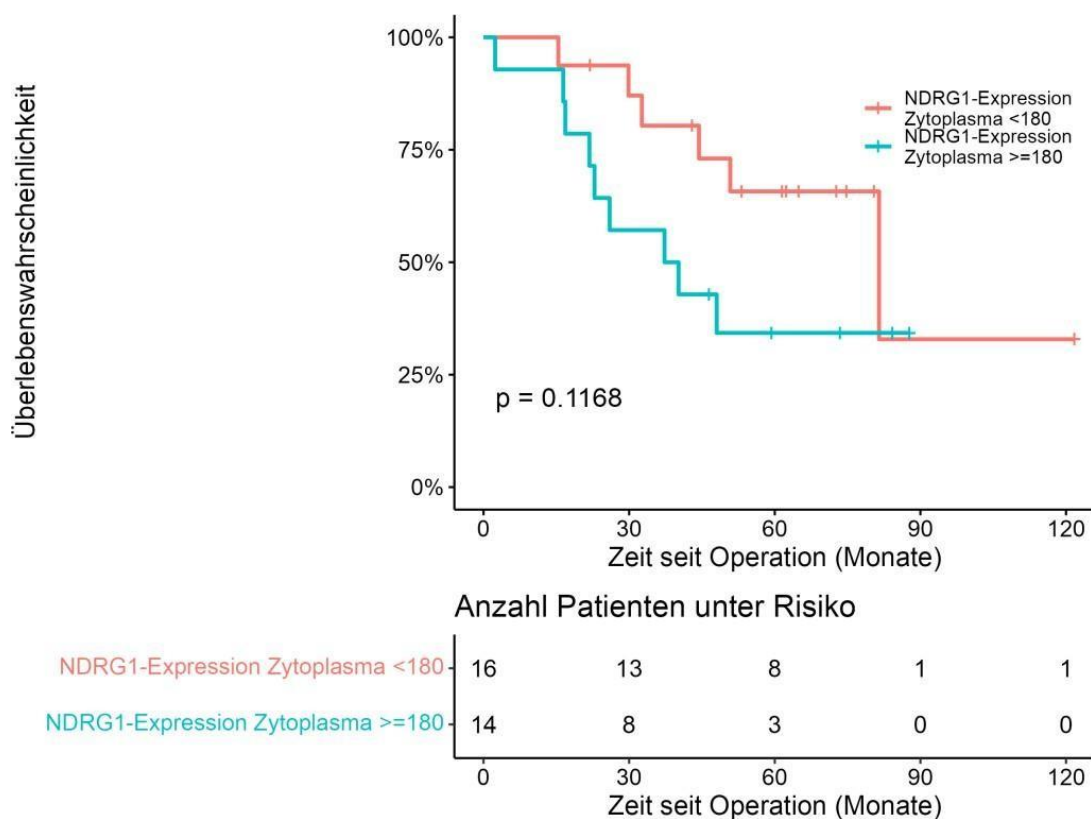


Abbildung 14: Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe (KRK-Patienten mit Lebermetastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma

Kaplan Meyer Überlebenskurve; $n=30$; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 im Zytoplasma und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 180.

Ergebnisse

3.3.2.3 KRK-Patienten mit alleiniger peritonealer Metastasierung (PER)

Abbildung 15 zeigt das Gesamtüberleben in der PER-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für Zytoplasma. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,5269$). Die beiden Überlebenskurven verlaufen fast deckungsgleich. Das mediane Überleben ist in beiden Gruppen mit 23 Monaten identisch.

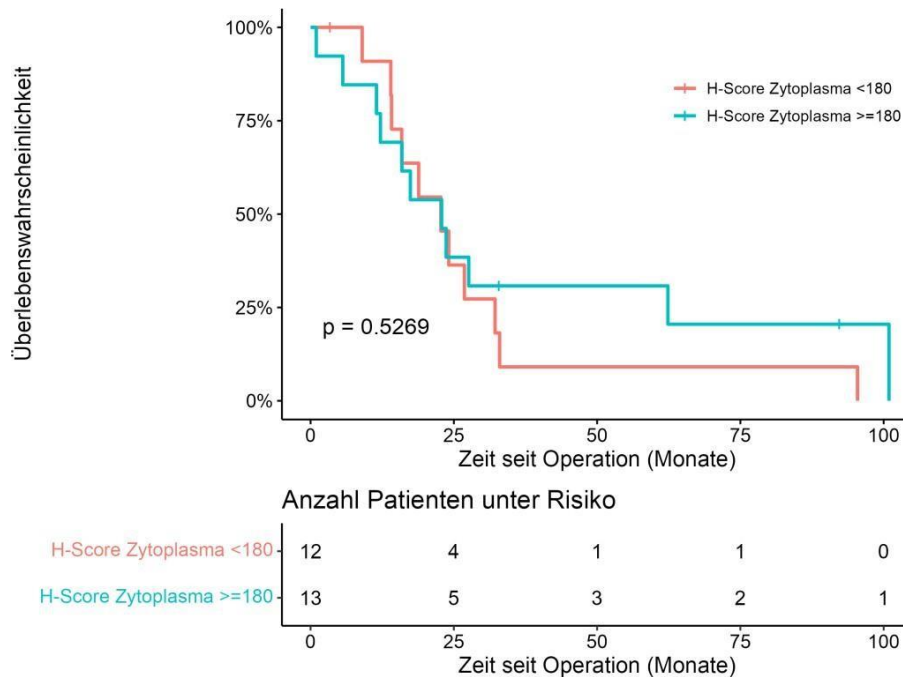


Abbildung 15: Gesamtüberleben in der PER-Gruppe (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma

Kaplan Meyer Überlebenskurve; $n=25$; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 im Zytoplasma und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 180.

3.3.2.4 KRK-Patienten mit Metastasierung in der Leber und im Peritoneum (HEP+PER)

Abbildung 16 zeigt das Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für Zytoplasma. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,7201$). Das mediane

Ergebnisse

Überleben ist in der Gruppe mit H-Score < 180 27 Monate und in der Gruppe mit H-Score \geq 180 19 Monate.

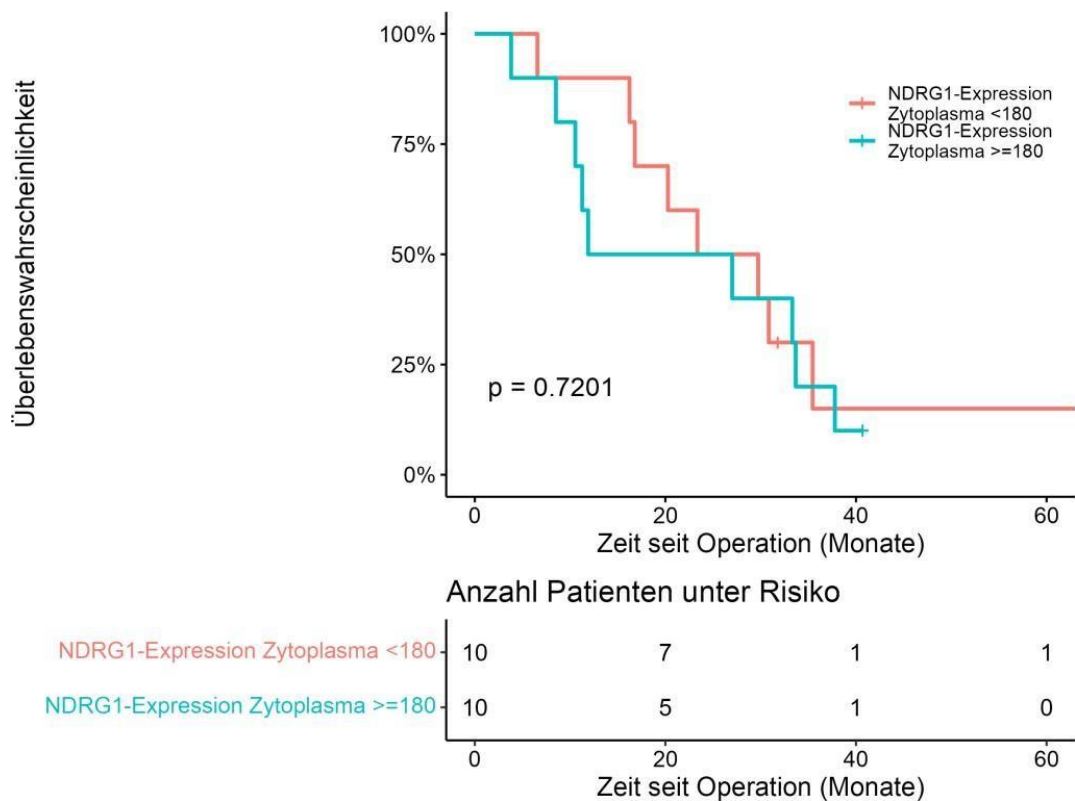


Abbildung 16: Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=20; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 im Zytoplasma und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 180.

3.3.3 Überlebenskurven für NDRG1 (H-Score Zellkerne)

3.3.3.1 KRK-Patienten ohne Metastasierung (M0)

Das Gesamtüberleben in der M0-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für die Zellkerne ist in Abbildung 17 dargestellt. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,7746$). Im Beobachtungszeitraum wurde in der gesamten M0-Gruppe ein Überleben von 80 % festgestellt.

Ergebnisse

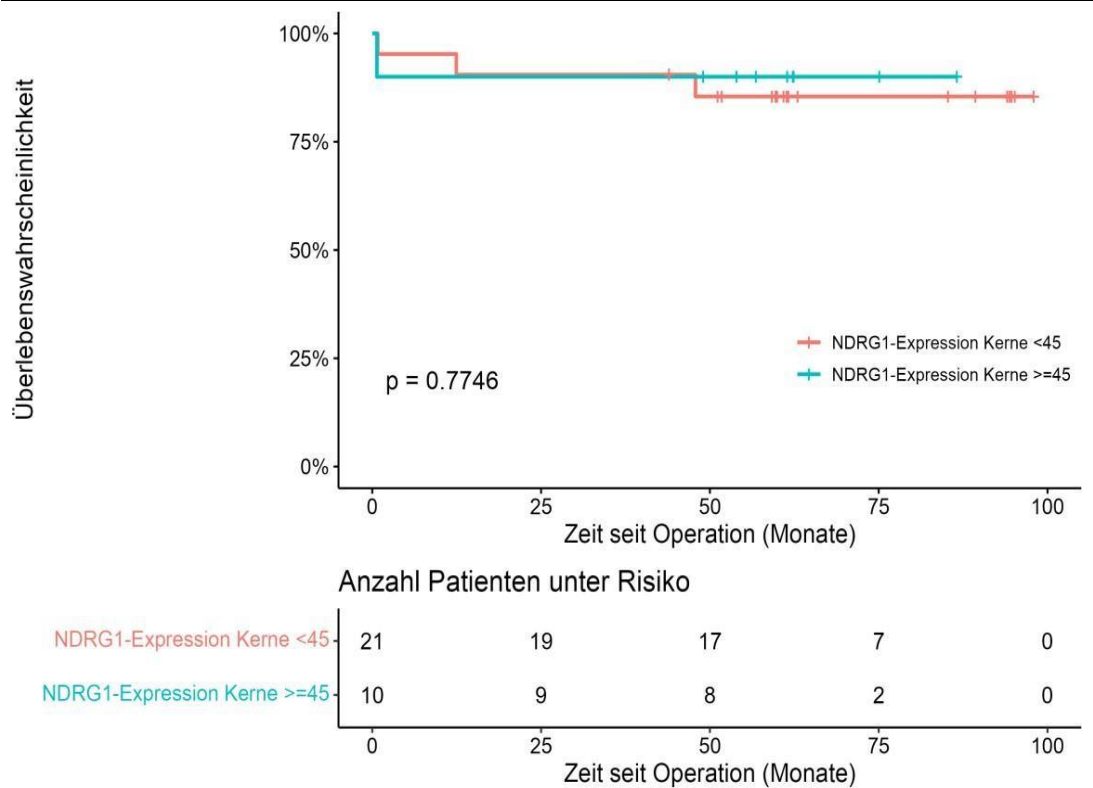


Abbildung 17: Gesamtüberleben in der M0-Gruppe (KRK-Patienten ohne Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=31; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 in den Zellkernen und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 45.

3.3.3.2 KRK-Patienten mit alleiniger Metastasierung in der Leber (HEP)

Abbildung 18 zeigt das Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score der Zellkerne. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,4418$). Das mediane Überleben in der Gruppe mit H-Score < 45 ist 44 Monate und 82 Monate in der Gruppe mit H-Score ≥ 45 .

Ergebnisse

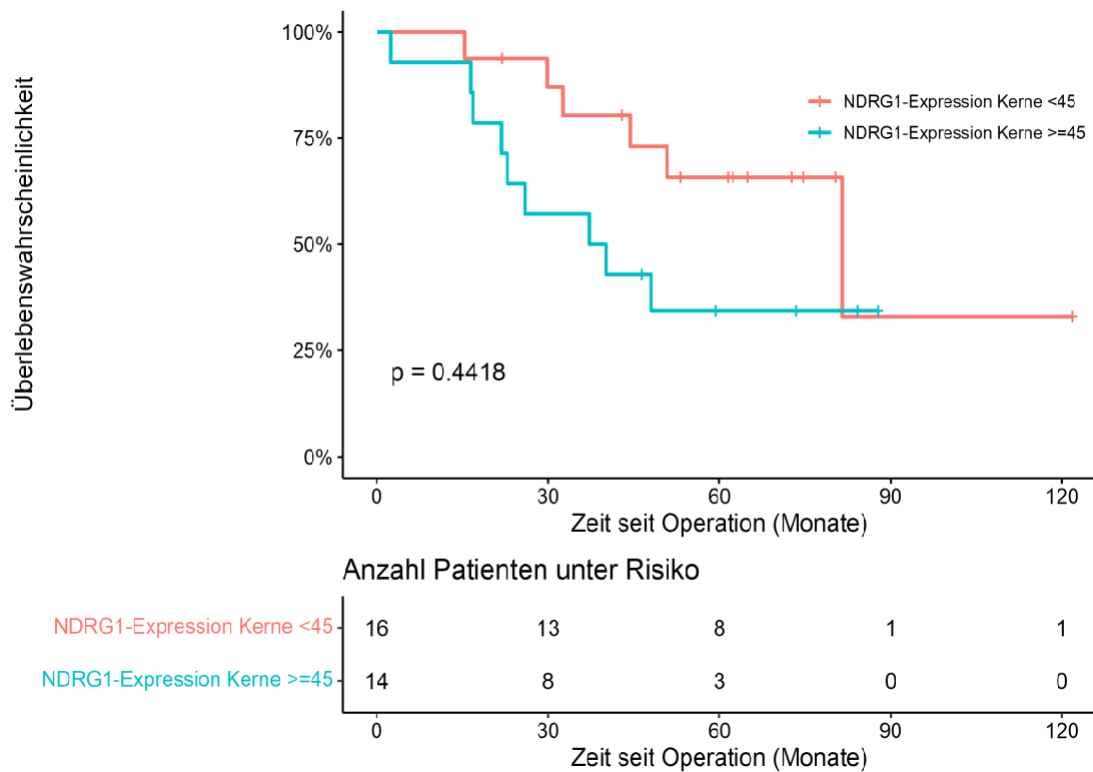


Abbildung 18: Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe (KRK-Patienten mit Lebermetastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=30; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 in den Zellkernen und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 45.

3.3.3.3 KRK-Patienten mit alleiniger Metastasierung im Peritoneum (PER)

Die Abbildung 19 zeigt das Gesamtüberleben in der PER-Gruppe in Abhängigkeit vom H-Score der Zellkerne. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,7478$). Das mediane Überleben in der Gruppe mit H-Score < 45 ist 16 Monate und in der Gruppe mit H-Score ≥ 45 24 Monate.

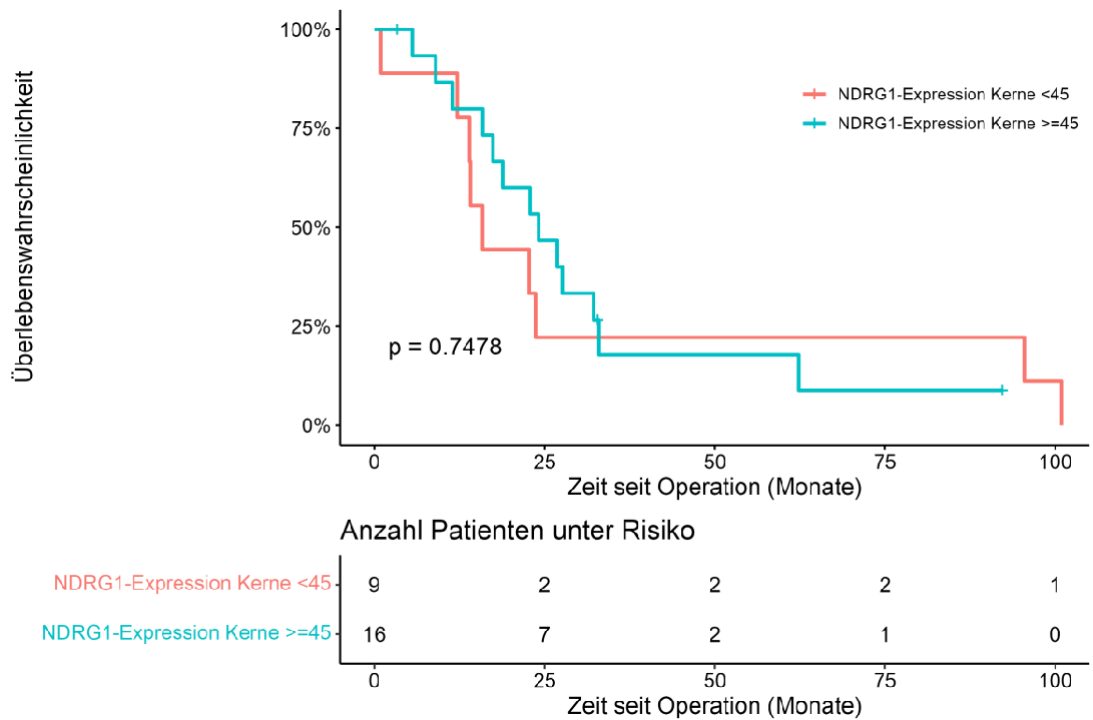


Abbildung 19: Gesamtüberleben in der PER-Gruppe (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=27; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 in den Zellkernen und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 45.

3.3.3.4 KRK-Patienten mit Metastasierung im Peritoneum und in der Leber (HEP+PER)

Abbildung 20 zeigt das Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe in Abhängigkeit von dem H-Score für Zellkerne. Es gibt keinen statistisch signifikanten Überlebensunterschied zwischen den beiden H-Score-Gruppen ($p=0,2683$). Das mediane Überleben beträgt in der Gruppe mit H-Score < 45 30 Monate und in der Gruppe mit H-Score ≥ 45 12 Monate. Die Differenz im medianen Überleben zwischen den beiden genannten Gruppen ist 18 Monate.

Ergebnisse

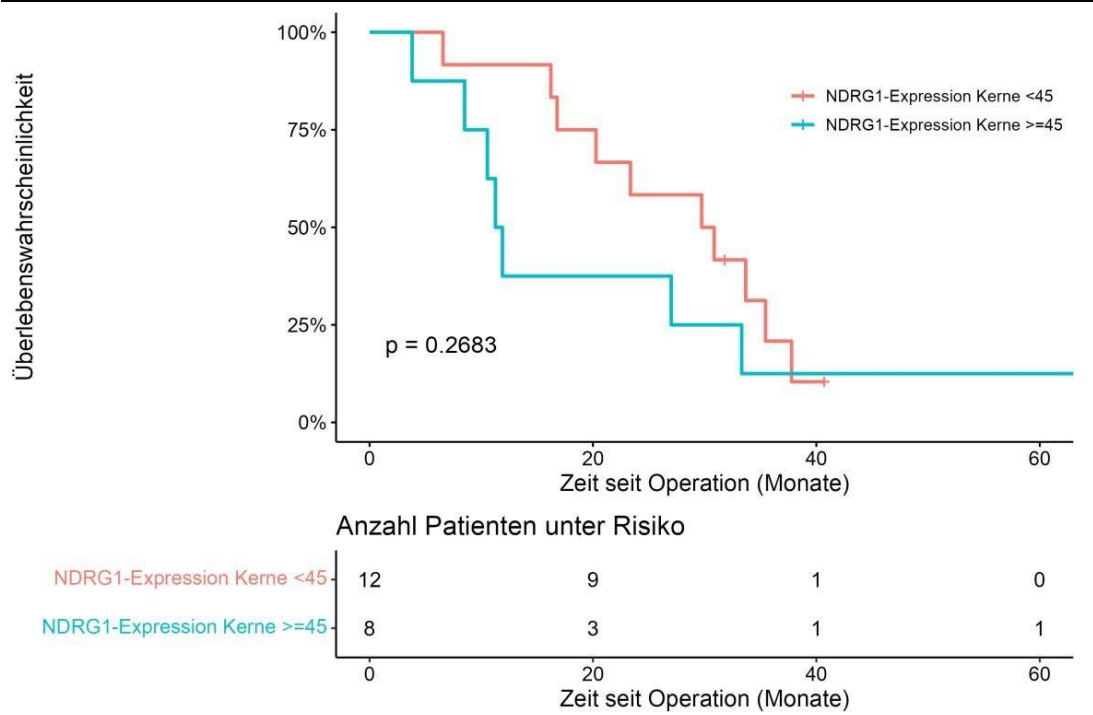


Abbildung 20: Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne

Kaplan Meyer Überlebenskurve; n=20; Immunhistochemische Markierung des NDRG1 in den Zellkernen und Teilung der Patientenkohorte gemäß dem errechneten medianen H-Score von 45.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der untersuchte Biomarker NDRG1 einen prognostischen Wert bei Patienten mit Lebermetastasen aufweist. So war die Überlebensrate bei niedriger NDRG1-Expression höher. Die meisten Lebermetastasen waren im KRK-Stadium III nachweisbar, bei Peritonealmetastasen bestand eine Häufung im Stadium IV. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine hohe NDRG1-Expression im Kern mit einer erhöhten Metastasierungsrate einhergeht.

In der HEP-Gruppe verzeichnet zwar eine niedrigere NDRG1-Expression ein längeres mittleres Überleben. Dennoch gibt es auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit sowohl in Abhängigkeit von der NDRG1-Expression im Zytoplasma als auch in Abhängigkeit von der NDGR1-Expression im Zellkern.

Auch in der HEP+PER-Gruppe kann ein längeres Überleben bei einer geringeren NDRG1-Expression verzeichnet werden, sowohl beim Zytoplasma als auch beim Zellkern, wobei sich auch hier die Kurven später angleichen. Der Effekt an sich ist weniger deutlich als bei der HEP-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der NDRG1-Expression existiert ebenfalls nicht. Es ergab sich in der M0-Gruppe und in der PER-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied im Überleben, weder in Abhängigkeit von der NDRG1-Expression im Zytoplasma noch von der NDGR1-Expression im Zellkern.

4.1 Limitationen der Studie

Die zentralen Limitationen der vorliegenden Arbeit, bei der es sich um eine retrospektive Analyse handelt, ergeben sich aus der geringen Anzahl an Patienten in den einzelnen Subgruppen. Als weitere Einschränkung kann auch genannt werden, dass die NDRG1-Expression nicht kontinuierlich beobachtet werden konnte und somit wichtige Daten fehlen. Als Basis standen die Paraffinblöcke der Tumoren zur Verfügung. Nach Entnahme des Tumorgewebes erfolgte auch keine weitere Dokumentation späterer Metastasierungen.

Auch der Median als Grenze zwischen hoher und niedriger Expression scheint zu ungenau. So wird zum Beispiel in der Arbeit von Chen et al. in der Metaanalyse angegeben, dass nur in der Arbeit von Strzelczyk der Median als Grenzwert verwendet wurde [58,67].

4.2 Prognostischer Wert der NDRG1 Expression beim KRK

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen keine quantitativen, wohl aber qualitative Aussagen zu einer Koinzidenz der NDRG1-Expression mit dem KRK zu. So zeigen die Ergebnisse bei Leberbeteiligung einen prognostischen Wert, bei Peritonealmetastasen kann hingegen auf keinen prognostischen Wert geschlossen werden.

Das Fehlen einer absoluten Aussage zur NDRG1-Expression im KRK spiegelt sich in den teils widersprüchlichen Ergebnissen bereits publizierter Studien wider. Dies beruht meist auf der Betrachtung verschiedener Teilaspekte. So wurden im Vergleich zur hier vorgelegten Studie andere Antikörper eingesetzt, andere Zeiten der Probengewinnung betrachtet, Patientenkohorten mit größeren Subgruppen und Messungen zu mehreren Zeitpunkten im Krankheitsverlauf analysiert. Weiterhin ist die Definition einer geringen Expressionsrate nicht standardisiert.

Die Studie von Mao et al. aus dem Jahre 2013 kam zu anderen Ergebnissen als die hier vorliegende Arbeit. Die statistische Analyse ergab hier eine signifikante inverse Korrelation der NDRG1-Expression mit dem Tumorstadium, dem Differenzierungsstatus und der Metastasierung des KRK. Im Vergleich zur NDRG1-negativen Gruppe hatte die NDRG1-positive Gruppe über einen Zeitraum von 5 Jahren ein längeres krankheitsfreies bzw. Gesamtüberleben ($p=0,001$) [57]. Diese Abweichung kann auf eine mehr als doppelt so große Patientenkohorte von 240 Patienten, von denen mehr als die Hälfte verschiedene präoperative Komorbiditäten aufzuweisen hatten, zurückzuführen sein. Aber auch dies traf nicht auf alle Krebsarten zu, so kamen Mao et al. auch zum Ergebnis, dass NDRG1 in Leber- und Gebärmutterhalskrebs bei Überexpression mit Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert war. In den hier vorgelegten Ergebnissen verzeichnet man auch, dass z.B. die HEP-Gruppe bei niedrigerer NDRG1-Expression ein längeres mittleres Überleben aufweist.

Die Studie von Chen et al. von 2018 berichtet, dass die prognostische Bedeutung der NDRG1-Expression je nach Krebsart bei Patienten mit DSC (Digestive System Cancer) variiert. Darüber hinaus fördert eine erhöhte NDRG1-Expression die Proliferation und Invasion in vitro sowie das Tumorwachstum und die Angiogenese in vivo bei Leber- und Magenkrebs. Angesichts der Tatsache, dass diese Metaanalyse mehrere Einschränkungen aufwies, sind weitere Studien erforderlich, um den prognostischen Wert der NDRG1-Expression bei Patienten mit DSC und relevanten Mechanismen weiter zu bewerten. Auch fügen Chen et al. hinzu, dass der prognostische Wert von NDRG1 weiterhin umstritten bleibt [67].

In Zusammenschau der Daten aus der Literatur mit den hier vorgelegten Ergebnissen zeigt sich, dass die Expression von NDRG1 und seine klinische Bedeutung beim KRK weiterer Forschung bedürfen.

4.3 Bedeutung der NDRG1-Expression bei der Metastasierung des KRK

Die Ergebnisse beweisen nicht, dass NDRG1-Expression keine Auswirkung auf die Metastasierung des KRK aufweist. Es gibt verschiedene Studienergebnisse, die eine signifikante umgekehrte Korrelation der NDRG1-Expression und der Metastasierung aufzeigen [57]. Die Metastasierung ist nach wie vor eine der häufigsten Ursachen für ein schlechtes Langzeitüberleben von Patienten mit KRK [57]. Die vorliegende Arbeit konnte außerdem beweisen, dass eine hohe NDRG1-Expression im Kern mit einer erhöhten Metastasierungsrate in der Tat einhergeht.

Aufgrund verschiedener anderer Beobachtungsweisen (andere Antikörper, Beobachtungszeiträume, größere Patientenkohorten etc.) gab es zu diesem Thema unterschiedliche Ergebnisse. So zum Beispiel demonstrierten Wang et al. in ihrer Studie aus dem Jahr 2004, dass sich der NDRG1-Proteinspiegel schrittweise im Laufe der kolorektalen Karzinogenese erhöht und dass es einen signifikanten Unterschied in der Expression von NDRG1 zwischen nicht-metastatischen und metastatischen Tumoren gibt [59]. Wei et al. konnten beweisen, dass die Claudin-2-Depletion die Transkription des *NDRG1* erheblich fördert, das zur Beendigung des Wachstums des KRK und der Metastasierung in vitro und in vivo führt [68]. Jedoch sind dies Ergebnisse von Studien,

die sich mit anderen Fragestellungen zu NDRG1 befassen und damit auch ganz andere Voraussetzungen und Ziele verfolgten als die vorliegende Arbeit.

Zusammenfassend konnte die Untersuchung von Wangpu et al. von 2015 zeigen, dass die antimetastatische Aktivität von NDRG1 bei KRK durch die Herunterregulierung von nuklearem β -Catenin erfolgt, und legt nahe, dass die weitere Betrachtung von NDRG1 ein wichtiges therapeutisches Ziel ist [69].

Neuere Studien deuten darauf hin, dass NDRG1 bei bestimmten Krebsarten posttranslational verändert wird, möglicherweise durch die Aktivität endogener Trypsine, was zu einer anschließenden Veränderung seiner Metastasensuppressoraktivität führt [70].

Der Zusammenhang zwischen NDRG1 und der Prognose von Krankheitsverläufen ist umstritten. Einige Studien haben ergeben, dass eine Herunterregulierung von NDRG1 bei Krebs die Prognose verschlechtert. Bei Prostatakrebs besteht ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der NDRG1-Expression und dem Gleason-Grad des Tumors. Bei Patienten mit Darmkrebs betrug die 2-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit hoher NDRG1-Expression 82,4 %, während sie bei Patienten mit niedriger NDRG1-Expression nur 69,6 % betrug [71]. Die Beobachtungszeit in der vorliegenden Arbeit ist jedoch viel länger, darauf könnte auch der Unterschied zurückzuführen sein.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Untersuchungen zeigten, dass bei HEP- und HEP+PER-Gruppe eine geringere Expression an NDRG1 mit einem längeren Überleben assoziiert ist, dennoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Weitere Schlussfolgerungen sind ein besseres Überleben der HEP-Gruppe gegenüber Patienten mit Peritonealmetastasen (PER und HEP+PER).

Ob das Protein NDRG1 als ein prognostischer und diagnostischer Biomarker genutzt werden kann, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer zu beurteilen und hängt von weiteren Studien ab, die mit größeren Patientenkohorten durchgeführt werden sollten. Ein interessanter Ansatz für weitere Studien wäre die Expression von NDRG1 in einer

Diskussion

größeren Kohorte innerhalb der T3-Kategorie (hier sind die meisten HEP und HEP+PER nachweisbar) und T4- Kategorie (80 % aller PER und damit größte Häufung aller Peritonealmetastasen) zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Das hier vorgelegte Projekt beschäftigte sich mit der Frage, wie und ob NDRG1 seine Rolle als Tumor- und Metastasensuppressor in der weiteren Entwicklung des KRK erfüllt und welche Auswirkung dies auf die Prognose hat. Unter anderem wäre NDRG1 als ein weiterer standardisierter Biomarker ein bedeutsamer Schritt zur Optimierung der Therapie von KRK-Patienten und ließe eine deutlichere Aussage zum Krankheitsverlauf des KRK zu.

NDRG 1, ein Metastasensuppressor, der in die Zellproliferation eingreift und an der Karzinogenese beteiligt ist, zeigt zwar unter dem Mikroskop eine hohe Expressionsrate vor allem bei Peritonealmetastasen. Dennoch konnte ich durch unsere Ergebnisse keine Signifikanz beobachten und somit kann aufgrund der verwendeten Methode keine quantitative Aussage bezüglich der NDRG1-Expression getroffen werden.

Die HEP-Gruppe zeigt ein besseres Überleben (im Median 82 Monate, insgesamt 15 Todesfälle) als Patienten mit Nachweis einer Peritonealkarzinose und Patienten mit kombinierter Lebermetastasierung und Peritonealkarzinose.

Dadurch möchte ich nicht schlussfolgern, dass das multifunktionale Protein „N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG 1)“ als prognostischer Biomarker für KRK eher ungeeignet ist, da es sich je nach unterschiedlicher Krebsart sowohl als ein Parameter für guten als auch schlechten Outcome erwiesen hat.

Wie die Arbeit gezeigt hat, bedarf es weiterer Analysen zur NDRG1-Expression im KRK. Weitere Studien mit größeren Kohorten, unter Berücksichtigung möglicher Einflussgrößen und Störfaktoren, wären notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Nowossadeck E, Kowalski C, Barnes B. Demografische Alterung und Krebs. *Onkologie heute* 2018;48–50.
- [2] Barnes B (ed.). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert Koch-Institut; 2016.
- [3] Arndt V, Dahm S, Kraywinkel K. Krebsprävalenz in Deutschland 2017. *Onkologie* 2021;27:717–23.
- [4] Kim H-J, Fay MP, Feuer EJ, Midthune DN. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. *Statist. Med.* 2000;19:335–51.
- [5] Fodor M, Resch T, Zoller H, Öfner D, Tilg H, Wolf D, Schneeberger S. Lebertransplantation beim hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinom: aktuelle Datenlage und mögliche Zukunftsszenarien. *Journal für gastroenterologische und hepatologische Erkrankungen.*
- [6] Katzmann A, Muehlberg A, Sühling M, Noerenberg D, Holch JW, Heinemann V et al. (eds.). Predicting lesion growth and patient survival in colorectal cancer patients using deep neural networks; 2022.
- [7] Gupta S. Screening for Colorectal Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 2022;36:393–414.
- [8] Bretthauer M, Løberg M, Wieszczy P, Kalager M, Emilsson L, Garborg K, Rupinski M, Dekker E, Spaander M, Bugajski M, Holme Ø, Zauber AG, Pilonis ND, Mroz A, Kuipers EJ, Shi J, Hernán MA, Adami H-O, Regula J, Hoff G, Kaminski MF. Effect of Colonoscopy Screening on Risks of Colorectal Cancer and Related Death. *N Engl J Med* 2022;387:1547–56.
- [9] Obaro AE, Burling DN, Plumb AA. Colon cancer screening with CT colonography: logistics, cost-effectiveness, efficiency and progress. *BJR* 2018;91:20180307.

- [10] Patel SG, Ahnen DJ. Colorectal Cancer in the Young. *Current gastroenterology reports* 2018;20:15.
- [11] Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut. Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten Epi2021_1, verfügbare Diagnosejahre bis 2019: ZfKD – German Center for Cancer Registry Data at the RKI; 2022.
- [12] Siegmund-Schulze N. Kolorektale Karzinome: Die Lage des Primarius zählt. *Deutsches Ärzteblatt International* 2017;114:20.
- [13] Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of gastrointestinal surgery official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2016;20:648–55.
- [14] Schmoll H-J, Arnold D, Lang A, Graeven U. Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *Regulation* 2007;53:17p13.
- [15] Hoffmeister M, Bläker H, Jansen L, Alwers E, Amitay EL, Carr PR, Kloor M, Herpel E, Roth W, Chang-Claude J, Brenner H. Colonoscopy and Reduction of Colorectal Cancer Risk by Molecular Tumor Subtypes: A Population-Based Case-Control Study. *The American journal of gastroenterology* 2020;115:2007–16.
- [16] Haraldsdottir S, Einarsdottir HM, Smaradottir A, Gunnlaugsson A, Halfdanarson TR. Krabbamein í ristli og endaðarmi. *Laeknabladid* 2014;100:75–82.
- [17] Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M. Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC) Aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie. *Med Klin* 2001;96:529–38.
- [18] Toboeva MK, Shelygin YA, Frolov SA, Kuzminov MA, Tsukanov AS. MutYH-associated polyposis. *Terapevticheskii arkhiv* 2019;91:97–100.

- [19] Nöpel-Dünnebacke S, Conradi L-C, Reinacher-Schick A, Ghadimi M. Therapeutische Relevanz molekularer Marker beim kolorektalen Karzinom. *Onkologie* 2020;26:685–97.
- [20] Venugopal A, Carethers JM. Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI journal* 2022;21:162–82.
- [21] Preston JL, Stiffler N. Epigenetic loss of heterozygosity of Apc and an inflammation-associated mutational signature detected in Lrig1+/-driven murine colonic adenomas. *BMC cancer* 2020;20:126.
- [22] He K, Wang Y, Zhong Y, Pan X, Si L, Lu J. KRAS Codon 12 Mutation is Associated with More Aggressive Invasiveness in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): Retrospective Research. *OncoTargets and therapy* 2020;13:12601–13.
- [23] Jo W-S, Chung DC. Genetics of hereditary colorectal cancer. *Seminars in oncology* 2005;32:11–23.
- [24] Kato MV, Shimizu T, Ishizaki K, Kaneko A, Yandell DW, Toguchida J, Sasaki MS. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. *Cancer letters* 1996;106:75–82.
- [25] Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *American journal of clinical pathology* 2005;124:380–91.
- [26] Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004;53:1137–44.
- [27] Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis. *Cell* 2023;186:1564–79.
- [28] Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, Werner J, Angele M. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic

- Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of Oncology* 2019;2019:1–13.
- [29] van der Geest LGM, Lam-Boer J, Koopman M, Verhoef C, Elferink MAG, Wilt JHW de. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clinical & experimental metastasis* 2015;32:457–65.
- [30] Albertsmeier M, Engel A, Guba MO, Stintzing S, Schiergens TS, Schubert-Fritschle G, Hölzel D, Werner J, Angele MK, Engel J. Synchronous colorectal liver metastases: focus on the elderly An Effectiveness Study from Routine Care. *Langenbeck's archives of surgery* 2017;402:1223–32.
- [31] Sourrouille I, Mordant P, Maggiori L, Dokmak S, Lesèche G, Panis Y, Belghiti J, Castier Y. Long-term survival after hepatic and pulmonary resection of colorectal cancer metastases. *Journal of surgical oncology* 2013;108:220–4.
- [32] Vatandoust S, Price TJ, Karapetis CS. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World journal of gastroenterology* 2015;21:11767–76.
- [33] Hünerbein M, Totkas S, Ghadimi BM, Schlag PM. Preoperative evaluation of colorectal neoplasms by colonoscopic miniprobe ultrasonography. *Annals of surgery* 2000;232:46–50.
- [34] Emmrich P, Hölzer H. Kausale Genese und Prognosefaktoren des Kolonkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Lokalisation des Tumors. *Zentralblatt für Chirurgie* 1999;124:1079–86.
- [35] Thalheimer A, Germer CT. Verteilung der Lymphknotenmetastasen als unabhängiger Prädiktor des Gesamtüberlebens beim Sigma- und Rektumkarzinom. Ergebnisse einer prospektiven Single-Center-Studie. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 2012;83:484.
- [36] Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging* 2016;11:967–76.

- [37] Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, Nothacker M, Porschen R, Rödel C, Rösch T, Schmitt W, Wesselmann S, Pox C. S3-Leitlinie – Kolorektales Karzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2017;55:1344–498.
- [38] Vieira AR, Abar L, Chan DSM, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, Greenwood D, Norat T. Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2017;28:1788–802.
- [39] Kolligs FT. Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 2015;140:1425–30.
- [40] van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard J-Y, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Köhne C-H, Labianca R, Laurent-Puig P, Ma B, Maughan T, Muro K, Normanno N, Österlund P, Oyen WJG, Papamichael D, Pentheroudakis G, Pfeiffer P, Price TJ, Punt C, Ricke J, Roth A, Salazar R, Scheithauer W, Schmoll HJ, Tabernero J, Taïeb J, Tejpar S, Wasan H, Yoshino T, Zaanan A, Arnold D. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2016;27:1386–422.
- [41] Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental health perspectives* 1992;98:13–24.
- [42] Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget* 2015;6:20785–800.

- [43] Ng JY-S, Lu CT, Lam AK-Y. BRAF mutation: Current and future clinical pathological applications in colorectal carcinoma. *Histology and histopathology* 2019;34:469–77.
- [44] Eurboonyanun K, Lahoud RM, Kordbacheh H, Pourvaziri A, Promsorn J, Chadbunchachai P, O'Shea A, Atre ID, Harisinghani M. Imaging predictors of BRAF mutation in colorectal cancer. *Abdominal radiology (New York)* 2020;45:2336–44.
- [45] Wan YH, Liu QS, Wan SS, Wang RW. Colorectal cancer-derived exosomes and modulation KRAS signaling. *Clinical & translational oncology official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2022;24:2074–80.
- [46] Nguyen H, Duong H-Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncol Lett* 2018.
- [47] Scott A, Goffredo P, Ginader T, Hrabe J, Gribovskaja-Rupp I, Kapadia MR, Weigel RJ, Hassan I. The Impact of KRAS Mutation on the Presentation and Prognosis of Non-Metastatic Colon Cancer: an Analysis from the National Cancer Database. *Journal of gastrointestinal surgery official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 2020;24:1402–10.
- [48] Momenzadeh H, Mirzai M, Jowkar Z, Geramizadeh B. Frequency of NRAS Gene Mutation in Wild Type KRAS and BRAF Colorectal Cancers; a Single Center Study. *Middle East J Dig Dis* 2018;10:18–23.
- [49] Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS* 2010;5:463–6.
- [50] Karki S, Sun W, Madan R, Lamsal K, Schmitt S, Godwin A, Kasi A. Microsatellite Instability with BRAF V600E Associated with Delayed Presentation but Poor Survival in Stage III Colorectal Cancer. *Fortune J Health Sci* 2023;06.
- [51] Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC genetics* 2004;5:27.

- [52] Ma J, Gao Q, Zeng S, Shen H. Knockdown of NDRG1 promote epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer via NF- κ B signaling. *Journal of surgical oncology* 2016;114:520–7.
- [53] Park KC, Paluncic J, Kovacevic Z, Des Richardson R. Pharmacological targeting and the diverse functions of the metastasis suppressor, NDRG1, in cancer. *Free radical biology & medicine* 2020;157:154–75.
- [54] Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochemistry and cell biology* 2002;118:399–408.
- [55] Kovacevic Z, Menezes SV, Sahni S, Kalinowski DS, Bae D-H, Lane DJR, Des Richardson R. The Metastasis Suppressor, N-MYC Downstream-regulated Gene-1 (NDRG1), Down-regulates the ErbB Family of Receptors to Inhibit Downstream Oncogenic Signaling Pathways. *The Journal of biological chemistry* 2016;291:1029–52.
- [56] Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JHTG, Nonogaki S, Rierger RB, Netto MM, Soares FA. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:1–14.
- [57] Mao Z, Sun J, Feng B, Ma J, Zang L, Dong F, Zhang D, Zheng M. The metastasis suppressor, N-myc downregulated gene 1 (NDRG1), is a prognostic biomarker for human colorectal cancer. *PloS one* 2013;8:e68206.
- [58] Strzelczyk B, Szulc A, Rzepko R, Kitowska A, Skokowski J, Szutowicz A, Pawelczyk T. Identification of high-risk stage II colorectal tumors by combined analysis of the NDRG1 gene expression and the depth of tumor invasion. *Annals of surgical oncology* 2009;16:1287–94.
- [59] Wang Z, Wang F, Wang W-Q, Gao Q, Wei W-L, Yang Y, Wang G-Y. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World journal of gastroenterology* 2004;10:550–4.

- [60] Kitowska A, Pawełczyk T. N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. *Acta biochimica Polonica* 2010;57:15–21.
- [61] YIU AJ, Yiu CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Research* 2016;36:1093–102.
- [62] Bae D-H, Jansson PJ, Huang ML, Kovacevic Z, Kalinowski D, Lee CS, Sahni S, Des Richardson R. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *Journal of clinical pathology* 2013;66:911–7.
- [63] Joshi V, Lakhani SR, McCart Reed AE. NDRG1 in Cancer: A Suppressor, Promoter, or Both? *Cancers* 2022;14.
- [64] Aikemu B, Shao Y, Yang G, Ma J, Zhang S, Yang X, Hong H, Yesseyeva G, Huang L, Jia H, Wang C, Zang L, Sun J, Zheng M. NDRG1 regulates Filopodia-induced Colorectal Cancer invasiveness via modulating CDC42 activity. *International journal of biological sciences* 2021;17:1716–30.
- [65] Song Y, Lv L, Du J, Yue L, Cao L. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 subcellular localization and lymph node metastases of colorectal neoplasms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;439:241–6.
- [66] Wittekind C (ed.). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2013.
- [67] Chen K, Liu X-H, Wang F-R, Liu H-P, Huang Z-P, Chen X. The prognostic value of decreased NDRG1 expression in patients with digestive system cancers: A meta-analysis. *Medicine* 2018;97:e12455.
- [68] Wei M, Zhang Y, Yang X, Ma P, Li Y, Wu Y, Chen X, Deng X, Yang T, Mao X, Qiu L, Meng W, Zhang B, Wang Z, Han J. Claudin-2 promotes colorectal cancer growth and metastasis by suppressing NDRG1 transcription. *Clinical and translational medicine* 2021;11:e667.

- [69] Wangpu X, Yang X, Zhao J, Lu J, Guan S, Lu J, Kovacevic Z, Liu W, Mi L, Jin R, Sun J, Yue F, Ma J, Lu A, Des Richardson R, Wang L, Zheng M. The metastasis suppressor, NDRG1, inhibits “stemness” of colorectal cancer via down-regulation of nuclear β -catenin and CD44. *Oncotarget* 2015;6:33893–911.
- [70] Fang BA, Kovačević Ž, Park KC, Kalinowski DS, Jansson PJ, Lane DJR, Sahni S, Des Richardson R. Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1845:1–19.
- [71] Kovacevic Z, Des Richardson R. The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis* 2006;27:2355–66.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Jährliche Inzidenz des Darmkrebses in Deutschland 2016-2018 in den verschiedenen Alterskohorten [11] | 8 |
| Abbildung 2: Lokalisationen des kolorektalen Karzinoms [12] | 9 |
| Abbildung 3: Ätiologie des KRK [19] | 10 |
| Abbildung 4: Invasions-Metastasen-Kaskade [28] | 12 |
| Abbildung 5: NDRG1-Immunhistochemische Färbung (a) schwache Färbung, (b) mäßiger Färbung, (c) mittelstarker bis (d) starker Färbeintensität | 19 |
| Abbildung 6: Gesamtüberleben in der Patientenkohorte..... | 24 |
| Abbildung 7: Gesamtüberleben in der Patientenkohorte nach Gruppen..... | 25 |
| Abbildung 8: Medianes Überleben und Gesamtüberleben in den Gruppen PER und HEP+PER..... | 26 |
| Abbildung 9: Gesamtüberleben in den Gruppen HEP und HEP+PER..... | 27 |
| Abbildung 10: Gesamtüberleben in den Gruppen HEP und PER..... | 28 |
| Abbildung 11: H-Score für die Expression von NDRG1 im Zytoplasma..... | 30 |
| Abbildung 12: H-Score für die Expression von NDRG1 in den Kernen | 30 |
| Abbildung 13: Gesamtüberleben in der M0-Gruppe (KRK-Patienten ohne Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma | 33 |
| Abbildung 14: Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe (KRK-Patienten mit Lebermetastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma | 34 |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 15: Gesamtüberleben in der PER-Gruppe (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma | 35 |
| Abbildung 16: Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum) in Abhängigkeit vom H-Score im Zytoplasma..... | 36 |
| Abbildung 17: Gesamtüberleben in der M0-Gruppe (KRK-Patienten ohne Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne..... | 37 |
| Abbildung 18: Gesamtüberleben in der HEP-Gruppe (KRK-Patienten mit Lebermetastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne..... | 38 |
| Abbildung 19: Gesamtüberleben in der PER-Gruppe (KRK-Patienten mit peritonealen Metastasen) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne | 39 |
| Abbildung 20: Gesamtüberleben in der HEP+PER-Gruppe (KRK-Patienten mit Metastasen in der Leber und im Peritoneum) in Abhängigkeit vom H-Score der Kerne | 40 |

Tabellen

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Gruppeneinteilung nach Anfärbeintensitäten | 19 |
| Tabelle 2: Patientencharakteristika..... | 22 |
| Tabelle 3: H-Scores für Zytoplasma und Zellkerne | 29 |
| Tabelle 4: Patientencharakteristika in Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zur H-Score-Zytoplasma-Gruppe | 31 |
| Tabelle 5: Patientencharakteristika in Abhängigkeit von der H-Score-Kerne-Gruppe | 32 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| AKS | Adenom Karzinom Sequenz |
| BRAF | Protoonkogen, RAF-Protein |
| FAP | Familiäre adenomatöse Polyposis |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEP | Kohorte der Patienten mit Metastasen der Leber |
| HNPCC | Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom |
| H-Score | Histoscore |
| IgG | Immunoglobulin G |
| KRAS | RAS-Protein |
| KRK | Kolorektales Karzinom |
| M | Metastase |
| M0 | Kohorte der Patienten ohne Metastasen der Leber und des Peritoneums |
| N | Lymphknoten |
| NDRG1 | N-myc downregulated gene 1 |
| MUTYH | mutY DNA Glykosylase |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PER | Kohorte der Patienten mit Metastasen in Peritoneum |
| RAS | Rapidly accelerated fibrosarcoma |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| T | Eindringtiefe des Tumors |
| UICC | Union for international cancer control |

Eidesstattliche Erklärung

Name, Vorname

Wasem Meliha

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

Immunhistochemische Validierung von Biomarker NDRG1 für die peritoneale und hepatische Metastasierung beim Kolorektalen Karzinom

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

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

München, den 10.06.2024

Meliha Wasem

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin