

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Eine Untersuchung des Tumormikromilieus kolorektaler Lebermetastasen und der Einfluss der  
epithelialen mesenchymalen Transition auf die Ausprägung phänotypischer Differenzen am  
Tumorrand

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Claudia Fleig

2019



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. HANS JÜRGEN SCHLITT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Eine Untersuchung des Tumormikromilieus kolorektaler Lebermetastasen und der Einfluss der  
epithelialen mesenchymalen Transition auf die Ausprägung phänotypischer Differenzen am  
Tumorrand

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Claudia Fleig

2019



Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Stefan Brunner
2. Berichterstatter:	PD Dr. Michael Worlicek
Tag der mündlichen Prüfung:	11.07.2019



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung: Das kolorektale Karzinom .....	6
1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms .....	6
1.2	Ätiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms.....	7
1.2.1	Wie entsteht das kolorektale Karzinom? Eine Analyse der kolorektalen Karzinogenese .....	7
1.2.2	Welche Faktoren erhöhen das Risiko, an kolorektalem Karzinom zu erkranken? ..	11
1.3	Histopathologie .....	13
1.3.1	Welche histopathologischen Veränderungen treten während der Genese des kolorektalen Karzinoms auf? .....	13
1.3.2	Die TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms – eine Einteilung des Schweregrades der Erkrankung.....	14
1.3.3	Lokalisation des kolorektalen Karzinoms .....	15
1.3.4	Metastasierung des kolorektalen Karzinoms.....	16
1.3.5	Welche zellulären Mechanismen ermöglichen eine Metastasierung? Die epitheliale mesenchymale Transition als Voraussetzung für die Bildung von Filiae .....	16
1.4	Prävention: Welche Maßnahmen zur Minimierung des persönlichen Erkrankungsrisikos sind möglich?.....	19
1.5	Screening und Diagnostik des kolorektalen Karzinoms.....	20
1.6	Therapie und Nachsorge bei kolorektalem Karzinom .....	22
1.6.1	Therapie des Primärtumors: Chirurgische Entfernung als kurative Maßnahme .....	22
1.6.2	Therapie bei Fernmetastasen: Resektion versus Chemotherapie und lokoregionäre Verfahren.....	23
1.6.3	Wesentlicher Bestandteil einer erfolgreichen Therapie: Die Verlaufskontrolle nach chirurgischer Intervention .....	24

1.7	Prognose bei Erkrankung an kolorektalem Karzinom .....	25
1.7.1	Die UICC-Einteilung des kolorektalen Karzinoms – ausreichend für die Einschätzung der Prognose des Patienten?.....	25
1.7.2	Welche Faktoren haben bei Auftreten von Lebermetastasen eine prognostische Bedeutung? .....	26
1.7.2.1	Anzahl, Größe und Lokalisation der kolorektalen Lebermetastasen .....	26
1.7.2.2	Resektionsrand nach chirurgischer Intervention .....	26
1.7.2.3	Molekulare Faktoren des kolorektalen Karzinoms und kolorektaler Lebermetastasen .....	27
1.7.2.4	Immunzellinvasion bei kolorektalen Lebermetastasen .....	28
1.7.2.5	Bildung einer fibrotischen Pseudokapsel um kolorektale Lebermetastasen.....	28
2.	Ziele und Fragestellungen.....	29
2.1	Spezifischer Hintergrund der vorliegenden Studie und Vorarbeiten .....	29
2.2	Ziele dieser Arbeit .....	32
3.	Material und Methodik.....	33
3.1	Material.....	33
3.2	Methodik .....	36
3.2.1	Genexpressionsanalyse durch PCR Arrays .....	36
3.2.2	Immunhistochemie .....	48
3.2.3	Immunofluoreszenz.....	49
4.	Ergebnisse.....	50
4.1	Charakterisierung des Pseudokapselaufbaus: Die Identifizierung weiterer Kapselbestandteile und Untersuchung ihrer Anordnung im Raum.....	50
4.2	EMT-Aktivität in bekapselten und nicht bekapselten kolorektalen Lebermetastasen.....	56
4.2.1	Transkriptionsfaktoren der epithelialen mesenchymalen Transition .....	57
4.2.2	Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie.....	63

4.2.3	Essentielle Genprodukte im Wnt-Pathway.....	64
4.2.4	Für Zellkontakte relevante Proteine.....	67
4.2.5	Für Kollagen und Matrix relevante Genprodukte.....	74
4.2.6	Tumorsuppressorgene.....	75
4.3	Custom-Arrays zur quantitativen Validierung der EMT-Arrays.....	76
5.	Diskussion.....	78
5.1	Die Identifizierung der Kapselkomponenten beweist eine Produktion durch mesenchymale Zellen.....	78
5.2	Die Konfiguration der ECM-Fibrillen beeinflusst die Schutzfunktion der Kapsel.....	80
5.3	Die EMT-Aktivität am Tumorrand korreliert mit der Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel. Dabei ist eine EMT in verschiedenen Zelltypen nachweisbar. Die Genexpression am Rand bekapselter CRCLM weist auf Prozesse hin, die Wundheilung und Fibrose ähneln.....	81
5.4	Bekapselte CRCLM sind besser differenziert und zeigen eine erhöhte Expression antiinvasiver Proteine, während nicht bekapselte CRCLM auf molekularer und immunhistochemischer Ebene ein Proteinmuster aufweisen, das ein aggressiveres Wachstumspotenzial hat.....	93
5.5	Vergleich bekapselter kolorektaler Lebermetastasen mit bekapseltem hepatozellulären Karzinom.....	95
5.6	Schwächen der Studie.....	97
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	98
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	100
8.	Literaturverzeichnis.....	102

Danksagung

# 1. Einleitung: Das kolorektale Karzinom

## 1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (CRC) zählt mit einer altersstandardisierten Inzidenz von 0,17 ‰ (17,2 Fälle / 100.000 Bevölkerung) beziehungsweise 1.360.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen weltweit. Bei einem Lebenszeiterkrankungsrisiko von 4,7 % steht es in Industrienationen (Nordamerika, Europa, Australien, Neuseeland) mit circa 400.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei Männern nach Lungen- und Prostatakrebs an dritter Stelle der häufigsten Karzinome, bei Frauen folgt es nach Brustkrebs an 2. Stelle mit circa 340.000 Neuerkrankungen pro Jahr (Stand 2012). (1) Das kolorektale Karzinom liegt mit einem Anteil von 8,5 % an der Gesamtmortalität der Karzinome hinter Lunge (19,4 %), Leber (9,1 %) und Magen (8,8 %); in schlechter entwickelten Regionen ist die Sterblichkeitsrate erhöht (1). Dennoch konnte durch Fortschritte in Vorsorge, Diagnostik und Therapie die Letalität in den letzten 40 Jahren gesenkt werden: die 5-Jahres-Überlebensrate wurde zwischen 1975 und 2008 um fast 20 Prozentpunkte auf 67,2 % gesteigert (2).

## 1.2 Ätiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

### 1.2.1 Wie entsteht das kolorektale Karzinom? Eine Analyse der kolorektalen Karzinogenese

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms ist ein jahrelanger Prozess, bei dem eine Akkumulation verschiedener Mutationen zu einer Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen führt, die schließlich ungehemmtes Wachstum entarteter Zellen ermöglichen. Einige dieser Mutationen, die eine Schlüsselrolle in der Karzinomentwicklung einnehmen, wurden 1990 im Tumorprogressionsmodell nach Vogelstein und Fearon (3) zusammengefasst:

In einem frühen Stadium kommt es zur Mutation des Tumorsuppressorgens Adenomatous Polyposis Coli (APC). Das APC-Gen ist bei 70 bis 80 % aller sporadischen Kolonadenome und -karzinome mutiert. (4) Es kodiert für ein Protein, das Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Zellpolarität und -differenzierung, Apoptose in der Dickdarmkrypte und chromosomale Segregation reguliert. Außerdem greift es in den Wnt-Signalweg ein, indem es durch Binden an Axin und mit Hilfe der Glycogensynthase-Kinase-3- $\beta$   $\beta$ -Catenin phosphoryliert. (4) Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird ubiquitiniert und daraufhin proteosomal degradiert. Wnt-Ligand inhibiert wiederum Axin und GSK 3- $\beta$  und sorgt damit für den Erhalt von  $\beta$ -Catenin in der Zelle. Bei Ausfall des APC-Proteins akkumuliert  $\beta$ -Catenin zunächst im Zytoplasma und gelangt schließlich in den Zellkern. Dort verstärkt es als Transkriptions-Coaktivator die Expression einer Reihe von Protoonkogenen, Wachstumsfaktoren und Metalloproteasen (vgl. 1.3.5: Die epitheliale mesenchymale Transition). (4) Die Zellen weisen daraufhin eine Transkription ähnlicher Proteine auf wie die Stammzellen in den Kolonkrypten (5). Die Aktivierung des Onkogens k-RAS folgt zu einem späteren Zeitpunkt: in Adenomen < 1 cm ist sie im Gegensatz zur APC-Mutation noch kaum nachzuweisen (6). Deshalb geht man davon aus, dass k-RAS für die Aktivität von Tumorzellen in fortgeschrittenen Stadien wichtig ist (4). Das k-RAS-Protein gehört zur Familie der G-Proteine, die Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR), nachgeschaltet sind. Es beeinflusst verschiedene Signalwege der Zelle; beispielweise ist es in die Regulation des den Zellzyklus kontrollierenden Cyclin D 1 involviert. (7)

Der Verlust von Allelen auf Chromosom 18q ist in etwa 70 % aller kolorektalen Karzinome zu beobachten (3). Welche der deletierten Gene tatsächlich eine Rolle für die Karzinomentstehung spielen, ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Das vielfach als Tumorsuppressor eingestufte Deleted-in-Colorectal-Cancer(DCC)-Genprodukt ist ein Oberflächenrezeptor für Netrin-1, ein

neuronaies Protein (8). In Studien an DCC<sup>+/-</sup>-Mäusen konnte eine Beeinträchtigung axonaler Projektionen festgestellt werden, tumoröse Veränderungen des Intestinums blieben jedoch aus (9). Bei einer Mutationsrate in kolorektalen Karzinomen (CRCs) von nur 6 % bleibt fraglich, ob und wie wichtig DCC für den Arrest des Zellzyklus und die Apoptose der Zelle ist (10) und in wie weit der Einfluss des Fehlens anderer Gene des Chromosoms 18q zum Progress der Tumorentwicklung beiträgt. Dazu zählen die im TGF- $\beta$ -Pathway an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligten Proteine von SMAD 2 und 4, die in 10 bis 20 % aller CRCs Mutationen aufweisen (11, 12).

Auch auf Chromosom 18q befindlich ist das in 60 % sporadischer kolorektaler Karzinome mutierte Gen Cables. Sein Genprodukt erhöht die Phosphorylierung Cyclin-abhängiger Kinasen. Cables-Verlust in Kombination mit Karzinogenexposition ist in experimentellen Studien bei Cables<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem vermehrten Auftreten kolorektaler Karzinome assoziiert. (13) Das Protein des Tumorsuppressorgens p53 wirkt regulatorisch auf die Transkription zahlreicher Gene, die Proteine für Zellmotilität und -migration, DNA-Metabolismus, Zelldifferenzierung, Immunantwort, Zellzyklus, Angiogenese, Apoptose und Seneszenz kodieren. Mutation von p53 führt zu dessen Inaktivierung und damit unter anderem zu andauernder Proliferation, verringerter Apoptose und verstärkter Angiogenese. (14, 15)

Eine Überexpression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) kann in 86 % aller kolorektalen Karzinome nachgewiesen werden und wird über die Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2) mit der Tumorentwicklung in Verbindung gebracht (16, 17). Beide regulieren Überleben, Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen und treiben über VEGF-Induktion die Angiogenese voran (18).

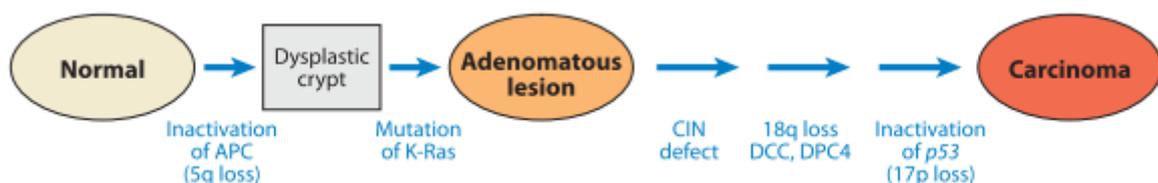


Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell: Maligne Transformation von normalem Kolonepithel über die dysplastische Krypte und adenomatöse Läsion zum Karzinom mit Angabe der stattfindenden Mutationen (blau). Aus: Fearon ER. *Molecular Genetics of Colorectal Cancer*, (2011).

Häufig werden die genannten Mutationen von Chromosomeninstabilitäten begleitet und sind daher Bestandteil des sogenannten Chromosomeninstabilitäts(CIN)-Pathways, einem von drei pathogenetischen Prozessen genomischer Instabilität in kolorektalen Karzinomen (4, 19). In

70 % aller sporadischen CRCs ist die Rate an Verlust beziehungsweise Zusatz großer Chromosomenstücke oder ganzer Chromosomen erhöht (20). Ursächlich sind den mitotischen Checkpoint betreffende Störungen. Der Zellzyklus-Kontrollmechanismus gewährleistet eine ordentliche Chromosomensegregation durch Verlängern der Anaphase, bis alle duplizierten Chromatiden an der Metaphasenplatte angeordnet sind. Defekte führen zu Chromosomenfehlsegregation und Aneuploidie der Tochterzellen. (21)

Zu den Defekten zählt neben Mutationen von Checkpoint-Sensoren die Amplifikation von Zentrosomen, Anker für Mikrotubuli bei der Ausbildung des Spindelapparates. Die Bildung mehrerer Spindelpole führt zu ungleicher Chromosomenverteilung. (22, 22) Eine Telomerdysfunktion ist genauso mit instabilen Chromosomen assoziiert (23). Telomere sind repetitive Sequenzen an den Enden von Chromosomen zum Schutz der Erbinformation vor Brüchen oder Fusion während der Chromosomensegregation. Bei jeder Zellteilung werden die Telomere verkürzt, bis ab einer kritischen Länge die Apoptose der Zelle eingeleitet wird. In Stamm- oder Immunzellen ist eine Verlängerung durch die Telomerase möglich. (23) In frühen Karzinomstadien finden sich, verursacht durch extensive Proliferation, vermehrt verkürzte Telomere, die zur Chromosomeninstabilität beitragen. Bei fortgeschrittenen Karzinomen konnte eine Telomerase-Überfunktion mit verlängerten Telomeren beobachtet werden, die zur Immortalität des Gewebes führt und Tumorerwuchs und -metastasierung vorantreibt. (23)

In Tumoren kommt es bei durchschnittlich 30 % zu Allelverlust, dem „Loss of heterozygosity“, beispielsweise durch mitotische Non-Disjunction oder chromosomale Deletion (20). Chromosom 1, 5, 8, 17 und 18 sind beim kolorektalen Karzinom am häufigsten von dieser Ursache der chromosomalen Instabilität betroffen (24). Als weitere Ursache genomischer Instabilität liegen bei etwa 15 % aller sporadischen Kolonkarzinome Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) vor (25). Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen des Genoms. Die Korrektur der dort häufig auftretenden Mutationen erfolgt durch Proteine des DNA-Mismatch-Repair-Systems. Ein durch Mutation oder epigenetische Veränderungen hervorgerufener Ausfall der DNA-Reparaturproteine hMLH1 und hMSH2, hMSH6 und hPMS2 hat Längenveränderungen der repetitiven Sequenzen zur Folge, die eine Karzinomentstehung vorantreiben können. (26)

Eine dritte Variante, die zu genomischer Instabilität führt, ist das Gensilencing durch Hypermethylierung von CpG-Inseln (CIMP = CpG Island Methylator Phenotype). CpG-Inseln sind

Abschnitte des Genoms, in welchen vermehrt Cytosin-Guanin-Folgen auftreten, und häufig in Promotorregionen zu finden (22). Eine Methylierung dieser Inseln führt als Mechanismus epigenetischer Genregulation zu Genrepression: das Gen wird nicht abgelesen, es entsteht kein Genprodukt. Ein durch Methylierung herbeigeführtes Stummschalten von Tumorsuppressorgenen kann somit zur Entstehung von Neoplasien beitragen. (22)

Neben dem von Fearon und Vogelstein vorgestellten Tumorprogressionsmodell, der Adenom-Karzinom-Sequenz, in welcher sich durch erwähnte Mutationen aus gesundem Kolonepithel über dysplastische adenomatöse Polypen schließlich Karzinome entwickeln, ist der serratierte Karzinogeneseweg inzwischen als Alternative bekannt. Dabei kommt es bereits initial zu einer Onkogenaktivierung via BRAF-Mutation (27). Die Serin-Threonin-Kinase wirkt ähnlich wie das k-RAS-Protein auf eine Reihe regulatorischer Signalwege der Zelle, welche Apoptose, Zellteilung und -wachstum kontrollieren (28). Die dadurch hervorgerufene Apoptosestörung in den Kolonkrypten kann anfangs noch durch Zellzyklusregulatoren wie p16 kompensiert werden (29). Schließlich führt die erhöhte Lebensdauer der neoplastischen Zellen jedoch zu der bereits erläuterten verstärkten Methylierung der CpG-Inseln (29). Hier ist also nicht der CIN-Pathway Hauptverursacher der genomischen Instabilität, sondern die beiden anderen Mechanismen: Stummschalten von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen resultiert in ungehemmtem Wachstum und hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) (4). Weiterhin existiert eine Mischform beider Karzinogenesewege (29). Die Hypermethylierung der CpG-Inseln wird dabei durch eine k-RAS-Mutation eingeleitet. Begleitet von p53- und APC-Mutationen weisen auf diesem Weg entstehende serratierte Adenokarzinome Mikrosatellitenstabilität (MSS) oder geringe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L) auf. (29)

### 1.2.2 Welche Faktoren erhöhen das Risiko, an kolorektalem Karzinom zu erkranken?

Die Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom werden als modifizierbar und nicht modifizierbar kategorisiert.

#### a) Nicht modifizierbare Risikofaktoren

Die Entstehung des Kolonkarzinoms ist mit fortgeschrittenem Alter assoziiert. Ab 40 Jahren steigt das Risiko für sporadische Kolonkarzinome stark an; über 90 % treten bei über 50-Jährigen auf (2, 30). Doch auch in der jüngeren Bevölkerung ist das Kolonkarzinom keine Seltenheit: es gehört zu den 10 häufigsten malignen Tumoren in der Gruppe der 20- bis 49-Jährigen und geht im Vergleich zum Auftreten bei älteren Personen mit einem aggressiveren Wachstum und geringerer Differenzierung einher (31, 32). Bei dieser Patientengruppe kann man davon ausgehen, dass einer der folgenden, das Karzinomrisiko erhöhenden Faktoren vorliegt.

95 % aller sporadischen Kolonkarzinome gehen aus adenomatösen Polypen, also Wucherungen der Drüsenzellen des Kolonepithels, hervor (33). Ein Drittel bis die Hälfte der Bevölkerung entwickelt im Laufe des Lebens eines oder mehrere Kolonadenome, allerdings entstehen aus diesen nur in 10 % invasive Karzinome (34, 35). Dabei gilt: Je größer und je häufiger das Adenom, desto höher die Gefahr der Entartung (36). Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz, in welchem Kolonadenome Vorgängerläsionen von Karzinomen darstellen, kalkuliert für die maligne Transformation eines Adenoms etwa 10 Jahre (37). Karzinome aus serratierten Polypen (vgl. 1.3.1: Histopathologie) über den alternativen Karzinogeneseweg entwickelten sich über etwa 15 Jahre (38).

Leiden Verwandte ersten Grades an einem Kolonkarzinom, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten im Individuum um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Ist mehr als ein Verwandter betroffen, beziehungsweise liegt das Erkrankungsalter eines Verwandten unter 50 Jahre, so ist das Risiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms bereits um das Drei- bis Sechsfache gesteigert. (39, 40) Gleichzeitig ist die Letalität des Kolonkarzinoms bei Patienten mit positiver Familienanamnese, möglicherweise durch verstärkte Primärprävention und Screenings, geringer (41). Der Einfluss der Genetik auf die Erkrankung wird auch bei folgenden autosomal-dominanten Syndromen deutlich:

Das hereditäre, nicht polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) geht mit einem bis zu 80-prozentigen Lebenszeitrisko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms einher (42). Bei dieser Erkrankung liegt eine Mutation von DNA-Mismatch-Reparaturgenen mit

Mikrosatelliteninstabilität vor. Sporadische Mutationen können nicht beseitigt werden, dies führt auch zu extrakolonischen Neoplasien (42). Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) besteht als obligate Präkanzerose sogar ein 100-prozentiges Erkrankungsrisiko, begründet in einer Keimbahnmutation des APC-Gens (43). Karzinome, hervorgerufen durch diese Syndrome, treten bereits in frühem Alter auf und machen 6 % aller Kolonkarzinome aus (HNPCC 5 %, FAP 1 %) (42). Neben weiteren selteneren genetischen Syndromen können auch andere Erkrankungen das Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms erhöhen: Eine lange Krankheitsdauer bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kann durch die andauernde Entzündung der Darmschleimhaut die Bildung eines kolorektalen Karzinoms verursachen (10, 44). Weiterhin kann eine Infektion mit Schistosoma die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms fördern (45).

#### b) Modifizierbare Risikofaktoren

Zu den modifizierbaren Risikofaktoren zählen Rauchen (46) und hoher Konsum von Alkohol (47–49). Wenig Bewegung (50) und Adipositas (51) steigern die Wahrscheinlichkeit, ein Kolonkarzinom zu entwickeln, im Speziellen ist abdominale Adipositas besonders risikobehaftet (52, 53). Auch der Verzehr von rotem Fleisch sowie von gepökeltem, geräuchertem, gesalzenem beziehungsweise andersartig chemisch verarbeitetem Fleisch soll das Kolonkarzinomrisiko erhöhen (54–56). Der Zusammenhang ist dabei nicht vollständig geklärt; es wird von einer Karzinogenbildung bei starkem und langem Erhitzen von Rind, Schwein oder Lamm ausgegangen (57). Zusätzlich könne ein bisher noch nicht identifiziertes Rindervirus die Entstehung von kolorektalem Karzinom triggern (58).

## 1.3 Histopathologie

### 1.3.1 Welche histopathologischen Veränderungen treten während der Genese des kolorektalen Karzinoms auf?

Normales Kolonepithel weist eine runde Zellform und Krypten mit Becherzellen auf. Kommt es durch Veränderung im genetischen Pool der Zelle (vgl. 1.2.1: Die kolorektale Karzinogenese) zur Bildung eines Adenoms, fällt dieses durch hyperchromatische, fehlend ausgereifte Epithelzellen mit länglicher Zellform und stiftartigen Zellkernen auf (59, 60). Weiterhin ist das Adenomepithel mehrschichtig und durch ein Fehlen von Becherzellen gekennzeichnet. Unterschieden werden tubuläre Adenome (65–80 %) aus verzweigt schlauchförmigen Drüsen mit meist gestieltem Wachstum von villösen Adenomen (5–10 %) mit fingerförmigen Ausfaltungen der Mukosa und breiter Basis (61). Tubulovillöse Adenome bezeichnen eine Mischform beider Arten (60, 61). Ein weiterer Typus ist das serratierte Adenom mit sägezahnartigen Epithelknospen, welches in das traditionell (TSA) und das sessil serratierte Adenom (SSA) eingeteilt werden kann (62). Diese Vorgängerkarzinome des serratierten Adenokarzinoms können aus hyperplastischen Polypen hervorgehen (63). Dabei entwickelt sich das SSA über den serratierten Karzinogeneseweg Richtung Karzinom, während das seltenere TSA bei fortschreitender Entwicklung zum Karzinom molekulare Veränderungen beider Karzinogenesewege aufweist (vgl. 1.2.1: Die kolorektale Karzinogenese) (29). Adenome werden zudem nach dem Grad ihrer Dysplasie in Low-Grade- und High-Grade-Adenome eingeteilt, welche ihre Potenz zur malignen Transformation beschreiben. Diese ist bei villösen Adenomen gegenüber tubulären erhöht. (61) Die Kriterien der Dysplasie bestehen neben eben genannten hyperchromatischen Nuklei und fehlender Ausreifung der Zellen aus kribriformem Wachstum, fehlendem Stroma zwischen den Krypten und damit einer Architekturstörung des Gewebes (60). Wichtig für die Einteilung als Adenom ist die erhaltene Muscularis mucosae, die beim invasiven Adenokarzinom bereits durch die Tumorzellen durchbrochen ist: dort bestehen atypische, unscharf abgegrenzte Drüsen über die Mukosa hinaus (60). Außerdem wird das Ausmaß der Ähnlichkeit der Tumorzellen zu ihrem Originalgewebe bestimmt (Grading) und das Gewebe als gut differenziert (G1), mäßig (G2), schlecht (G3) oder undifferenziert (G4) beurteilt (64). Bei Adenokarzinomen wird dabei vor allem auf die regelrechte Ausbildung der Drüsen geachtet. G1-Adenokarzinome zeigen eine tubuläre Differenzierung der Epithelschichten und eine apikal-basale Zellorientierung. Das Zytoplasma enthält Mukus, Keratin und Glykogen. Wenig differenzierte Tumoren weisen diese Eigenschaften nicht mehr auf, eine Zuordnung zum

Ursprungsgewebe wird schwieriger: pleomorphe Zellen und Nuklei, Hyperchromasie durch Hyperploidie, sowie erhöhte mitotische Aktivität sind zu beobachten (65). Dabei gehören Karzinome mit Differenzierungsgrad G1 und G2 zu den prognostisch günstigeren Low-Grade-Karzinomen, während ein Grading von G3 beziehungsweise G4 aggressivere High-Grade-Karzinome bezeichnet (64). Weiteres Kriterium für High-Grade-Karzinome ist eine frühe lymphogene Metastasierung. Über 90 % aller kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome (2, 33). Diese werden in muzinöse, serratierte oder kribriforme Adenokarzinome vom Komedotyp, in mikropapilläre, medulläre oder Siegelringzellkarzinome subtypisiert. Weiterhin lassen sich das adenosquamöse, das spindelzellförmige, das Plattenepithelkarzinom und das undifferenzierte Karzinom klassifizieren. (27) Die einzelnen Karzinomtypen treten verschieden häufig auf und gehen mit differenten Prognosen einher: Siegelringzellkarzinome beispielsweise machen 1 bis 2 % aller CRCs aus und wurden grundsätzlich als aggressiv eingestuft, da zum Diagnosezeitpunkt häufig fortgeschrittene Tumorstadien vorliegen und sie im Vergleich zu anderen Adenokarzinomen eine erhöhte Inzidenz an Peritonealkarzinose aufweisen (60, 66). Der Terminus geht auf die Morphologie der Tumorzellen zurück: ein hoher intrazellulärer Muzingehalt drückt den Zellkern in den Außenbereich des Zytoplasmas, sodass das Erscheinungsbild an einen Siegelring erinnert (27). Früher stets zu schlecht differenzierten Karzinomen gerechnet, ist eine Untersuchung des Mikrosatellitenstabilitätsstatus bei Siegelringzellkarzinomen heute obligat und entscheidet neben dem Differenzierungsgrad über das Grading: Mikrosatelliteninstabile Tumoren (MSI-H) werden ob ihrer günstigen Prognose zu den Low-Grade-Karzinomen gruppiert, während eine Mikrosatellitenstabilität (MSS) beziehungsweise wenige mikrosatelliteninstabile Tumorzellen (MSI-L) für ein High-Grade-Karzinom definieren (27). Auch bei muzinösen und medullären Karzinomen ist die Mikrosatelliteninstabilität häufig und wird deshalb stets zusätzlich untersucht. (27, 60) Neben dem Grading ist auch das mit Hilfe der TNM-Klassifikation vollzogene Staging ein wichtiger Bestandteil der histopathologischen Untersuchung.

### 1.3.2 Die TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms – eine Einteilung des Schweregrades der Erkrankung

Die TNM-Klassifikation wurde in den 40er Jahren entwickelt und wird seit 1950 von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) aktualisiert. Sie dient der Einschätzung des Ausbreitungsgrades der Erkrankung und der Prognose des Patienten, dem Staging, indem die

Eindringtiefe und lokale Infiltration des Tumors (T), der Befall von Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) histopathologisch sowie mit bildgebenden Verfahren beurteilt werden. Als Zusatzkriterien können Blutgefäßinvasion, Lymphgefäßinvasion und die perineurale Invasion angegeben werden. (67)

T-Stadium	
Tx	Keine Aussage über Ausdehnung des Primärtumors möglich
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration auf Mukosa beschränkt; keine Infiltration der Lamina muscularis mucosae
T1	Infiltration durch Lamina muscularis mucosae in Submukosa, Lamina muscularis propria bleibt tumorfrei
T2	Infiltration der Lamina muscularis propria
T3	Infiltration der Subserosa oder von nicht-peritonealisiertem perikolischem beziehungsweise perirektalem Fettgewebe, oder beides; keine Infiltration der Serosa oder der Nachbarorgane
T4a	Infiltration der Serosa
T4b	Infiltration benachbarter Organe oder Gewebe
N-Stadium	
Nx	Keine Aussage über Lymphknotenbefall möglich
N0	Keine regionäre Lymphknotenbeteiligung
N1a	Karzinomzellen in einem regionären Lymphknoten nachweisbar
N1b	Karzinomzellen in ein bis zwei regionären Lymphknoten nachweisbar
N1c	Tumorsatellitenzellen in Subserosa, perikolischem oder perirektalem Fettgewebe nachweisbar, regionäre Lymphknoten nicht infiltriert
N2a	Karzinomzellen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten nachweisbar
N2b	Karzinomzellen in $\geq 7$ regionären Lymphknoten nachweisbar
M-Stadium	
cM0	Keine Fernmetastasen nach klinischer Beurteilung (pM0 nur bei Autopsie möglich)
M1a	Fernmetastasen in einem Organ beziehungsweise entfernten Lymphknoten
M1b	Fernmetastasen in mehr als einem Organ beziehungsweise mehreren entfernten Lymphknoten oder Peritonealkarzinose

*Tabelle 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms. T = Invasionstiefe des Tumors, N = Lymphknotenstatus, M = Fernmetastasen. In dieser Tabelle nicht abgebildet sind die Zusatzkriterien Blutgefäßinvasion (V0 = keine Gefäßinvasion, V1 = Mikroskopische Gefäßinvasion, V2 = Makroskopische Gefäßinvasion), die Lymphgefäßinvasion (L0 = keine Lymphgefäßinvasion, L1 = Lymphgefäßinvasion) und die perineurale Invasion (Pn0 = keine perineurale Invasion, Pn1 = perineurale Invasion)*

*Nach: Ch. Wittekind, H.-J. Meyer: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 2010, ISBN 978-3-527-32759-1. Aktuelles Handbuch zur TNM-Klassifikation der UICC (67).*

### 1.3.3 Lokalisation des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom tritt am häufigsten im Rektum auf, gefolgt vom sigmoidalen Karzinom. Colon transversum und descendens sowie Colon ascendens und das Caecum sind am wenigsten von Tumorbildung betroffen. (68)

#### 1.3.4 Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom metastasiert auf lymphatischem und hämatogenem Weg sowie per continuitatem. Dabei erfolgt die Metastasierung abhängig von der Tumorlokalisation: Karzinome des Kolons (> 16 cm Abstand zur Anokutanlinie) streuen hämatogen über die Vena portae in die Leber und lymphogen in die mesenterialen Lymphknoten. Die Metastasierungsstraßen von Rektumkarzinomen werden in die des oberen (12–16 cm Abstand zur Anokutanlinie), mittleren (6–12 cm Abstand zur Anokutanlinie) und unteren Drittels (< 6 cm Abstand zur Anokutanlinie) unterschieden (64, 69). Im oberen Drittel disseminieren die Tumorzellen über die paraaortalen Lymphknoten und die Vena portae, im mittleren Rektumdrittel zusätzlich über inguinale Lymphknotenstationen und die Vena cava. Karzinome des unteren Drittels metastasieren über den Abfluss der Vena cava in die Lunge sowie neben paraaortalen und inguinalen auch in pelvine Lymphknoten. Nach Leber und Lunge sind häufig Skelett und zentrales Nervensystem von Fernmetastasen betroffen (70). Laut Seed-and-Soil-Hypothese von Paget existieren deshalb Prädilektionsorgane für Metastasen eines Karzinoms, weil diese als „fruchtbarer Boden“ (Soil) ein begünstigendes Mikromilieu für die Tumorzelle (Seed) aufweisen (71). Die Leber als Metastasierungsort des kolorektalen Karzinoms kann damit sowohl als Exempel der Seed-and-Soil- als auch der anatomisch-mechanischen Metastasierungshypothese dienen: 19–31 % aller Patienten mit Kolonkarzinom entwickeln im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen (72).

#### 1.3.5 Welche zellulären Mechanismen ermöglichen eine Metastasierung? Die epitheliale mesenchymale Transition als Voraussetzung für die Bildung von Filiae

Während der Metastasierung kommt es anschließend an eine klonale Expansion und proangiogenetische Aktivität der Tumorzellen zu einer Invasion der Basalmembran und Migration durch die extrazelluläre Matrix (ECM) (73). Letzteres kann nur durch eine Änderung des Phänotyps der neoplastisch veränderten Epithelzellen erreicht werden: Sie erlangen die Fähigkeiten und Eigenschaften mesenchymaler Zellen. Diese epitheliale mesenchymale Transition (EMT) ist nicht nur ein Schlüsselprozess bei der Metastasierung von Karzinomen, sondern essentiell während Embryogenese und Organentwicklung sowie bei Wundheilung und Fibrose. (73) Die Epithelzelle ist in ihrem Zellverband durch zahlreiche Zell-Zell-Kontakte mit den umliegenden Epithelzellen verknüpft und über einen Schlussleistenkomplex bestehend aus Tight Junctions, Desmosomen und Zonulae adhaerentes mit der Basalmembran verbunden. In

den Zonulae adhaerentes ist die zytoplasmatische Komponente des Transmembranproteins E-Cadherin über  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\alpha$ -Catenin mit dem das Zytoskelett formenden Aktin verbunden. (74) Tight Junctions aus Okkludinen und Claudinen sorgen als impermeable Barriere für einen Diffusionsstopp von Ionen und Transmembranproteinen. Im Gegensatz dazu erlauben die aus Connexinen bestehenden Gap Junctions einen direkten Stoffaustausch benachbarter Zellen. (74) Diese spezifischen strukturellen und funktionellen Merkmale schaffen eine Zellpolarität, sodass eine apikale von einer basolateralen, der Basalmembran zugewandten, Seite unterschieden werden kann (74).

Während der EMT kommt es nun zum Verlust von Zelladhäsionsmolekülen wie Okkludinen, Claudinen und E-Cadherin, und damit zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und Polarität (74). Eine E-Cadherin-Repression ist assoziiert mit erhöhtem invasivem und metastatischem Potenzial des Tumors sowie verringertem Patientenüberleben, deshalb wird auch E-Cadherin inzwischen als Tumorsuppressorgen eingestuft. (65, 74, 75) Die Tumorzelle dissoziiert. Dabei wird die Basalmembran unter Ausschüttung von Proteasen und Inhibition von Antiproteasen der Stromazelle (Tissue-Inhibitor-Metalloproteinasen (TIMP) 1 und 2) durch die Tumorzelle degradiert (74, 75). Die Expression von Matrixmetalloproteinasen wird reguliert durch Interleukine, Wachstumsfaktoren und  $\text{TNF-}\alpha$ . (75) Sie werden substratspezifisch in Kollagenasen (u.a. MMP 1, 8 und 13), Gelatinasen (u.a. MMP 2 und 9), Stromelysine (u.a. MMP 3, 10 und 11), und Matrilysine (MMP 7) kategorisiert (76). Eine erhöhte Produktion von MMP 7 durch kolorektale Krebszellen ist nachgewiesen und korreliert mit Metastasierung und Prognose. MMP 2 und 9 treiben über Kollagen-IV-Hydrolyse die Zerstörung der Basalmembran voran. (77)

Das Phänomen der EMT wird unter anderem durch Hypoxie, oxidativen Stress,  $\text{TGF-}\beta$  1 und  $\text{TNF-}\alpha$  angestoßen und findet deshalb sowohl bei Entzündung als auch bei Karzinombildung statt (78). Genannte Faktoren induzieren, zum Teil über NF $\kappa$ B-Aktivierung, die Transkription von SNAIL (78). SNAIL 1 verstärkt wiederum die Expression proinflammatorischer Mediatoren (Interleukine) und gilt als Repressor des Epithelzellmarkers E-Cadherin (65, 74, 79). Auch SNAIL 2 (SLUG) bewirkt über Supprimierung von E-Cadherin, Okkludinen und desmosomalem Cadherin 121 eine Dissoziation von Zellkontakten (65).  $\text{TGF-}\beta$  1 und Hypoxie führen außerdem zur Aktivierung des Time-Without-Symptoms-of-disease-and-Toxicity-of-treatment-Gens (TWIST), dessen Genprodukt über Zellkontaktverlust, Aktivierung mesenchymaler Marker und Motilitätsinduktion eine Veränderung des Phänotyps der Epithelzellen bewirkt (80). Das

Zinkfingerprotein ZEB 1, das ebenfalls zu den EMT-Aktivatoren gezählt wird, wird verstärkt an der invasiven Tumorfront exprimiert (81). Dort begünstigt es durch Unterdrückung der Synthese von Basalmembran-Komponenten wie Laminin und Kollagen IV den Abbau der Basalmembran (81). Über die durch den Wnt-Pathway verursachte  $\beta$ -Catenin-Stabilisation (vgl. 1.2.1: Die kolorektale Karzinogenese) wird ebenfalls die Transkription der EMT-Induktoren SNAIL 1 und 2, Twist sowie ZEB 1 und 2 verstärkt (75). Eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin an der invasiven Tumorfront kann also bei gleichzeitiger E-Cadherin-Suppression beobachtet werden und gilt als Prädiktor für zukünftige Metastasierung (82). Neben dem TGF- $\beta$ - und Wnt-Pathway verursacht auch die Aktivierung von Wachstumsfaktorsignalwegen wie EGFR-Downstream-Pathways (RAS-RAF-MAPK und PI3K-PTEN-AKT) eine Unterdrückung der E-Cadherin-Expression (65, 75). Verändert regulierte Genexpression führt also in einem hochkomplexen Zusammenspiel zur Transition der tumorösen Epithelzelle.

Die neoplastische Zelle bindet an extrazelluläre Matrix, und Aktine sowie Integrine tragen zur aktiven Bewegung (Lokomotion) bei. Die Zelle weist nun eine erhöhte Transkription mesenchymaler Markerproteine wie Vimentin, N-Cadherin und Matrixmetalloproteinasen auf, erscheint fibroblastoid und ist motil. (73) Auch die Produktion anderer ECM-Bestandteile unterscheidet sich bei mesenchymal veränderten Zellen von der des Epithels: Statt der Basallaminakomponenten Kollagen IV und Laminin werden die Kollagene I, III und V synthetisiert, zusätzlich zu nicht-epithelialen Integrinen, Proteoglykanen und Hyaluronsäure (65).

Ist die Zelle zur Migration befähigt, invadiert sie Blut- beziehungsweise Lymphgefäße. Im Gefäß bildet sich ein Tumorzellthrombus, der mit dem Blut- beziehungsweise Lymphstrom verschleppt wird: die neoplastischen Zellen werden systemisch gestreut. Die Immunevasion, also ein Nichterkennen der Karzinomzellen durch Zellen des Immunsystems, ist dabei essentiell. (75) Am für Mikro- und Makrometastasenbildung geeigneten Gewebe siedeln sich die Tumorzellen an. Die Adhäsionspräferenz in der Leber kann unter anderem durch die Expression eines bestimmten Integrinprofils der kolorektalen Tumorzellen erklärt werden. Diese Subtypen binden an Laminin, welches in luminalen epithelialen portalen und hepatischen Gefäßen stark exprimiert wird. (83) Nach Adhäsion und Extravasation ist der reverse Prozess der EMT vonnöten, die mesenchymale epitheliale Transition (MET). Auch ein Fehlen von Proteinaseinhibitoren und das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren kennzeichnen den idealen Metastasierungsort. Zellproliferation und Angiogenese erfolgen im Anschluss. (75)

#### 1.4 Prävention: Welche Maßnahmen zur Minimierung des persönlichen Erkrankungsrisikos sind möglich?

Protektive Maßnahmen bestehen in der Verringerung von Risikofaktoren, die statistisch mit vermehrtem Auftreten des kolorektalen Karzinoms einhergehen (vgl. 1.2.2 b: Modifizierbare Risikofaktoren). Diese Assoziationen belegen nicht zwangsläufig einen kausalen Zusammenhang – eine Beseitigung der Risikofaktoren verhindert daher nicht zwingend das Auftreten des kolorektalen Karzinoms. Für die Primärprävention gelten folgende Richtlinien: Eine protektive Maßnahme besteht in der Reduktion von Übergewicht. Personen, die regelmäßig Sport treiben, verringern ihr Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken, um 25 % im Vergleich zu nicht sportlich Aktiven (50). Empfohlen werden von der American Cancer Society demnach 150 Minuten moderate beziehungsweise 75 Minuten starke sportliche Aktivität pro Woche. Ein Verzicht auf Rauchen und moderaten bis hohen Alkoholkonsum verringert das Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Neben dem Verzicht auf rotes respektive verarbeitetes Fleisch gibt die American Cancer Society der Bevölkerung weitere diätetische Leitlinien zur Protektion vor Erkrankung an Kolonkarzinom. So ist der Konsum von Ballaststoffen (84, 85) sowie ein moderater Konsum von Obst und Gemüse (86, 87) empfohlen. Laut Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft ist eine ausgewogene Ernährung ohne Gewichtszunahme zu empfehlen.

Auch Medikamente können das Risiko für die Entwicklung des Kolonkarzinoms senken. Eine Studie bei Patienten mit HNPCC zeigte, dass die tägliche Einnahme von Aspirin die Kolonkarzinominzidenz verringert (88, 89). Verschiedene Ursachen werden dabei vermutet. Die bei Krebspatienten erhöhte Plättchenaktivierung vereinfacht das Anhaften von Tumorzellen am Endothel und schützt neoplastische Zellen vor der Erkennung durch das Immunsystem. Dies werde durch die Hemmung der Cyclooxygenase 1 und damit verbundene Inhibition der Thrombozytenaggregation verhindert. Auch die Inhibition der Cyclooxygenase 2 soll sich durch Minderung der Produktion des inflammatorisch und antiapoptotisch wirksamen Prostaglandins E<sub>2</sub> negativ auf die Entwicklung von Karzinomen auswirken. Ebenso scheinen COX-unabhängige Wirkungen von Aspirin über die Interaktion mit NFκB eine Apoptose der CRC-Zellen einzuleiten. (90) Allerdings ist Aspirin aufgrund der erhöhten Blutungsneigung und der Bildung von gastrointestinalen Ulzera nicht zur Primärprävention geeignet. Die wichtigste Maßnahme der Sekundärprävention kolorektaler Karzinome ist das Darmkrebscreening für die gesamte Bevölkerung ab 50 Jahren (vgl. 1.5: Diagnostik).

## 1.5 Screening und Diagnostik des kolorektalen Karzinoms

Anamnese und körperliche inklusive digital-rektale Untersuchung (DRU) bilden die Basisdiagnostik des kolorektalen Karzinoms. Für die Normalbevölkerung ist ein Screening ab 50 Jahren empfohlen, da die Inzidenzrate für das Kolonkarzinom in der Altersgruppe ab 50 Jahren stark ansteigt (vgl. 1.2.2: Risikofaktoren). Dies beinhaltet zunächst den jährlich durchzuführenden Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT), bei dem 3 Stuhlproben untersucht werden. Eine 30-Jahre-Follow-Up-Studie konnte bei regelmäßiger Teilnahme eine Reduktion der Letalität an kolorektalem Karzinom um 32 % nachweisen (91).

Man unterscheidet dabei Guajakharz-basierte (gFOBT) von immunologisch-basierten Tests (iFOBT), welche mit Hilfe von monoklonalen Globin-Antikörpern menschliche Blutbestandteile im Stuhl detektieren. Aufgrund der stark schwankenden Qualität verschiedener gFOBT werden inzwischen High Sensitivity Tests empfohlen (zum Beispiel Hemoccult II Sensa®), welche eine Sensitivität von 79,4 % und eine Spezifität von 86,7 % aufweisen (92). Dabei wird zur Detektion von okkultem Blut der Farbumschlag bei Oxidation von Guajakonsäure durch Wasserstoffperoxid genutzt, die durch die Pseudoperoxidaseaktivität des Bluthämoglobins katalysiert wird (93). Deshalb können Hämorrhoidal-, Zahnfleisch- oder nasale Blutungen, NSAR-Einnahme sowie verschiedene Nahrungsbestandteile wie rotes Fleisch, peroxidasehaltige Lebensmittel oder peroxidase-hemmendes Vitamin C das Testergebnis falsch positiv beziehungsweise negativ beeinflussen (64, 92, 93).

Diese Einschränkung besteht bei immunochemischen Tests nicht; eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber hochsensitiven gFOBTs wird erreicht (93). Bereits bei einem positiven von drei verschiedenen Testergebnissen wird eine Koloskopie empfohlen. Zu einer Darmspiegelung wird der Normalbevölkerung ebenfalls ab 50 Jahren geraten. (64) Die Koloskopie stellt den Goldstandard der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms dar. Mit einer Sensitivität von bis zu 99 % (94) ermöglicht sie Diagnostik und Therapie gleichermaßen: Polypen und Adenome können erkannt und zur Unterbrechung der Adenom-Karzinom-Sequenz abgetragen werden. Durch das Abtragen von Adenomen und Polypen wurde in Studien eine Reduktion der CRC-Letalität um bis zu 53 % festgestellt (95). Dennoch wird davon ausgegangen, dass bis zu 25 % aller Adenome und Polypen, im Besonderen flache Läsionen, nicht erkannt werden (96, 97). Auch die Komplikationsrate ist im Gegensatz zu nichtinvasiven Untersuchungen erhöht. Das gesamte Kolon bis zur Bauhin'schen Klappe sowie der distale Teil des Ileums können auf Läsionen untersucht werden. Bei unauffälligem Befund sollte die

Untersuchung nach 10 Jahren wiederholt werden. (64) Für die Untersuchung des Rektums im Speziellen empfiehlt sich zusätzlich die starre Rektoskopie, welche bei Vorliegen eines Karzinoms eine genaue Messung des Abstands zwischen dem distalen Tumorrand und der Linea dentata erlaubt. Bei Risikopersonen gelten gesonderte Regelungen: Verwandte ersten Grades von Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom sollten 10 Jahre vor Diagnosestellung des Erkrankten koloskopiert werden; für FAP- und HNPCC-Patienten ist unter anderem eine jährliche Koloskopie ab dem 10. beziehungsweise 25. Lebensjahr empfohlen. (64)

Bei positivem bioptischen Befund aus der Koloskopie sind weiterführende Untersuchungen für die Feststellung des Ausmaßes der Erkrankung sowie für die Therapieplanung vonnöten. Neben Abdomensonografie und Röntgen-Thorax zur Metastasensuche sowie Endosonografie zur Bestimmung der Infiltrationstiefe wird das Carcino-Embryonale Antigen (CEA) als Tumormarker für die Nachsorge und als Hinweis auf die Prognose des Patienten bei Vorhandensein von Lebermetastasen (vgl. 1.7: Prognose) bestimmt. (64) Nach erfolgreicher Therapie sollte das CEA-Level sinken, ein erneuter Anstieg weist auf Karzinomrezidiv hin. Ein CT von Abdomen, Becken und Thorax sowie Kontrastmittelsonografie der Leber sind als ergänzende Untersuchungen möglich. (64) Bei Rektumkarzinom sollte ein MR beziehungsweise CT des Beckens mit Angabe des Abstands zur mesorektalen Faszie erfolgen. Bei Schwierigkeiten und Hindernissen während der Koloskopie kann die virtuelle Variante via CT- oder MR-Kolonographie als Ersatz dienen. Eine komplette Koloskopie sollte in diesem Fall 3–6 Monate nach erfolgter Therapie wiederholt werden. (64)

## 1.6 Therapie und Nachsorge bei kolorektalem Karzinom

### 1.6.1 Therapie des Primärtumors: Chirurgische Entfernung als kurative Maßnahme

Die Therapie ist abhängig von Größe und Lokalisation des Tumors, dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie dem Zustand des Patienten. Kurative Therapiegrundlage ist die chirurgische Exzision des Kolonkarzinoms (64). Standard ist dabei die offen-operative oder laparoskopische komplette mesokolische Exzision unter Mitnahme von Mesenterium und mindestens 12 regionalen Lymphknoten sowie unter Ligatur zu- und abführender Blut- und Lymphgefäße. (98) Diese wird in No-Touch-Technik durchgeführt, um eine Tumorzell dissemination zu verhindern. Die En-Bloc-Resektion des Karzinoms erfolgt dabei als Hemikolektomie rechts unter Mitnahme des endständigen Ileums bei Caecum- und Colon-ascendens- beziehungsweise links bei Descendensbefall, als Transversumresektion unter Mitnahme der Flexuren bei Colon-transversum-Karzinom oder als Sigmoidektomie bei Tumorlokalisation im Sigma. (64) Sind die Kolonflexuren befallen, wird erweitert reseziert. Die Anastomose der verbleibenden Kolonenden wird als Ileotransversostomie bei Hemikolektomie rechts, Ascendo-/Transversosigmoideostomie beziehungsweise Transversorektostomie bei Hemikolektomie links oder Sigma- und Colon-descendens-Resektion vollzogen. (64) Bei Erreichen einer R0-Resektion kann ab UICC-Stadium II eine adjuvante Therapie verordnet werden, ab UICC-Stadium III ist diese indiziert: Bei Lymphknoten-positivem Befund konnte eine deutliche Verbesserung der Prognose mit zusätzlicher Chemotherapie erreicht werden (99).

Grundsatz der chirurgischen Therapie des Rektumkarzinoms ist die partielle beziehungsweise totale mesorektale Exzision (PME/TME), also die Entnahme von Rektum, Mesorektum und umgebender mesorektaler Faszie (100). Bei Vorliegen eines Carcinoma in situ oder T1 < 3 cm, N0 und G1/G2 kann lokalchirurgisch vorgegangen werden, zum Beispiel mittels transanaler endoskopischer Mikrochirurgie (101). Die Resektion erfolgt en-bloc mit gleichzeitiger Entnahme tumoradhärenter Organe zur Vermeidung einer Tumorzell dissemination (64). Die Lokalisation des Karzinoms entscheidet über die Art des chirurgischen Vorgehens. Bei Tumoren des oberen Rektumdrittels wird eine kontinenserhaltende anteriore Rektumresektion mit partieller mesorektaler Exzision bis 5 cm distal des makroskopischen Tumorrandes und anschließender End-zu-End-Anastomose durchgeführt (102). Mit dieser Maßnahme soll dem Verbleiben eventueller distal liegender Lymphknotenmetastasen vorgebeugt werden (103). Tumoren des mittleren und unteren Rektums werden total mesorektal bis zum Beckenboden exzidiert und anschließend tief End-zu-End koloanal anastomosiert, wenn möglich unter

Ausbildung eines Kolon-J-Pouches. Der Sicherheitsabstand beträgt hier bei Low-Grade-Karzinomen 1–2 cm, bei High-Grade-Dysplasien sollte das Karzinom mit größerem Abstand abgetragen werden. Tiefsitzende Rektumkarzinome des unteren Drittels (< 2 cm zur Anokutanlinie) werden häufig via abdominoperinealer Rektumexstirpation operiert, weiterhin kann bei tumorfreier puborektaler Schlinge die intersphinkteräre Rektumresektion angewandt werden. (64) Ein Kontinenserhalt ist bei diesen Verfahren nicht möglich, allerdings kann bei vorangegangener neoadjuvanter Therapie und damit erwirkter Reduktion der Tumormasse intraoperativ die Entscheidung zum Sphinktererhalt getroffen werden (104). Konsens bei totaler mesorektaler Exzision besteht über die Anlage eines protektiven Ile- oder Kolostomas zur Senkung der Morbidität durch Anastomoseninsuffizienzen (105).

Bei UICC-Stadium II und III ist bei Rektumkarzinom eine neoadjuvante Therapie indiziert (64).

#### 1.6.2 Therapie bei Fernmetastasen: Resektion versus Chemotherapie und lokoregionäre Verfahren

Primär R0-resektable Lungen- und Lebermetastasen sollten chirurgisch exzidiert werden. Dabei muss bei Lungenmetastasen auf Anzahl und Volumen der Metastasen, pulmonale Vorschädigung und Residualvolumen nach Resektion geachtet werden. Bei Befall der Leber sollten weniger als 70 % des Leberparenchyms beziehungsweise weniger als 7 Segmente und 3 Lebervenen betroffen sein, damit eine primäre Resektion möglich ist. Außerdem müssen eine extrahepatische Tumormanifestation, schwere Begleiterkrankungen und eine Leberinsuffizienz oder -zirrhose Child B/C ausgeschlossen werden. (64) Diese Konstellation trifft jedoch auf nur etwa 20–30 % aller an Lebermetastasen des CRC Erkrankten zu (106). Irresektable Metastasen werden mit systemischer Chemotherapie behandelt. Solange in dieser Situation keine Komplikationen wie durch den Primärtumor verursachte Stenosen oder Hb-relevante Blutungen verursacht werden, wird dieser nicht chirurgisch therapiert. (64) Gelingt bei neoadjuvanter Therapie ein Downsizing der Metastasen, kann durch die sekundär erreichte Resektabilität eine chirurgische Exzision angeschlossen werden (107). Weitere Therapiemöglichkeiten bei chirurgisch nicht entfernbaren Lebermetastasen sind lokoregionäre Verfahren (64). Dabei ist die Radiofrequenzablation eine etablierte Methode. Mit Hilfe von über eine Elektrode laufendem hochfrequentem Strom werden Hitzenekrosen im Tumorgewebe erzeugt. Die Ablationssonde wird perkutan oder chirurgisch eingeführt und ihre Lage stets über bildgebende Verfahren kontrolliert, sodass gesundes Gewebe geschont werden kann. (108)

Die Selektive Interne Radiotherapie (SIRT) wird bisher nur in klinischen Studien und bei Fehlen anderer Therapieoptionen angewandt (64). Radionuklidkügelchen, Mikrosphären genannt, werden über die Arteria hepatica in die die Metastasen versorgenden Gefäße eingebracht. Eine Konzentrierung der unter Betastrahlung zerfallenden Yttrium-90-Radioisotope am Wirkungsort ist durch die gesonderte Blutversorgung der Leber gewährleistet: Während gesundes Lebergewebe durch die Leberarterie und die Pfortader versorgt wird, erfolgt die Blutzufuhr der Metastasen über Äste der Arteria hepatica. Im Kapillarbett zerstört die über mehrere Tage emittierte Strahlung das umliegende Gewebe mit einer Reichweite von 11 mm. Diese Form der Radioembolisation scheint in Studien das mediane Überleben austherapierter Patienten zu verlängern sowie den Progress von Lebermetastasen zu verzögern. (109) Die Laserinduzierte Interstitielle Thermotherapie (LITT) wirkt über Thermonekrosen und sollte nur in Studien erfolgen (64). Bei Peritonealkarzinose ist sowohl eine zytoreduktive chirurgische Therapie mit hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC) als auch die systemische Polychemotherapie möglich (64).

### 1.6.3 Wesentlicher Bestandteil einer erfolgreichen Therapie: Die Verlaufskontrolle nach chirurgischer Intervention

Im Anschluss an die Operation sollten Anamnese und klinische Untersuchung sowie CEA-Bestimmung und Abdomensonografie in den ersten 2 Jahren alle 6 Monate, daraufhin jährlich durchgeführt werden. Eine Koloskopie sollte ein Jahr nach Operation und danach alle 5 Jahre erfolgen. Bei Rektumkarzinom kann jährlich eine Röntgen-Thorax-Aufnahme gemacht und bei nicht stattgefundenen Radiochemotherapie zusätzlich eine Sigmoidoskopie beziehungsweise Rektoskopie halbjährlich während der ersten zwei Jahre nach Operation durchgeführt werden. (64)

## 1.7 Prognose bei Erkrankung an kolorektalem Karzinom

### 1.7.1 Die UICC-Einteilung des kolorektalen Karzinoms – ausreichend für die Einschätzung der Prognose des Patienten?

Anhand der TNM-Klassifikation wurden einzelne Kombinationen zur besseren Einschätzung der Prognose und Therapie von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) zu verschiedenen Stadien zusammengefasst.

UICC-Stadien	T	N	M	5-JÜ Kolon-Ca	5-JÜ Rektum-Ca (110)
Stadium 0	Tis	N0	M0		
Stadium I	T1–T2	N0	M0	92 %	87 %
Stadium II	T3–T4	N0	M0		
II A	T3	N0	M0	87 %	80 %
II B	T4a	N0	M0	63 %	49 %
II C	T4b	N0	M0		
Stadium III	Jedes T	N+	M0		
III A	T1–T2	N1	M0	89 %	84 %
	T1	N2a	M0		
III B	T3–T4a	N1	M0	69 %	71 %
	T2–T3	N2a	M0		
	T1–T2	N2b	M0		
III C	T4a	N2a	M0	53 %	58 %
	T3–T4a	N2b	M0		
	T4b	N1-N2	M0		
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M+	11 %	12 %
IV A	Jedes T	Jedes N	M1a		
IV B	Jedes T	Jedes N	M1b		

*Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms von 2011 mit Angabe der den UICC-Stadien zugeordneten relativen 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜ) für das Kolon- sowie das Rektumkarzinom in Prozent. Die zur Berechnung der relativen 5-Jahres-Überlebensraten genutzten Daten stammen von Patienten aus der Datenbank des US-National Cancer Institute SEER zwischen 2004 und 2010. Diese wurden nach der vorherigen TNM-Klassifikation eingeteilt: Ein Stadium II C war dabei noch nicht vorhanden. Patienten, die nach aktueller Einteilung Stadium II C entsprechen, sind in der Tabelle mit Patienten des Stadiums II B zusammengefasst. Patienten mit Stadium III C können aktuell teilweise Stadium III B zugerechnet werden und umgekehrt. (110, 111)*

Allerdings scheint die Aussagekraft des TNM-Systems bezüglich der Prognose limitiert. Patienten in denselben UICC-Stadien weisen deutliche Unterschiede in Überlebenszeit und Rezidivrate auf (112). Es wurden abgesehen von der histopathologischen Beurteilung weitere einflussreiche Parameter ermittelt, die helfen sollen, die Prognose der Patienten expliziter zu beurteilen, wie zum Beispiel das immunologische Mikromilieu in Tumorumgebung (vgl. 1.7.2: Prognosefaktoren Lebermetastasen). Weltweit wird daran gearbeitet, einen

einheitlichen Risikoscore zur Stratifizierung der Patienten hinsichtlich des tumorspezifischen Überlebens zusätzlich zur TNM-Klassifikation zu entwickeln.

1.7.2 Welche Faktoren haben bei Auftreten von Lebermetastasen eine prognostische Bedeutung?

Fernmetastasen, insbesondere Lebermetastasen, sind ein entscheidender prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten (vgl. 1.3.4: Metastasierung). Diesbezüglich wurden verschiedene Eigenschaften von Lebermetastasen untersucht, die bei der Einschätzung des Patienten-Outcome helfen sollen:

1.7.2.1 Anzahl, Größe und Lokalisation der kolorektalen Lebermetastasen

Im 1999 von Fong et al. entwickelten Prognosescore werden eine Anzahl von  $\geq 2$  kolorektalen Lebermetastasen, eine Größe von  $> 5$  cm im Durchmesser, ein präoperatives CEA-Level von  $\geq 200$  ng/dl, ein nodal positiver Primärtumor sowie Rekurrenz innerhalb des ersten Jahres nach Operation als die Prognose negativ beeinflussende Parameter festgelegt (113). Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse und weisen außerdem auf die Einschränkung der Überlebenszeit bei bilobärem Befall hin (114, 115). Weiterhin können Mikrometastasen vorliegen, welche als disseminierte Tumorzellverbände bis 2 mm definiert sind. Ihr Vorhandensein gehe mit einer Reduktion der Überlebenszeit nach Lebermetastasenresektion einher. (116) Auch das Maß der intrahepatischen Invasion erlaubt eine Beurteilung der Prognose des Patienten. Eine Beteiligung der Pfortader und des Lymphsystems wirke sich negativ auf das Outcome der Patienten aus (117). Die Bedeutung eines Befalls hepatischer Gefäße sowie einer Invasion der Gallengänge wird kontrovers diskutiert (114, 118, 119).

1.7.2.2 Resektionsrand nach chirurgischer Intervention

Der Resektionsrand bei der Entfernung von Lebermetastasen ist ein entscheidender prognostischer Faktor. Die Überlebensrate bei R0-Resektionen, also der Entfernung des Tumors im Gesunden, ist signifikant erhöht gegenüber R1-Resektionen, bei welcher in der histopathologischen Untersuchung Tumorzellen im Resektionsrand sichtbar werden (120). Eine einheitliche Empfehlung für den Mindestabstand, der bei der Resektion gehalten werden soll, besteht jedoch nicht. Traditionell empfohlen wird ein Abstand von 10 mm (114, 121). Resezierbare Metastasen sollten dennoch immer exzidiert werden, auch wenn dieser Abstand

nicht eingehalten werden kann (120). Verschiedene Studien suggerieren, dass auch ein geringerer Abstand ausreicht, da keine signifikanten Unterschiede in Überlebenszeiten bei tumorfreiem Resektionsrand verschiedener Dicke nachgewiesen werden konnten (120–123). Holdhoff sowie Kokudo et al. bekräftigten diese These durch Analyse von Tumor-DNA, welche sie nur bis 4 mm Abstand zum Karzinom vorfinden konnten (124, 125). Andere Studien heben das Potenzial der neoadjuvanten und adjuvanten Therapie hervor: mit Hilfe von systemischer Chemotherapie habe das Nichteinhalten eines Mindestabstands keinen negativen Einfluss auf das Patientenüberleben, selbst zwischen R0- und R1-Resektion sei kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben festzustellen, womit insgesamt die Notwendigkeit eines Mindestabstands in Frage gestellt wird (115, 126, 127).

#### 1.7.2.3 Molekulare Faktoren des kolorektalen Karzinoms und kolorektaler Lebermetastasen

Die genetischen Veränderungen bei der Tumorentstehung (vgl. 1.2: Ätiologie) wie Mikrosatelliteninstabilität, BRAF-Mutation oder auch eine Hypomethylierung der repetitiven LINE-DNA-Sequenz können Hinweise auf die Prognose des Patienten geben, dies gilt natürlich für den Primärtumor wie auch für Fernmetastasen (75). Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilität begünstigen das Outcome des Patienten. Dabei seien einerseits vermehrt zytotoxische T-Zellen an der Tumorfront vorhanden, die die Apoptoserate der Tumorzellen erhöhen. Eine vermehrte zytotoxische Immunreaktion, hervorgerufen durch abnorme Peptide, die der mutierte Phänotyp produziert, wird diskutiert (128). Außerdem wurden kRAS- und BRAF-Mutationen, welche negative Prognose-Indikatoren darstellen, bei Mikrosatelliteninstabilität seltener beobachtet (129).

Der long-interspersed-nucleotide-element(LINE)-1-DNA-Abschnitt weist zahlreiche CpG-Inseln in seiner Sequenz auf. Die verminderte Methylierung von Cytosin durch DNA-Methyltransferasen erhöht die Expression des entsprechenden Gens (vgl. 1.2: Ätiologie). Eine Hypomethylierung dieser Sequenz tritt vermehrt bei Mikrosatelliten-stabilen Karzinomen auf und geht mit erhöhter Letalität bei kolorektalem Karzinom einher. (130, 131) Durch Untersuchung dieser molekularen Faktoren wird eine patientenadaptierte und prognosespezifische Begleitung und Therapie möglich.

#### 1.7.2.4 Immunzellinvasion bei kolorektalen Lebermetastasen

Die Einwanderung bestimmter Immunzellen wirkt sich positiv auf das Outcome der Patienten aus. Eine hohe Anzahl an zytotoxischen T-Zellen, Th1- und Gedächtniszellen sei bei mehreren Karzinomtypen von Vorteil für das klinische Outcome (132). Brunner et al. stellten ein verlängertes Patientenüberleben bei Häufung von CD45RO<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen am Tumorrand von Lebermetastasen des CRC fest. Oft bestehe bei eben diesem Zellvorkommen zusätzlich eine fibröse Kapsel. (133) Beim Primärtumor wurde ebenso die Anwesenheit von CD45RO<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- sowie von CD3<sup>+</sup>-Zellen mit einer verbesserten Prognose assoziiert (134–136). Eine Häufung von TH-17-Zellen sei hingegen negativ mit dem Patientenüberleben korreliert (137).

#### 1.7.2.5 Bildung einer fibrotischen Pseudokapsel um kolorektale Lebermetastasen

Ein weiterer Umstand, der zu einer Verbesserung der Prognose des Patienten führt, ist das Vorhandensein einer bindegewebigen Kapsel um die Metastasen. In verschiedenen Studien wurde die Häufigkeit einer Kapsel von 20 % bis zu 70 % angegeben (123, 133, 138, 139). Dabei erfolgte teilweise auch eine Einteilung in dicke und dünne Kapseln nach Anzahl der Kollagenschichten (mehr beziehungsweise weniger als 10 Schichten), anhand welcher eine positive Korrelation zwischen Dicke der Kapsel und Überlebensdauer konstatiert werden konnte (138). Bei Vorkommen einer fibrösen Kapsel wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von 39–88 % erreicht, während diese bei Patienten ohne Kapsel zwischen 19 und 34 % lag (119, 138–140). Lunevicius et al. bezeichneten die eingekapselten Metastasen als signifikant differenziert gegenüber nicht eingekapselten. Nicht nur die 5-Jahres-Überlebensrate, auch die Rezidivrate sei bei Patienten mit bekapselten Metastasen geringer. Deshalb eigne sich auch die Kapsel als prognostischer Marker für Patienten mit CRCLM. (141)

## 2. Ziele und Fragestellungen

### 2.1 Spezifischer Hintergrund der vorliegenden Studie und Vorarbeiten

Die Arbeitsgruppe von Professor Fichtner-Feigl beschäftigt sich intensiv mit Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Zwischen 2004 und 2010 wurde eine Biobank humaner kolorektaler Lebermetastasen aufgebaut. Dabei untersuchten Brunner et al. die gesammelten CRCLM von 201 Patienten zunächst auf die Einwanderung von Immunzellen. Das gehäufte Auftreten von CD45RO<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Randbereich des Tumors wurde mit einer positiven Auswirkung auf das Überleben der Patienten assoziiert. Bei Vorkommen der Immunzellen in der zentralen Tumorregion sowie in weiterem Abstand von der Metastase konnte kein Zusammenhang mit der Überlebensdauer konstatiert werden. Bei der Analyse der CRCLM fanden Brunner et al. bei 38 % eine die Metastase umgebende fibröse Pseudokapsel. Ihr Vorkommen korreliert ebenfalls signifikant mit dem Patientenüberleben (vgl. 1.7.2: Prognostische Faktoren von Lebermetastasen). (133)

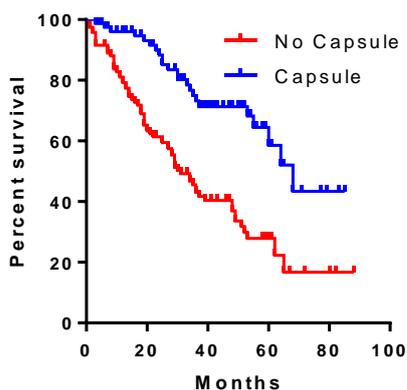


Abbildung 2: Ein Vergleich der Dauer des Patientenüberlebens in Monaten nach Metastasenresektion zwischen eingekapselten und nicht eingekapselten Lebermetastasen zeigt ein signifikant verlängertes Überleben für Patienten mit bekapselten CRCLM,  $p < 0,0001$ . Mit Genehmigung von Brunner et al. (133).

	Mittleres Überleben in m
Keine Kapsel	30 ± 3
Fibröse Pseudokapsel	68 ± 6
Total	49 ± 6

Tabelle 3: Angabe des mittleren Patientenüberlebens ± Standardabweichung in Monaten von Patienten mit bekapselten und nicht bekapselten Lebermetastasen. Mit Genehmigung von Brunner et al. (133).

Eine Prüfung des Zusammenhangs von Zellinfiltration und Pseudokapselbildung zeigte, dass bei hohem Vorkommen der Immunzellen im Randbereich und gleichzeitig niedriger Anzahl in weiterem Abstand von der Metastase häufig eine Pseudokapsel vorhanden war (47,7 – 83,5 %) (133).

	Kapsel	Keine Kapsel	Total
CD4 Ratio < 2	3 (5,3 %)	54 (94,7 %)	57 (100 %)
CD4 Ratio > 2	71 (49,3 %)	73 (50,7 %)	144 (100 %)
CD8 Ratio < 2	0 (0 %)	110 (100 %)	110 (100 %)
CD8 Ratio > 2	76 (83,5 %)	15 (16,5 %)	91 (100 %)
CD45RO Ratio < 2	2 (4,3 %)	44 (95,7 %)	46 (100 %)
CD45RO Ratio > 2	74 (47,7 %)	81 (52,3 %)	155 (100 %)

*Tabelle 4: Zusammenhang zwischen Immunzellvorkommen am Tumorrand und Kapselbildung. Die Immunzell-Ratio ergibt sich aus der Anzahl der jeweiligen Immunzellen am Tumorrand geteilt durch die Anzahl derselben Art von Zellen in weiterem Abstand von der Metastase. Bei niedrigem Vorkommen (Zell-Ratio < 2) von CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- oder CD45RO<sup>+</sup>-Zellen am Tumorrand im Vergleich zu entfernt angesiedelten Zellen findet sich in nur 5 von 213 Fällen eine bindegewebige Kapsel. Bei hohem Zellvorkommen in der Randregion und gleichzeitig geringer Anzahl von CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- oder CD45RO<sup>+</sup>-Zellen in weiterem Abstand von der Metastase (Zell-Ratio > 2) besteht häufig gleichzeitig eine Kapsel (47,7 – 83,5 %). Mit Genehmigung von Brunner et al. (133).*

Weiterhin fiel auf, dass bei Kapselbildung häufiger eine R0-Resektion erreicht wurde. Um das Vorhandensein einer Pseudokapsel als unabhängigen Faktor für die Überlebensdauer des Patienten zu verifizieren, wurde diese innerhalb der Patientengruppe mit R0-resezierten Lebermetastasen analysiert. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit abgekapselten CRCLM gegenüber CRCLM ohne Pseudokapsel bei R0-Resektion ( $p < 0,04$ ). Bei R1-Resektion war der Unterschied in der Überlebensdauer von Patienten mit CRCLM mit und ohne Pseudokapsel nicht signifikant. Die Parameter Lokalisation (kolonisch versus rektal), Infiltrationstiefe, Lymphknotenstatus und Grading des Primärtumors, der Zeitpunkt der Diagnose der Lebermetastasen (synchron versus metachron), die Größe und Anzahl der Lebermetastasen sowie eine stattgefunden Chemotherapie innerhalb drei Monate vor Metastasenresektion seien nicht signifikant mit dem Vorhandensein einer Kapsel korreliert. (133) Zudem wurden die CRCLM immunhistochemisch untersucht. Eine Masson-Trichrom-Färbung sowie eine Färbung von  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin ( $\alpha$ -SMA) konnte Kollagen als Komponente der Pseudokapsel identifizieren und die Anwesenheit von  $\alpha$ -SMA-produzierenden aktivierten Myofibroblasten im Kapselbereich nachweisen. (133)

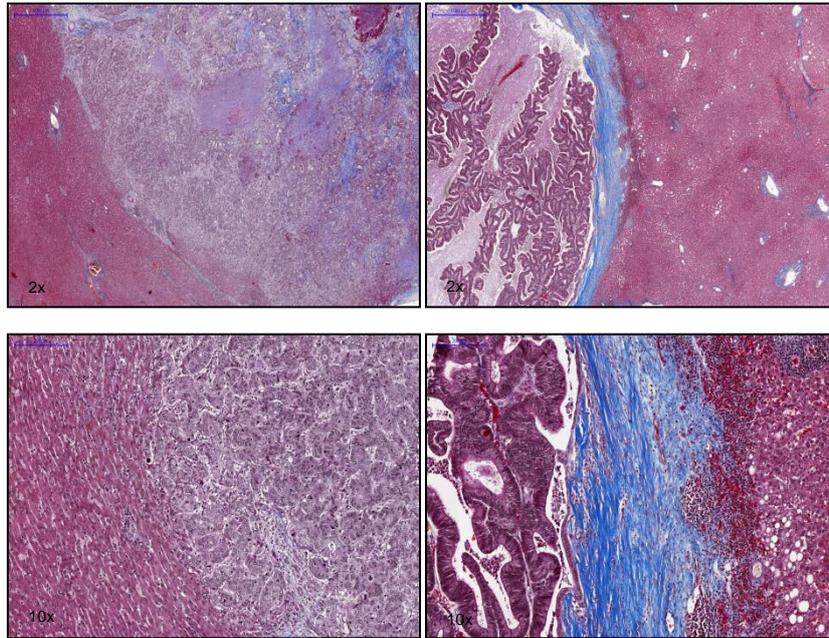


Abbildung 3: Masson-Trichrom-Färbung kolorektaler Lebermetastasen zur Darstellung der fibrösen Pseudokapsel. Linke Seite: Keine Kapsel. Rechte Seite: Blau gefärbtes Bindegewebe stellt die fibröse Pseudokapsel dar. Mit Genehmigung von Brunner et al. (133).

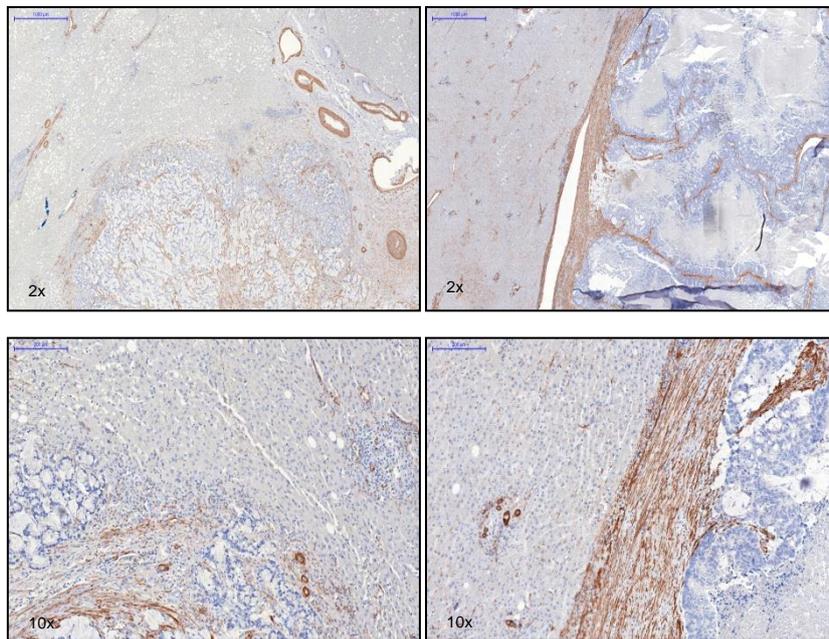


Abbildung 4:  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin ( $\alpha$ -SMA) – Färbung kolorektaler Lebermetastasen zur Darstellung von Myofibroblasten. Linke Seite: Keine Kapsel, rechte Seite: Die braune Färbung der  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin produzierenden aktivierten Myofibroblasten wird im Kapselbereich deutlich. Mit Genehmigung von Brunner et al. (133).

## 2.2 Ziele dieser Arbeit

Die bisher existenten Vorarbeiten lassen weder Rückschlüsse auf die Ursachen oder Auslöser einer Kapselbildung noch auf die zugrundeliegenden Mechanismen zu. Ebenso konnte bislang nicht geklärt werden, ob die Kapsel durch die Tumorzellen selbst produziert wird oder Ergebnis einer Immunreaktion gegen die Metastasen ist. In einem ersten Schritt zur Identifikation dieser Mechanismen sollte deshalb das spezifische Mikromilieu der CRCLM als wesentliche Einflussgröße für die Rekrutierung von Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und damit Kompetenz zur ECM-Produktion charakterisiert werden. Ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse bei Kapselbildung und Kenntnis von Triggerfaktoren birgt die Möglichkeit der Kapselausprägung um Lebermetastasen als zukünftige therapeutische Option.

Ziele dieser Arbeit bestanden

- 1) in der Identifizierung weiterer Kapselbestandteile und der Untersuchung ihrer Anordnung im Raum
- 2) im Vergleich der EMT-Aktivität des Tumormikromilieus bekapselter und nicht bekapselter kolorektaler Lebermetastasen. Dabei gingen wir von einer erhöhten EMT-Aktivität bei bekapselten CRCLM aus, die sowohl Tumorzellen, als auch die Metastase umgebende Zellen einschließt.
- 3) in der Suche nach Strategien des Organismus, auf Ebene der Genregulation Invasivität und Aggressivität der CRCLM zu vermindern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kapselkomponenten und EMT-spezifische Faktoren im Randbereich kolorektaler Lebermetastasen untersucht, sowohl auf mRNA-Ebene mit Hilfe eines EMT Pathway Profiling PCR Arrays und qPCR statistisch relevant regulierter Gene, als auch auf Proteinebene mit immunhistochemischen Methoden.

Basierend auf den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sollte sich die Kapselbildung als wichtiger prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten besser charakterisieren und verstehen lassen.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### Software

AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Citavi 5.3.0.5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Mirax Desk Manual Bright Field Scan Software	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Roche Light Cycler® 480 Software	Roche, Mannheim, Deutschland
Sabioscience Quiagen	<a href="http://www.sabioscience.com">http://www.sabioscience.com</a>

##### Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dampfgarer	Severin, Sundern, Deutschland
Feuchte Kammer	Simport, Beloeil, Kanada
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom Type: CUT 6062	SLEE, Mainz, Deutschland
Minizentrifuge Sprout	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Quarzküvette Suprasil 10mm Schichtdicke	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Research Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Roche Light Cycler® 480	Roche, Mannheim, Deutschland
Shandon Coverplate™	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	SLEE, Mainz, Deutschland
Zeiss Mirax Desk Scanner	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland

##### Verbrauchsmaterial

Deckgläser 24x32mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Falcons	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Mikrocentrifuge Tubes, RNase und DNase frei 1,7ml	Costar, Cat.No. 3621, Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mikrotomklingen Typ Feather R35	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 ml	Kisker BioTech GmbH&Co KG
Pipettenspitzen, steril, RNase-frei 10, 20, 200, 1000 µl	Molecular BioProducts

Powder Free Gloves	Komberlex Clark Europe Limited, Reigate, Surrey, UK
RT <sup>2</sup> PCR Array Loading Reservoir	Cat. No. 338162, Qiagen, Hilden, Deutschland
Safe lock Tubes 1,5ml und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland

#### Kits

Custom Human RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array	Cat.No. 330131 CAPH12100, Quiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® FFPE Kit	Cat.No. 73504, Qiagen, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> PreAmp cDNA Synthesis Kit	Cat.No. 330451, Qiagen, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition	Cat.No. 330231 PAHS-090ZA, Qiagen, Hilden, Deutschland

#### Chemikalien

AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen	DAKO North America Inc., CA93013, USA
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS LabLine, Hamburg, Deutschland
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BisBenzimide H33258	Sigma Aldrich GmbH P.O., St. Louis, MO, USA
Citratpuffer	2,93g auf 1 L, pH 6,0, Usb Corporation, Cleveland, OH, USA
Deparaffinization Solution	Cat. No. 19093, Qiagen, Hilden, Deutschland
DEPC treated Water	G-Biosciences, St.Louis, MO 63043, USA
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fluorescent Mounting Medium	DAKO North America Inc., CA, USA
Goat Serum 5%	Sigma Aldrich GmbH P.O., St. Louis, MO, USA
H <sub>2</sub> O, destilliert	Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom Ag Cat. No. L182-05 auf 5l H <sub>2</sub> O
RNase-Exitus Plus™	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
RT <sup>2</sup> PreAmp Pathway Primer Mix Human Epithelial to Mesenchymal Transition	Cat. No. 330241 PBH-090Z, Qiagen, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix	Cat. No. 330502, Qiagen, Hilden, Deutschland
Water PCR tested, DNA free	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol-Ersatzmedium: Roti® Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zytochem Plus HRP-Kit Rabbit 600 Tests	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Zytochem Plus HRP-Kit Broad Spectrum 600 Tests	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

## Antikörper

Antikörper	Spezies	Reaktivität	Konjugat	Klonalität	Verdünnung	AEC-Einwirkzeit	Hersteller und Katalognummer	Konzentration
β-Catenin	Hase	Human, Maus, Ratte, Affe, Zebrafisch	-	Polyklonal	1:50	4 Min.	CellSignaling #9562	
Caldesmon 1	Hase	Human	-	Polyklonal Klon: RB19749	1:10	1,5 Min.	Abgent AP6609c	0,25mg/ml
Collagen 1	Maus	Human, Ratte, Kuh, Wild, Schwein, Hase	-	Monoklonal, Klon: COL-1	1:200	2 Min.	Abcam Ab90395	
Col 3	Maus	Human, Maus, Ratte	-	Monoklonal Klon: Col-29	1:25	3 Min.	Abcam Ab82354	
Col 5	Maus	Human, Schaf, Hase, Kuh, Hund, Schwein, Känguru	-	Monoklonal Klon: 1E2-E4/Col5	1:25	3 Min.	Abcam Ab112551	
Cy3 Sekundärantikörper	Ziege	IgG- Hase	Cy3®	Polyklonal	1:100	-	Abcam Ab6939	
E-Cadherin	Hase	Human Maus	-	Monoklonal	1:100	3,5 Min.	CellSignaling 24E10, #3195	
Fibronectin 1	Maus	Human	-	Monoklonal, Klon: IST-4	1:200	2,5 Min.	Sigma-Aldrich F0916	
Phospho-GSK-3 α, β (Ser21/9)	Hase	Human, Maus, Hase, Affe, Zebrafisch	-	Polyklonal	1:50	3 Min.	CellSignaling #9331	
Keratin 19 (BA17)	Maus	Human	-	Monoklonal	1:200	2 Min.	CellSignaling #4558	
MAP1b	Maus	Human, Ratte, Kuh	biotinyliert	Monoklonal Klon: 3G5	1:100	3 Min.	Abcam Ab79195	
Snail 1	Maus	Human	-	Monoklonal	1:50	1 Min.	LifeSpanBioSciences, Inc. LS-C161335	
Snail 3	Hase	Human	-	Polyklonal	1:150	2 Min.	Sigma-Aldrich HPA016757	0,18 mg/ml
Sox 10	Maus	Human	-	Monoklonal, Klon: 1E6	1:200	1 Min.	Sigma-Aldrich SAB1402361-100UG	1 mg/ml
Steap 1	Maus	Human	-	Monoklonal Klon: J2D2	1:50	1,5 Min.	LifeSpanBioSciences, Inc. LS-B3003	1 mg/ml
Tomoregulin 1	Hase	Human, Maus, Ratte	-	Polyklonal	1:100	3 Min.	Biorbyt Orb101484	0,5 mg/ml
Twist 1	Maus	Human	-	Monoklonal Klon: 3E10	1:100	5 Min.	Abcam Ab135180	0,5 mg/ml
Versican	Maus	Human	-	Monoklonal, Klon: 8.S.270	1:150	3 Min.	US Biological L1350A	-1 mg/ml

## 3.2 Methodik

Die Experimente wurden in der Abteilung von Professor Fichtner-Feigl im Labor für Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Regensburg von Februar 2013 bis November 2013 durchgeführt. Das Gewebe für die RNA-Isolation sowie für die immunhistochemischen Färbungen wurde aus Paraffinblöcken von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms gewonnen, bereitgestellt durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg.

### 3.2.1 Genexpressionsanalyse durch PCR Arrays

Zur Untersuchung der Rolle der epithelialen mesenchymalen Transition an der Kapselbildung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms wurde als Screening-Methode EMT-spezifischer Faktoren ein EMT Pathway Profiling PCR Array (96-Well Format) eingesetzt. Dieser stellt die Expression von 84 EMT-Schlüsselgenen dar und wurde bei jeweils 3 Metastasen mit und 3 Metastasen ohne Kapselbildung durchgeführt. Als Normwert galt RNA gesunder Leberzellen derselben Patienten, die genauso isoliert und mit zwei EMT Pathway Profiling Arrays amplifiziert wurde.

Nach Auswertung der Ergebnisse der EMT-PCR-Arrays wurden Custom-PCR-Arrays angefertigt, um 12 ausgesuchte EMT-spezifische Gene quantitativ zu validieren.

#### *1. Schritt: RNA-Isolation*

Für die Durchführung der PCR Arrays wurde zunächst RNA von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms mit sowie ohne Kapsel isoliert.

Bei der Arbeit mit RNA wurde auf einen sauberen Arbeitsplatz geachtet: Flächen wurden mit Alkohol vorgereinigt, um RNasen zu zerstören, und Utensilien vor Nutzung mit RNase-Exitus Plus™ behandelt. Es wurde zu jeder Zeit mit RNase- und DNase-freien Reaktionsgefäßen gearbeitet. Alle Proben wurden, wenn nicht anders verordnet, stets auf Eis gelagert.

Die RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy® FFPE Handbook der Firma Qiagen (Protocol: Purification of Total RNA from FFPE Tissue Sections) (142). Die Paraffin-Gewebeblöcke wurden bei -20 °C etwa 20 Minuten gekühlt und im Mikrotom 10 µm dick geschnitten. Vier Schnitte desselben Blocks wurden in einem RNase-freien Eppendorfer Reaktionsgefäß (2 ml) verwahrt. Im ersten Arbeitsschritt wurde das Paraffin gelöst. Nach Zugabe von 320 µl Deparaffinization Solution, 10 Sekunden Durchmischen auf dem Reagenzglasschüttler (Vortex) und Abzentrifugieren wurde die Probe für 3 Minuten bei 56 °C

inkubiert. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurden 240 µl PKD Puffer hinzugefügt, die Probe wurde 10 Sekunden auf dem Vortex gemischt und für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Zur Spaltung der Peptidbindungen und Freisetzung der RNA wurden 10 µl Proteinase K in die untere Phase des Reaktionsgefäßes gegeben, durch Auf- und Abpipettieren mit der Probe vermischt und anschließend 15 Minuten bei 56 °C, danach 15 Minuten bei 80 °C inkubiert. Die Inkubation bei 80 °C soll Quervernetzungsprodukte der RNA lösen, die durch die Paraffinierung der Proben entstehen können. Die untere, durchsichtige Phase der Probe wurde nun in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, 3 Minuten auf Eis inkubiert, und für 15 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Der RNA enthaltende Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, ohne mit dem abzentrifugierten Pellet, bestehend aus Gewebedebris und quervernetzter DNA, in Kontakt zu kommen. 25 µl *DNase Booster Buffer* und 10 µl *DNase I Stock Solution* (hergestellt aus 1500 Kunitz-Einheiten gefriergetrockneter DNase I gelöst in 550 µl RNase-freiem Wasser) wurden anschließend zur Elimination in der Probe vorhandener genomischer DNA zugegeben und durch Wenden des Reaktionsgefäßes mit der Probe vermischt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Probe 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 500 µl RBC-Puffer und daraufhin 1200 µl Ethanol (100 %) zur Probe hinzugefügt und durch Pipettieren durchgemengt. 700 µl des Reaktionsgemisches wurden nun in eine *RNeasy MinElute Spin Column* gegeben, der Deckel verschlossen und das Gefäß von einem 2 ml fassenden Sammelgefäß umgeben. Während der folgenden 15 Sekunden langen Zentrifugation bei > 8000 x g wurde die RNA an die Membran der *RNeasy MinElute Spin Column* gebunden. Der Durchfluss aus dem Sammelgefäß wurde verworfen und der eben beschriebene Vorgang mit dem noch vorhandenen Reaktionsgemisch wiederholt. Im folgenden Waschprozess wurde RPE-Puffer, hergestellt aus 44 ml Ethanol 100 % und 11 ml RPE-Puffer-Konzentrat, verwendet. Dabei wurden jeweils 500 µl in die *RNeasy MinElute Spin Column* gegeben. Nach der ersten Gabe wurde für 15 Sekunden bei > 8000 x g zentrifugiert und nach der zweiten Zugabe des Puffers 2 Minuten bei > 8000 x g. Der Durchfluss im Sammelgefäß wurde jeweils verworfen. Die *RNeasy MinElute Spin Column* wurde in ein neues Sammelgefäß gegeben und zum Trocknen der Membran bei geöffnetem Deckel und maximaler Geschwindigkeit 5 Minuten zentrifugiert, sodass der Restalkohol aus der Probe eliminiert wurde. Um im letzten Schritt die RNA aus der Membran zu eluieren, wurde die *RNeasy MinElute Spin Column* in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, 25 µl RNase-freies Wasser auf die

Membran gegeben und bei geschlossenem Deckel und maximaler Geschwindigkeit 1 Minute zentrifugiert. Bei einem Totvolumen der *RNeasy MinElute Spin Column* von 2  $\mu$ l entstanden dabei 23  $\mu$ l RNA-Eluat.

### *2. Schritt: Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA*

Zur Quantifizierung der extrahierten RNA wurde diese 1:30 mit DEPC-Wasser verdünnt und jeweils 60  $\mu$ l pro Probe in einer Glasküvette im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA, gemessen. Es wurde darauf geachtet, dass die RNA weder mit Proteinen noch mit organischen Komponenten wie Phenolen oder Aromaten verunreinigt war. Dazu wurde die Probe sowohl bei einer Wellenlänge von 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, sowie einer Wellenlänge von 230 nm, dem Absorptionsmaximum organischer Komponenten, gemessen. Lag die Ratio der Proben von  $\lambda$  260/280 zwischen 1,8 bis 2 sowie von  $\lambda$  260/230 über 1,7 konnte davon ausgegangen werden, dass diese nicht kontaminiert waren. Diese Proben wurden für die nächsten Arbeitsschritte verwendet.

### *3. Schritt: cDNA-Synthese*

Zur Herstellung einer für die PCR-Arrays nötigen DNA-Matrize wurde die isolierte RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Es wurde nach dem Protokoll: First Strand cDNA Synthesis (143) des RT<sup>2</sup> PreAmp cDNA Synthesis Handbook der Firma Qiagen vorgegangen. Dabei wurde für jede RNA-Probe ein *Genomic DNA Elimination Mix* aus 900 ng RNA und 2  $\mu$ l GE Puffer hergestellt und mit RNase freiem Wasser zu 10  $\mu$ l aufgefüllt. Dieser wurde 5 Minuten bei 42°C und dann sofort 1 Minute auf Eis inkubiert. Zu jedem *Genomic DNA Elimination Mix* wurden 10  $\mu$ l *Reverse Transcription Mix* (pro Reaktionsgefäß: 4  $\mu$ l 5x BC3-Puffer, 1  $\mu$ l Control P2, 1  $\mu$ l cDNA Synthesis Enzyme Mix, 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor sowie 3  $\mu$ l RNase freies Wasser) hinzugefügt, durch Pipettieren vermischt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden 30 Minuten bei 42 °C, dann sofort für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt.

### *4. Schritt: Preamplifikation der cDNA*

Um ein erfolgreiches Ergebnis der nachfolgenden PCR-Arrays zu garantieren, wurden die Proben nach dem Protokoll *Preamplification of cDNA Target Templates* des RT<sup>2</sup> PreAmp cDNA

Synthesis Handbook (143) bereits vor der qPCR im PCR-Array vervielfältigt. *RT<sup>2</sup>PreAMP PCR Mastermix* und *EMT RT<sup>2</sup>PreAMP Pathway Primer Mix* wurden bei Raumtemperatur aufgetaut beziehungsweise bei Vorhandensein von Präzipitaten eine Minute bei 42°C inkubiert. Der *Preamplification Mix* wurde pro Probe aus 12,5 µl *RT<sup>2</sup>PreAMP PCR Mastermix* und 7,5 µl *EMT RT<sup>2</sup>PreAMP Pathway Primer Mix* hergestellt. 5 µl der zuvor gewonnenen cDNA wurden mit 20 µl *Preamplification Mix* in ein 0,2 ml PCR-Tube gegeben, durch Auf- und Abpipettieren vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben nach folgendem Schema im Thermocycler amplifiziert: 1 Zyklus von 10 Minuten bei 95 °C zur Aktivierung der Hot Start DNA *Taq* Polymerase, danach folgten 8 Zyklen von jeweils 15 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung der doppelsträngigen DNA) und 2 Minuten bei 60 °C (Annealing und Elongation, vgl. 5. Schritt: *EMT-PCR-Arrays*), anschließend wurde auf 4 °C abgekühlt. Die amplifizierten Proben wurden auf Eis gelegt, zu jeder Probe 2 µl *Side Reaction Reducer* zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Der *Side Reaction Reducer* soll noch vorhandene Primer der Preamplifikation eliminieren. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben für 15 Minuten bei 37 °C und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Es wurden sofort 84 µl RNase-freies Wasser zu jeder Probe hinzugefügt und die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert.

#### 5. Schritt: *EMT-PCR-Arrays*

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA beziehungsweise RNA (Reverse-Transkriptase-PCR). Dabei werden zur amplifizierenden Probe spezifische Primer, PCR Puffer, DNA-Nukleotide sowie eine hitzestabile DNA Polymerase, in diesem Fall des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (144), zugegeben. Die Herstellung des PCR Components Mix erfolgte nach Protokoll des *RT<sup>2</sup> PreAmp cDNA Synthesis Handbook* (143) (*Real-Time PCR Using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays - Protokoll*). Dazu wurden zu den 102 µl des Produktes der vorherigen Preamplifikation in einem 5 ml Loading Reservoir weitere 1275 µl *RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix* sowie 1173 µl RNase-freies Wasser gegeben. Der *RT<sup>2</sup>SYBR Green Mastermix* enthält Hot Start DNA *Taq* Polymerase, PCR-Puffer, die DNA-Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green Dye. Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll *Real-Time PCR for RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays* (ab Schritt 3) des *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Handbook* (145) der Firma Qiagen durchgeführt. Je 25 µl PCR Components Mix wurden nun in ein Well des *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays* (96-Well-Format) Human Epithelial to Mesenchymal Transition pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde anschließend mit einer durchsichtigen

Klebefolie überzogen, eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert und die PCR im Roche Light Cycler® 480 gestartet. Die doppelsträngige DNA denaturiert dabei zunächst bei einer Temperatur von 95 °C in Einzelstränge. Im ersten Zyklus (Initialisierung) wird die Temperatur von 95 °C 10 Minuten gehalten, um die Hot Start Taq Polymerase zu aktivieren. In den nachfolgenden Zyklen erfolgt die Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C, anschließend binden die Primer bei 60 °C an die ihnen komplementäre DNA-Sequenz (Annealing) und es folgt die Extension des Stranges an der Matrize durch die DNA-Polymerase (Elongation) für eine Minute. Dieser Zyklus wird 45 Mal wiederholt. Die Primer lagern sich in jedem Zyklus auch an die neu entstandenen DNA-Stränge an, sodass die Amplifikation unter optimalen Bedingungen exponentiell erfolgen sollte. Bei der Real Time PCR kann die Menge der entstehenden Produkte bereits während der PCR quantifiziert werden. Der zunächst inaktive Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green Dye lagert sich während der Elongation in die doppelsträngige DNA ein und wird dadurch aktiviert (146). In der Anfangsphase der PCR ist noch zu wenig Material vorhanden, und in der Endphase (Plateauphase) inhibieren Produktfragmente die PCR, indem sie miteinander hybridisieren, sodass die Quantifizierung in der dazwischen liegenden exponentiellen Phase stattfindet (146). Diese beginnt, sobald der Crossing Point beziehungsweise der Cycle Threshold erreicht ist: der Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz des Zielgens die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Zur Überprüfung der Spezifität wurde nach der PCR mit Hilfe der Roche Light Cycler® 480 Software eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (146). Bei dieser erlaubt eine langsame Steigerung der Temperatur eine Auftrennung der DNA-Doppelstränge der Produkte in Einzelstränge an ihrem jeweiligen Schmelzpunkt. Das eingelagerte SYBR Green wird freigesetzt und dadurch das Fluoreszenzsignal verändert. Die Schmelztemperatur ist definiert als „die Temperatur, bei der die Helixstruktur der DNA zur Hälfte verloren ist“ (146), abhängig von Länge und Basenzusammensetzung eines jeden Gens und damit für dieses spezifisch. So können einzelne PCR Produkte voneinander unterschieden werden.

Im EMT-PCR-Array sind als interne Kontrollen eine Reverse-Transkriptase-Kontrolle sowie eine Positiv-PCR-Kontrolle und eine DNA-Kontaminationskontrolle enthalten. Als Housekeeping-Gene wurden  $\beta$ -2-Mikroglobulin und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzt. Housekeeping-Gene werden nach ihrer Expression in verschiedenen Proben ausgewählt. Die Expression dieser Gene sollte in allen Proben ähnlich hoch sein, damit die Normalisierung der Genexpression aller anderen Gene an ihnen erfolgen kann.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AHNAK	AKT1	BMP1	BMP2	BMP7	CALD1	CAMK2 N1	CAV2	CDH1	CDH2	COL1A2	COL3A1
B	COL5A2	CTNNB1	DSC2	DSP	EGFR	ERBB3	ESR1	F11R	FGFBP1	FN1	FOXC2	FZD7
C	GNG11	GSC	GSK3 $\beta$	IGFBP4	IL1RN	ILK	ITGA5	ITGAV	ITGB1	JAG1	KRT14	KRT19
D	KRT7	MAP1B	MMP2	MMP3	MMP9	MSN	MST1R	NODAL	NOTCH1	NUDT13	OCLN	PDGFRB
E	PLEK2	PPPDE2	PTK2	PTP4A1	RAC1	RGS2	SERPINE 1	SIP1	SMAD2	SNAI1	SNAI2	SNAI3
F	SOX10	SPARC	SPP1	STAT3	STEAP1	TCF3	TCF4	TFPI2	TGF $\beta$ 1	TGF $\beta$ 2	TGF $\beta$ 3	TMP1
G	TMEFF1	TMEM1 32A	TSPAN1 3	TWIST1	VCAN	VIM	VPS13A	WNT11	WNT5A	WNT5B	ZEB1	ZEB2
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

*Tabelle 5: Gentabelle Human Epithelial to Mesenchymal Transition PCR-Array, 96-Well-Platte.*

Symbol	Beschreibung
AHNAK	AHNAK Nucleoprotein
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
BMP1	Bone morphogenetic protein 1
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
CALD1	Caldesmon 1
CAMK2N1	Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
CAV2	Caveolin 2
CDH1	Cadherin 1, Typ 1, E-Cadherin (epithelial)
CDH2	Cadherin 2, Typ 1, N-Cadherin (neuronal)
COL1A2	Collagen, Typ I alpha 2
COL3A1	Collagen, Typ III, alpha 1
COL5A2	Collagen, Typ V, alpha 2
CTNNB1	Catenin (Cadherin-associated protein), beta 1, 88 kD
DSC2	Desmocollin 2
DSP	Desmoplakin
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERBB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
ESR1	Estrogen receptor 1
F11R	F 11 receptor
FGFBP1	Fibroblast growth factor binding protein 1
FN1	Fibronectin 1
FOXC2	Forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)
FZD7	Frizzled family receptor 7
GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G Preotein), gamma 11
GSC	Gooseoid homeobox
GSK3B	Glycogen syntase kinase 3 beta
IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4
IL1RN	Interleukin 1 receptor antagonist
ILK	Integrin-linked kinase
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
JAG1	Jagged 1
KRT14	Keratin 14
KRT19	Keratin 19

KRT7	Keratin 7
MAP1B	Microtubule-associated protein 1 B
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72 kDa gelatinase, 72 kDa type VI collagenase)
MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type VI collagenase)
MSN	Moesin
MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
NODAL	Nodal homolog (mouse)
NOTCH1	Notch 1
NUDT13	Nudix (Nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13
OCLN	Occludin
PDGFRB	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
PLEK2	Pleckstrin 2
PPPDE2	PPPDE peptidase domain containing 2
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2, 24 kDa
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
SIP1	Survival of motor protein interacting protein 1
SMAD2	SMAD family member 2
SNAI1	Snail homolog 1 (Drosophila)
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)
SNAI3	Snail homolog 3 (Drosophila)
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
STEAP1	Six transmembrane epithelial antigens of the prostate 1
TCF3	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
TCF4	Transcription factor 4
TFPI1	Tissue factor pathway inhibitor 1
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1

TMEM132A	Transmembrane protein 132A
TSPAN13	Tetraspanin 13
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
VCAN	Versican
VIM	Vimentin
VPS13A	Vacuolar protein sorting 13 homolog A (S.cerevisiae)
WNT11	Wingless-type MMTV integration site family, member 11
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
ZEB1	Zink finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zink finger E-box binding homeobox 2
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-mikrogobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
HGDC	Human Genomic DNA Contamination
RTC	Reverse Transcription Control
PPC	Positive PCT Control

*Tabelle 6: Legende der Gentabelle des Human Epithelial to Mesenchymal Transition PCR-Array (96-Well-Platte).*

### Custom-PCR-Arrays

Anhand der Ergebnisse der EMT-PCR-Arrays wurden Custom-PCR-Arrays von Quiagen angefertigt, um die 12 Gene Snail 1, Snail 2, Snail 3, pGSK-3- $\beta$ , Caldesmon 1, TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, Twist, Wnt 5a, Wnt 5b, Tomoregulin 1 und Nodal mittels klassischer qPCR im Roche Light Cycler® 480 quantitativ zu validieren. Diesbezüglich wurden 28 weitere Lebermetastasen untersucht, deren Genexpression insgesamt 70 Mal getestet wurde. Es wurde vorgegangen wie bereits in Schritt 1 - 5 erläutert. Während mit einem EMT-PCR-Array die Genexpression einer einzelnen Probe getestet werden konnte, konnten auf einer 96-Well-Platte der Custom-Arrays 6 Proben aufgetragen werden. Deshalb änderten sich im letzten Schritt der Präparation des Custom-PCR-Arrays die Mengenangaben wie folgt: Für die Herstellung des PCR Components Mix wurden zu 17  $\mu$ l des PreAmplification-Produkts (Probe) 212,5  $\mu$ l RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix sowie 195,5  $\mu$ l RNase-freies Wasser gegeben (*vgl. Schritt 5: EMT-PCR-Arrays*).

Als Housekeeping-Gen fungierten erneut  $\beta$ -2-Mikroglobulin und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Der PCR-Array wurde während der Amplifikation auf DNA-Kontamination (HGDC) getestet, und eine interne Reverse-Transkriptase-Kontrolle (RTC) versicherte die ausreichende Funktion desselben Enzyms.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Snail 1	Wnt 5a										
B	Snail 2	Wnt 5b										
C	Snail 3	Tmeff 1										
D	pGSK3 $\beta$	Nodal										
E	Cald 1	$\beta$ 2 M										
F	TGF $\beta$ 1	GAPDH										
G	TGF $\beta$ 2	HGDC										
H	Twist 1	RTC										

Tabelle 7: Gentabelle Custom-PCR-Array.

### *Auswertung der PCR-Arrays*

Zur Auswertung der Ergebnisse der PCR-Arrays wurden die Roche Light Cycler® 480 Software, Microsoft Excel, Graphpad Prism 6 sowie die Online-PCR-Data-Analysis-Plattform von Sabioscience genutzt. Die Crossing Points der einzelnen Schlüsselgene wurden durch die Roche Light Cycler® 480 Software ermittelt und in Microsoft Excel übertragen. Nach Schmelzkurvenanalyse (vgl. *Schritt 5*) wurden die Werte aus der Tabelle eliminiert, die nicht den spezifischen Schmelzpunkt für das nachzuweisende Gen aufwiesen, um das Risiko, unspezifische Amplifikationsprodukte in die Auswertung einzubeziehen, zu minimieren. Anschließend wurde die Microsoft Excel-Tabelle in das PCR-Data-Analysis-Onlineprogramm der Firma Sabioscience hochgeladen. Der Cut-Off für die PCR-Zyklen wurde bei 35 Zyklen festgelegt, sodass alle Crossing Points der PCR bis 35 in die folgenden Berechnungen einfließen. Mit Hilfe des Programms konnten die Haushaltsgene festgelegt, ihr arithmetisches Mittel bestimmt und anhand dieser die übrigen Gene normiert werden:

Es wurde zunächst der Mittelwert der Ct-Werte der „Genes of interest“ der jeweiligen Gruppen a) Kapsel beziehungsweise b) keine Kapsel, sowie die Standardabweichung bestimmt.

$$\text{Average Ct} = (n_1 + n_2 + n_{\dots} + n_x) / x$$

$$\text{Standardabweichung: } \sqrt{\text{Varianz}}$$

$$\text{Varianz} = (x - \mu)^2, \text{ wobei } x = \text{Zufallswert und } \mu = \text{Erwartungswert}$$

Zur Normierung der Werte wurde zunächst  $\Delta\text{Ct}$  ermittelt, indem von diesem Mittelwert der arithmetische Mittelwert der Cycle Thresholds der Haushaltsgene subtrahiert wurde. Anschließend wurde das  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnungsmodell genutzt, um die Genexpression zu analysieren (147).

$$\Delta\text{Ct} = \text{Average Ct (Gene of interest)} - \text{Average Ct (Housekeepinggene)}$$

$$\text{Beziehungsweise: normierte Genexpression einer Gruppe} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (der zu testenden Gruppe)} - \Delta\text{Ct (der Kontrollgruppe)}$$

Mit Hilfe des „Fold Change“ (148) konnte nun die Genexpression einer zu testenden Gruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe, normalisiert auf ein beziehungsweise mehrere Referenzgene, dargestellt werden. Dieser Wert wird im biologischen Sinn auch als „Fold Regulation“ bezeichnet.

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct (\text{der zu testenden Gruppe})} / 2^{-\Delta Ct (\text{der Kontrollgruppe})},$$

*hier:  $-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct (\text{der zu testenden Gruppe}) - \Delta Ct (\text{der Kontrollgruppe}))$*

Lag der Fold Change  $> 2$ , so wurde die Genexpression der zu testenden Gruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe als hoch reguliert angesehen, bei Werten  $< -2$  dementsprechend als herunterreguliert. Das Signifikanzniveau der Ergebnisse wurde bei 5 % angesetzt, es wurde also von einem überzufälligen Zusammenhang ausgegangen, wenn  $p < 0,05$  war. Die p-Werte wurden mit den Werten der normierten Genexpression anhand des Student's-T-Tests berechnet. Die erhaltenen Regulationsunterschiede wurden mit Hilfe von Graphpad Prism 6 in Diagrammen dargestellt. Bei der Auswertung der EMT-Arrays wurde die Genexpression bekapselter und nicht bekapselter Lebermetastasen mit der Genexpression von Normalgewebe der Leber verglichen.

### 3.2.2 Immunhistochemie

Die Lebermetastasen wurden anschließend immunhistochemisch untersucht. Für die Herstellung der Schnittpräparate wurden die Paraffingewebeblöcke in 3 µm dicke Scheiben geschnitten, im 50 °C warmen Wasserbad auf Glasobjektträger übertragen und 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte 30 Minuten im Brutschrank bei 70 °C erwärmt und anschließend 2 x 10 Minuten in Roti® Histol gegeben. In einer darauffolgenden absteigenden Alkoholreihe (2 x 5 Minuten in 100 % Ethanol, 2 x 5 Minuten in 96 % Ethanol und 1 x 5 Minuten in 70 % Ethanol) rehydrierten die Schnitte. Daraufhin wurden sie 10 Minuten in eine 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ethanol-Lösung (20 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 180 ml 70 % Ethanol) gegeben, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Die Schnitte wurden nun zweimal mit Aqua dest. gespült. Eine 30-minütige Hitzevorbehandlung in vorgekochtem Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfgerar sorgte für die Demaskierung der Epitope des Antigens, danach kühlten die Schnitte 30 Minuten ab. Die Objektträger wurden nun mit Aqua dest. in die Shandon Coverplates™ eingespannt und einmal 5 Minuten mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der primären und sekundären Antikörper zu verhindern, wurden die Schnitte 8 Minuten mit 150 µl der Zytochem Blocking Solution inkubiert (Proteinblock). Daraufhin folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (150 µl pro Schnitt) bei 4 °C über Nacht. Zur Überprüfung der Antikörperfunktion wurde eine Negativkontrolle mit Antikörper-Diluent ohne Zugabe des primären Antikörpers durchgeführt.

Die Schnitte wurden am folgenden Tag einmal 5 Minuten mit PBS gespült, dann wurden 150 µl des biotinylierten sekundären Antikörpers (Zytochem AntiRabbit beziehungsweise AntiBroad) aufgetragen, welcher 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte. Nach erneutem Spülen mit PBS (5 Minuten) wurden die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat (Zytochem) inkubiert, welches an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet, und nochmals 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun wurden 150 µl AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) zugegeben, welches durch die HRP (Horseradish Peroxidase) oxidiert wird und sich als rotbrauner Farbstoff darstellt. Nach spezifischer Einwirkzeit wurde die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt und das Gewebe 10 Minuten in Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten unter lauwarmem, fließendem Leitungswasser gebläut und nach Spülen mit Aqua dest. mit Aquatex eingedeckt.

### 3.2.3 Immunofluoreszenz

Für das in der Zonula adhaerens enthaltene Glykoprotein E-Cadherin wurde neben der immunhistochemischen Färbung auch eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei erfolgte dieselbe Behandlung der Schnitte bis zum Auskühlen nach der Hitzevorbehandlung in vorgekochtem Citratpuffer (pH = 6,0). Anschließend wurden die Präparate 3 mal 5 Minuten mit Aqua dest. gespült und einmal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die nachfolgenden Schritte erfolgten in der feuchten Kammer. Als Blockserum fungierte 5 % Goat Serum in PBS (250 µl pro Schnitt), welches eine Stunde bei Raumtemperatur einwirkte. Nach Abklopfen wurden 250 µl des primären Antikörpers (E-Cadherin CellSignaling 24E10, #3195) aufgetragen und die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Gewebe 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl des sekundären Antikörpers Cy3 Goat-Anti-Rabbit (1:100) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Diluent wurde hier 1 % Goatserum in PBS verwendet. Da der Sekundärantikörper lichtempfindlich ist, wurde ab diesem Schritt mit Aluminiumfolie gearbeitet. Die Schnitte wurden erneut 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und mit 250 µl Hoechst (1:5000 in PBS) für eine Minute gefärbt. Nach dreimaligem Spülen mit PBS für 5 Minuten wurden die Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und in lichtgeschützten Objektträgerboxen im Kühlschrank aufbewahrt.

#### *Auswertung IHC*

Die immunhistochemischen beziehungsweise Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit dem Carl Zeiss Mikroskop Observer Z.1 und der Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software ausgewertet. Anschließend wurden einige Färbungen zur besseren Darstellung mit dem Zeiss Mirax Desk Scanner anhand der Mirax Desk Scan Software eingescannt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Pseudokapselaufbaus: Die Identifizierung weiterer Kapselbestandteile und Untersuchung ihrer Anordnung im Raum

Die genaue Charakterisierung der einzelnen Komponenten der fibrösen Pseudokapsel ist nötig zum Verständnis ihres Aufbaus, ihrer Funktion und möglicher Entstehungsmechanismen. Brunner et al. wiesen im Kapselbereich bereits die Produktion von  $\alpha$ -SMA und Kollagen, sowie die Anwesenheit von CD45RO<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nach (133). In der hier vorgelegten Arbeit konnten immunhistochemisch zusätzlich Versican, Kollagen 1 und Kollagen 3 als Kapselbestandteile identifiziert werden. Auch in den Tumorsepten waren diese Intermediärfilamente zu finden. Diese Ergebnisse werden durch die qPCR unterstützt: Versican, Kollagen 1 und 3 waren in CRCLM gegenüber Normalgewebe erhöht. Dabei wurde Kollagen 1 in nicht bekapselten Metastasen häufiger exprimiert als in bekapselten, Kollagen 3 fand sich in CRCLM mit und ohne Kapsel ähnlich häufig exprimiert (vgl. 4.2.5: Für Kollagen und Matrix relevante Genprodukte). Fibronectin war in den Tumorsepten beider Metastasenarten, jedoch nicht in der den Tumor umgebenden Kapsel nachweisbar. Auf mRNA-Ebene war ebenfalls keine relevante Erhöhung des Glykoproteins im Randbereich von CRCLM festzustellen. Auch Kollagen 5 konnte immunhistochemisch nicht als Kapselbestandteil identifiziert werden; es zeigte sich in perivaskulärem Bindegewebe angereichert.

Der Nachweis der einzelnen Intermediärfilamente als Kapselbestandteile beweist ihre Produktion durch Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften.

Zusätzlich ist die parallele Konfiguration der ECM zur invasiven Tumorfront hervorzuheben. Neoplastische Zellen können sich entlang der ECM-Fibrillen fortbewegen (149). Die Ausrichtung der Intermediärfilamente ermöglicht Motilität entlang der Tumorfront zwischen Kapsel und Metastase – die perpendikuläre Fortbewegung einzelner Zellen vom Tumor weg ist jedoch eingeschränkt. Bei senkrecht zum Tumorrand angeordneten Fibrillen wäre ein Entweichen einzelner Tumorzellen in das umliegende gesunde Gewebe deutlich erleichtert. Die Anordnung der Kapselbestandteile ist als weiterer Beleg für ihre Schutzfunktion vor Invasion durch Karzinomzellen zu werten. Ein weiteres Indiz für die Kapsel als explizitem „Schutzwall“ vor eindringenden Tumorzellen ist der immunhistochemische Nachweis von Caldesmon als Bestandteil der Kapsel. Es nimmt Einfluss auf die Stabilisierung der Aktinfilamente bei

Zellformveränderungen, minimiert die Zellmotilität und dadurch die Invasion von Karzinomzellen (150, 151) (vgl. 5.1.: Die Identifizierung der Kapselkomponenten). Es erhöht in seiner Funktion als Tumorsuppressor den durch die Kapsel gegebenen mechanischen Schutz.

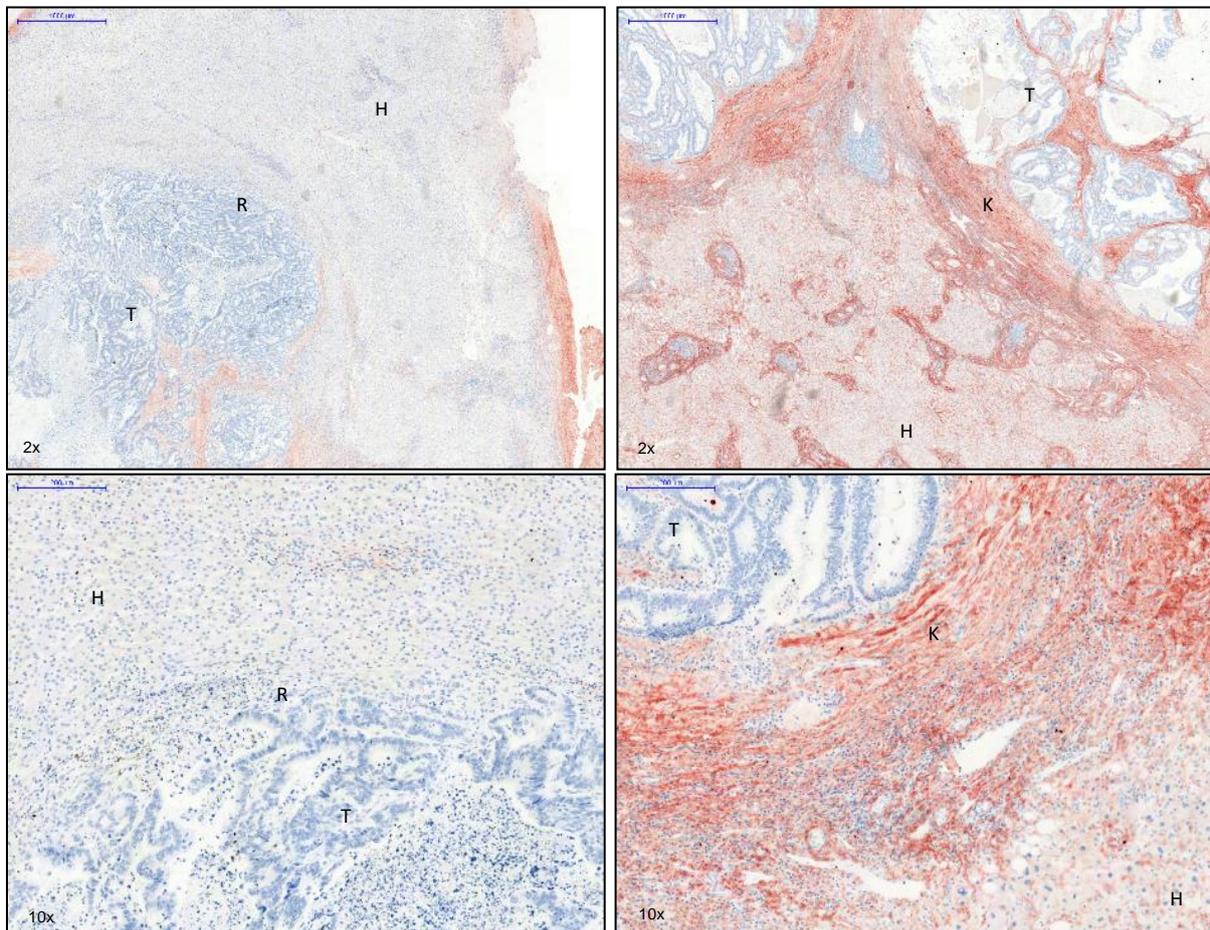


Abbildung 5: Kollagen-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Kollagen 1 in den Tumorsepten und in der die Metastase umgebenden Kapsel. Hiermit kann Kollagen 1 als Kapselbestandteil identifiziert werden. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

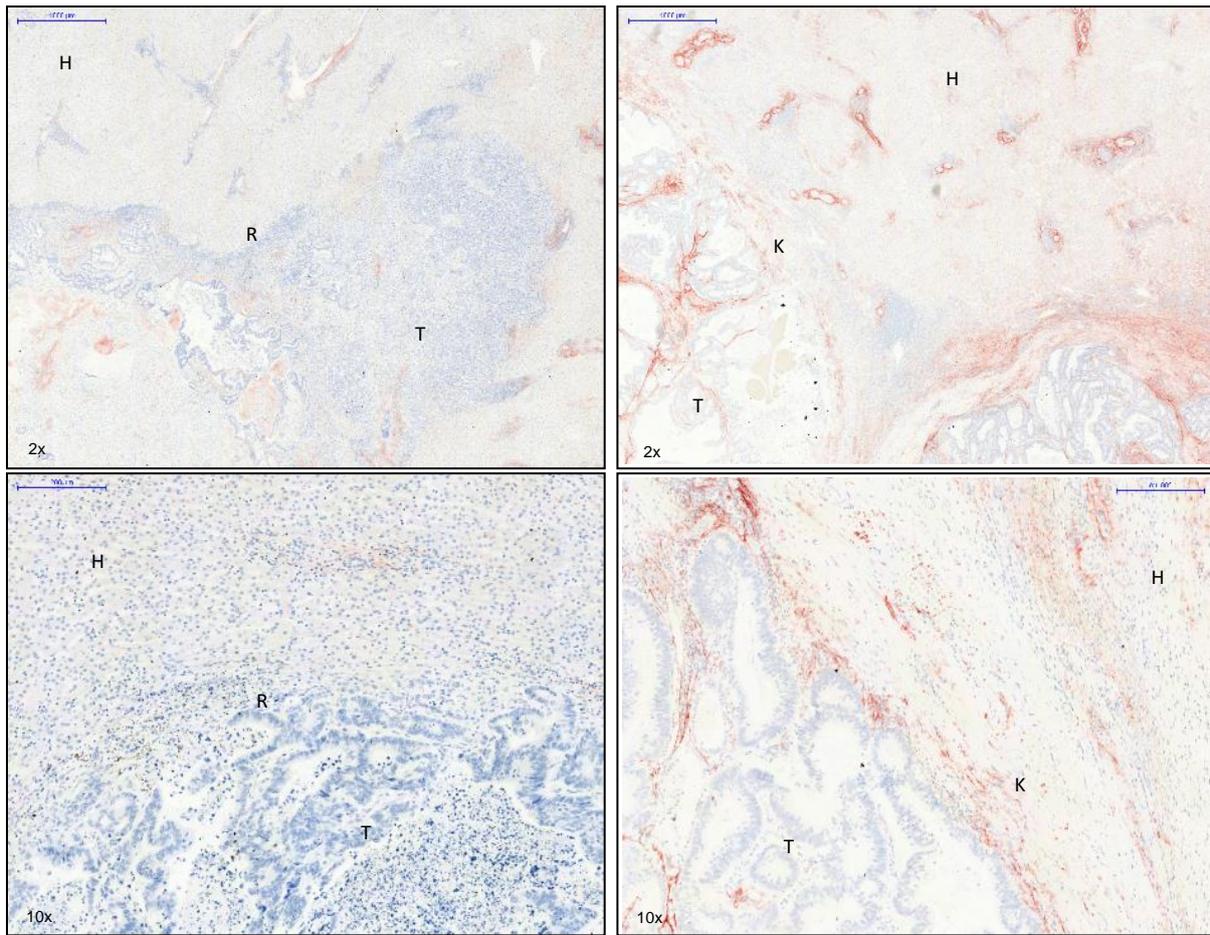


Abbildung 6: Kollagen-3-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Kollagen 3 in der die Metastase umgebenden Kapsel. Hiermit kann Kollagen 3 ebenfalls als Kapselbestandteil identifiziert werden. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

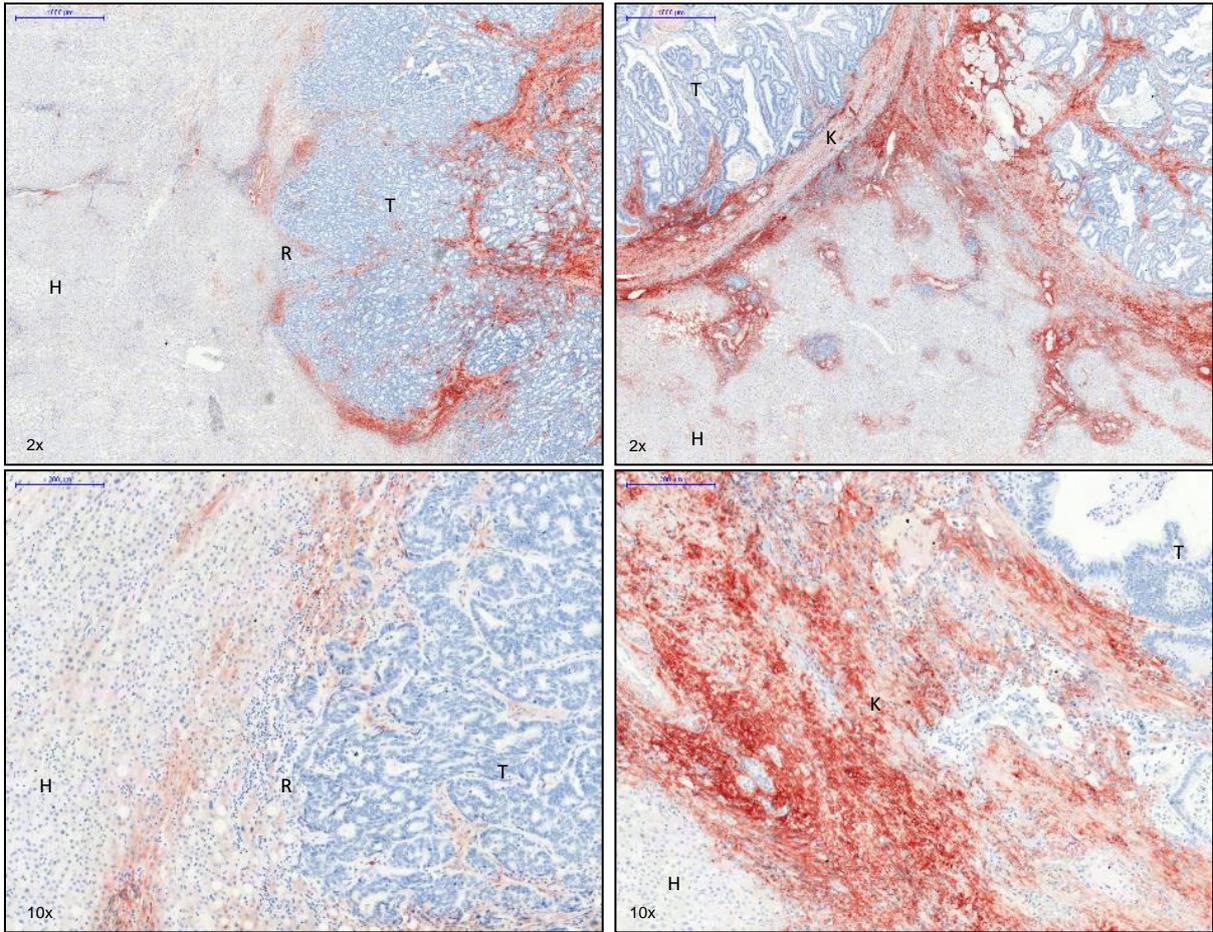


Abbildung 7: Versican-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Auch die Expression von Versican wird in den Tumorsepten und in der die Metastase umgebenden Kapsel deutlich. In diesem Fall kann Versican als Kapselbestandteil identifiziert werden. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

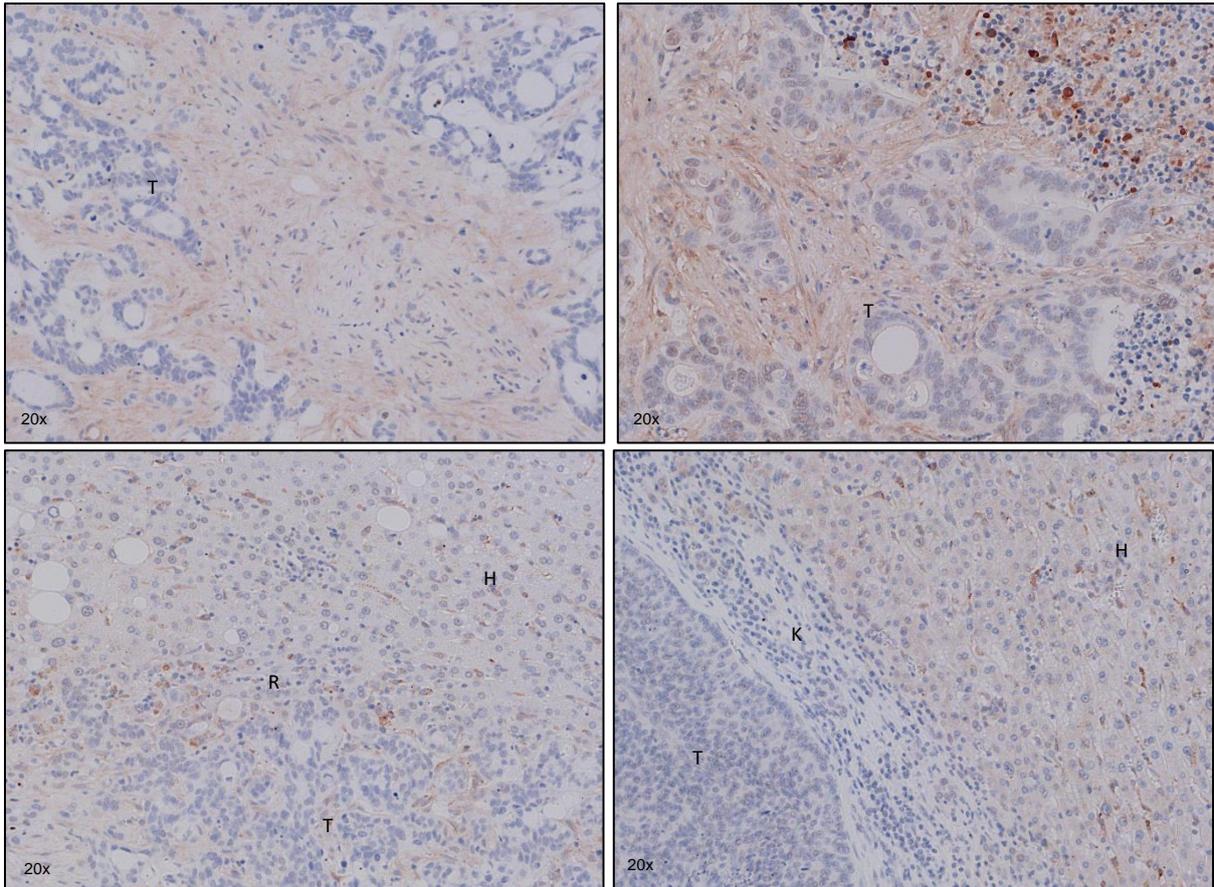


Abbildung 8: Fibronectin-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Obere Bilderreihe: Tumor zentral. Untere Bilderreihe: Tumorrand. Deutlich wird die Expression von Fibronectin 1 in den Tumorsepten, jedoch nicht in der die Metastase umgebenden Kapsel. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

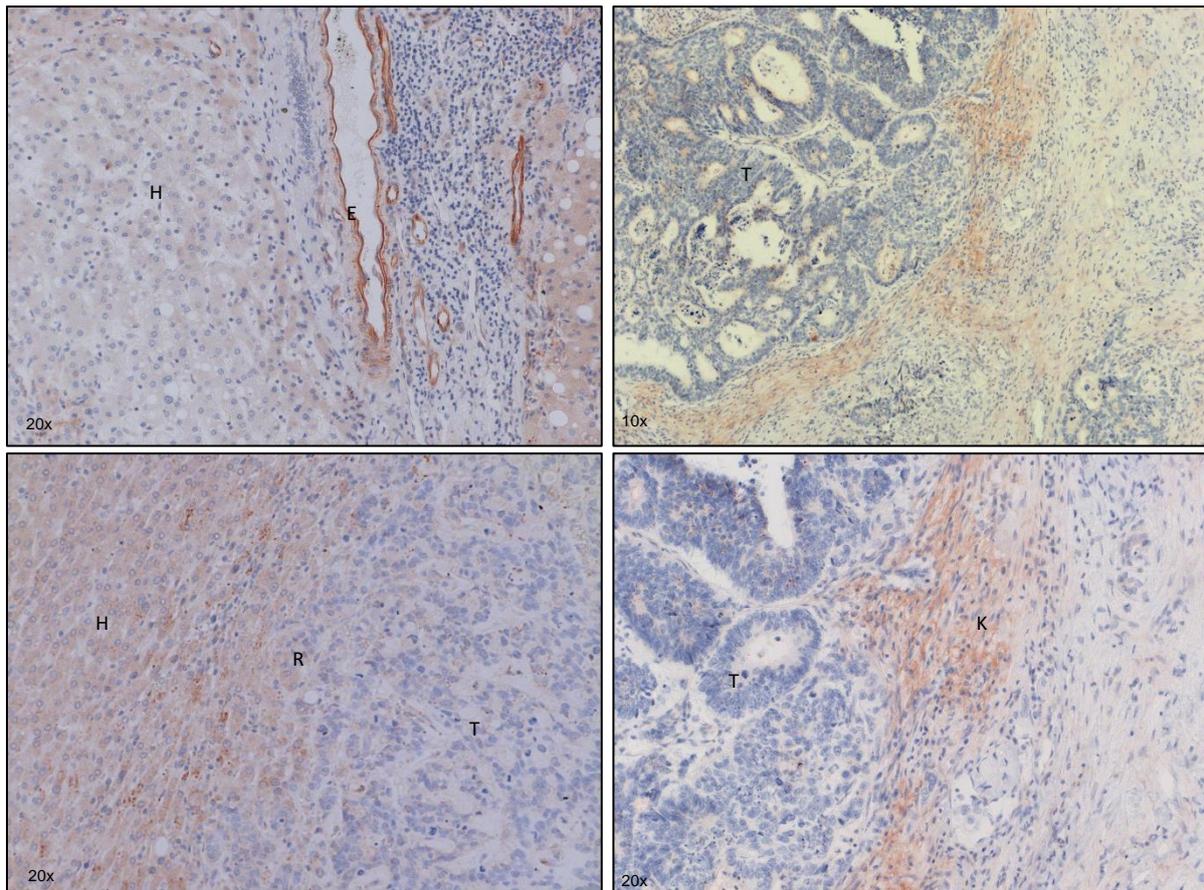


Abbildung 9: Caldesmon-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Bild oben links: Positivkontrolle an Endothelzellen eines Gefäßes, 20-fache Vergrößerung. Bild unten links: In nicht bekapselten Metastasen fiel keine Färbung im Randbereich des Tumors auf, 20-fache Vergrößerung. Rechte Seite: Deutlich wird die Expression von Caldesmon 1 im Kapselbereich der Lebermetastasen, 10- und 20-fache Vergrößerung. Via PCR zeigt sich Caldesmon in Normalgewebe und den beiden Metastasenformen ähnlich stark exprimiert (vgl. 4.3: Custom Arrays). Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel, E - Endothel.

## 4.2 EMT-Aktivität in bekapselten und nicht bekapselten kolorektalen Lebermetastasen

Wesentlich für die Ausprägung einer bindegewebigen Kapsel ist die Anwesenheit von Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Unter der Annahme, dass bei Akkumulation von Intermediärfilamenten eine Rekrutierung ECM-produzierender Zellen stattgefunden haben muss, die über die Aktivität der EMT gemessen werden kann, untersuchten wir die Expression von Genen, die für die EMT von Bedeutung sind. Dabei gingen wir von einer erhöhten Aktivität bei bekapselten CRCLM aus, im Vergleich zu nicht bekapselten CRCLM und Normalgewebe. 47 der 84 untersuchten Gene wurden in Kategorien zusammengefasst und einzelne Genprodukte immunhistochemisch nachgewiesen.

#### 4.2.1 Transkriptionsfaktoren der epithelialen mesenchymalen Transition

Zunächst interessierte, ob wichtige Transkriptionsfaktoren der EMT bei den verschiedenen CRCLM-Arten unterschiedlich exprimiert werden. Bei der Untersuchung zeigte sich eine vermehrte Expression von Snail 1, 2 und 3, Sox 10, Twist 1 und Zeb 2 in bekapselten Metastasen gegenüber nicht von einer Kapsel umgebenen Metastasen und Normalgewebe. Die Genregulation des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Zeb 1 sowie von Serpine 1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) war im Vergleich zur gesunden Kontrolle nicht wesentlich verändert.

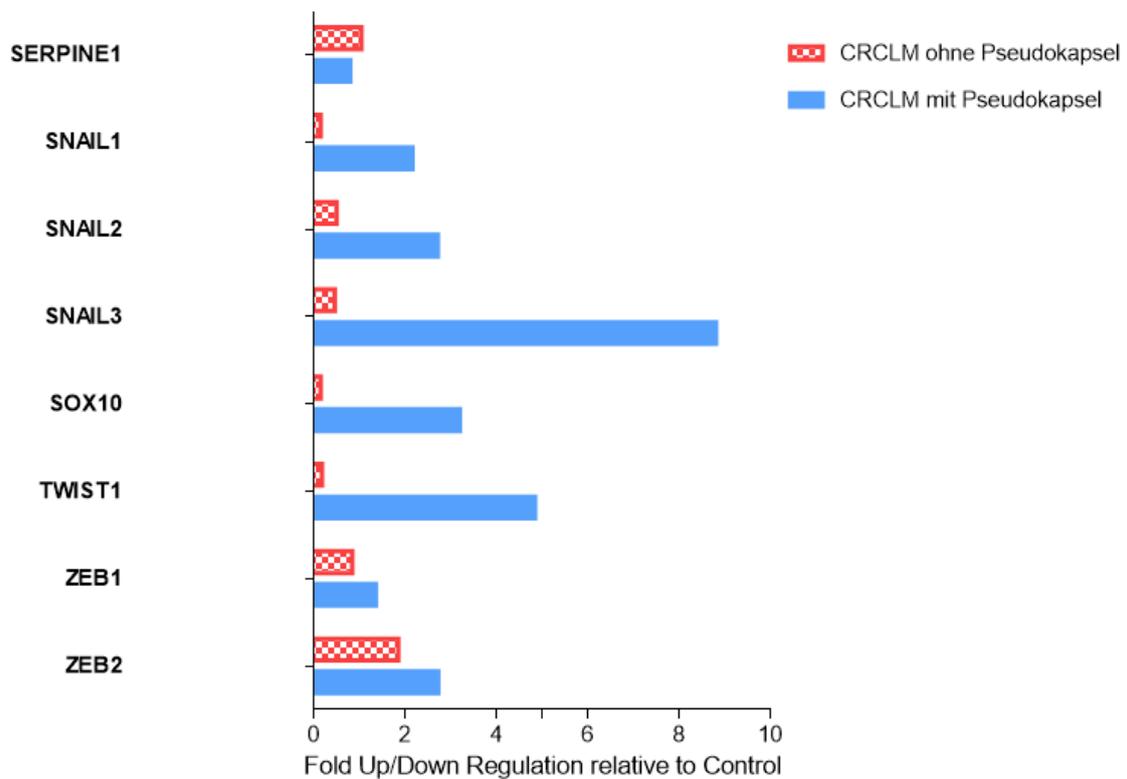


Abbildung 10: Hoch- und Herunterregulation der EMT-Transkriptionsfaktoren von bekapselten (blau) und nicht bekapselten (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle).

Immunhistochemisch fokussierten wir uns in der Kategorie „Transkriptionsfaktoren“ auf den Nachweis von Snail 1 und 3, SOX 10 und Twist.

Snail 1 konnte im Zytoplasma tumornaher Zellen bekapselter Metastasen nachgewiesen werden. Außerdem zeigte es sich im Zytoplasma von Tumorzellen, vermehrt bei CRCLM ohne Kapsel. Sowohl in Karzinomzellen als auch in den die Metastase umgebenden Zellen fand sich der Transkriptionsfaktor für die EMT aktiviert. Die einzelnen für Snail positiven Zellen könnten gerade im Begriff sein, sich in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps zu verändern – mit unterschiedlichen Konsequenzen: Karzinomzellen betreiben EMT, um in das umliegende Gewebe einzudringen, die die Metastase umgebenden Zellen womöglich, um ECM zu produzieren.

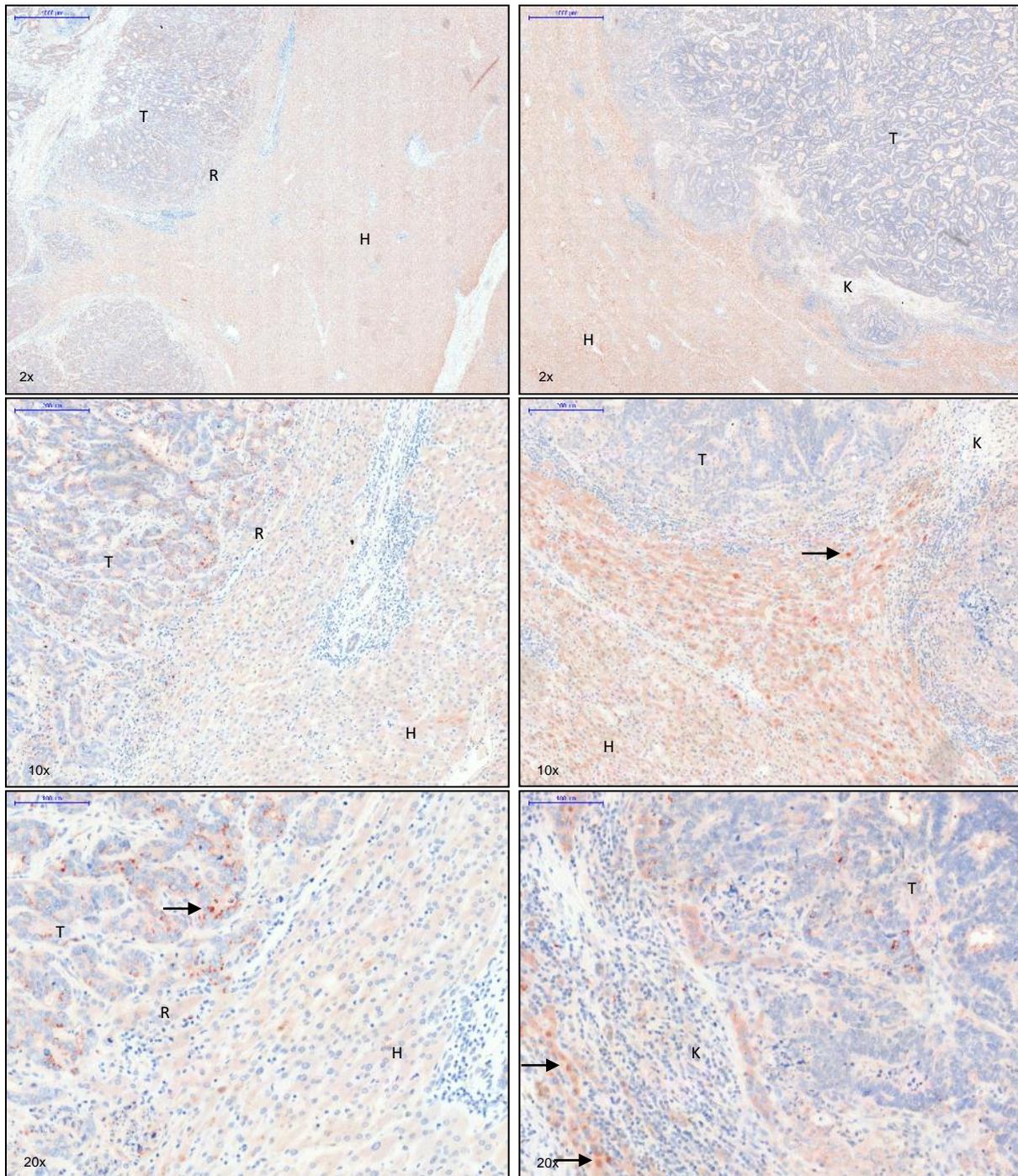


Abbildung 11: Snail-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache, 10-fache und 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Snail 1 im Zytoplasma tumornaher Zellen, vermehrt bei bekapselten Metastasen, und im Zytoplasma von Tumorzellen, vermehrt bei Metastasen ohne Kapsel (mit Pfeilen gekennzeichnet). Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Snail 3 ließ sich in den Tumorzellkernen am Rand bekapselter Metastasen darstellen. Auch in nicht bekapselten CRCLM waren einige Tumorzellkerne für den Transkriptionsfaktor positiv, jedoch deutlich schwächer und in geringerer Zahl. Das Ergebnis dieser Färbung spiegelt die Resultate auf mRNA-Ebene wider: Eine 8-fache Erhöhung der Transkription von Snail 3 in bekapselten Lebermetastasen gegenüber Normalgewebe und CRCLM ohne Kapsel.

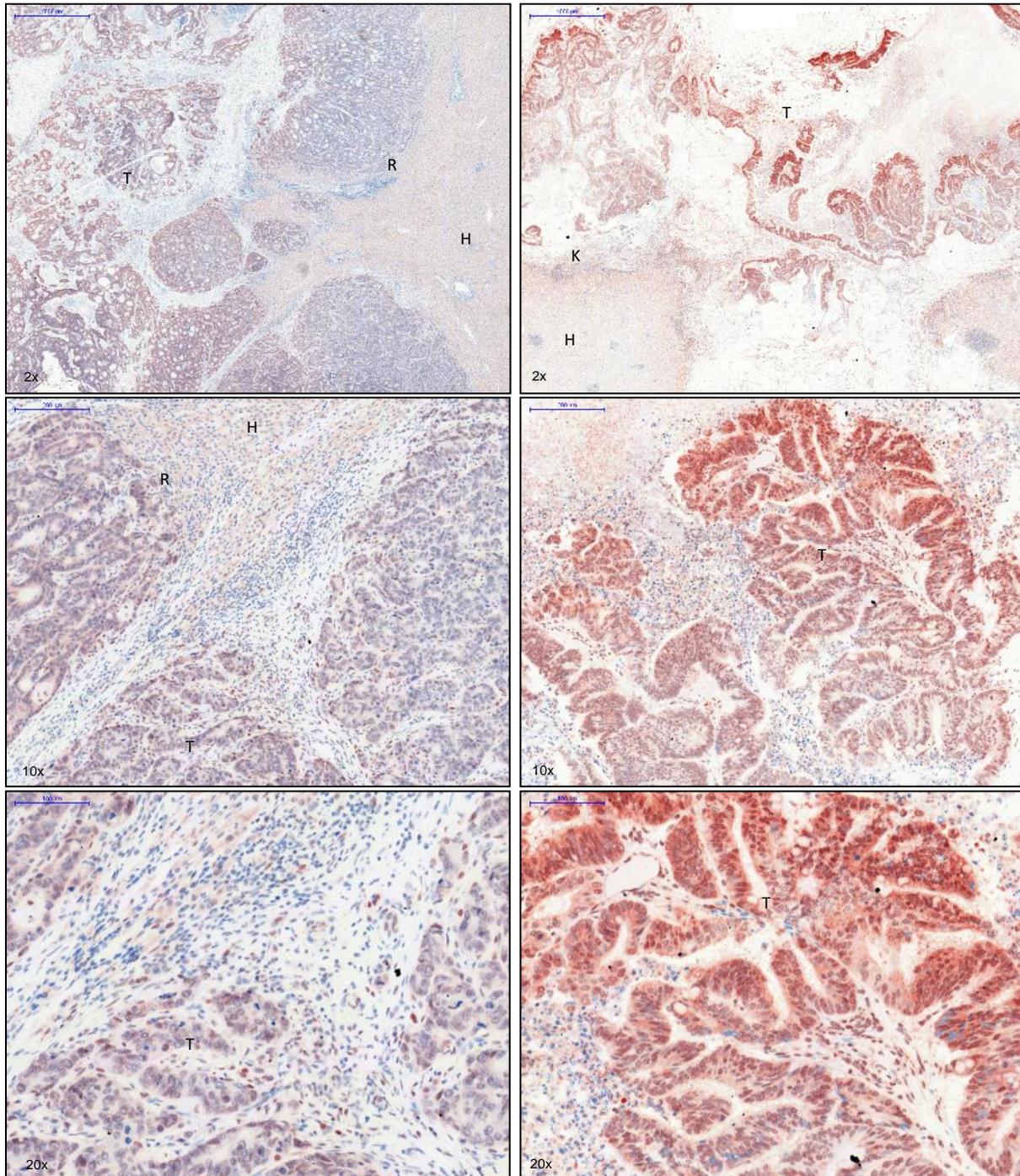


Abbildung 12: Snail-3-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache, 10-fache und 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Snail 3 in den Nuklei von Tumorzellen am Rand bekapselter Lebermetastasen. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Sox 10 konnte membranständig und im Zytoplasma von Tumorzellen bekapselter Lebermetastasen nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis deckt sich mit dem Ergebnis der PCR-Arrays: Sox 10 wurde in eingekapselten Lebermetastasen gegenüber Normalgewebe und CRCLM ohne Kapsel vermehrt exprimiert.

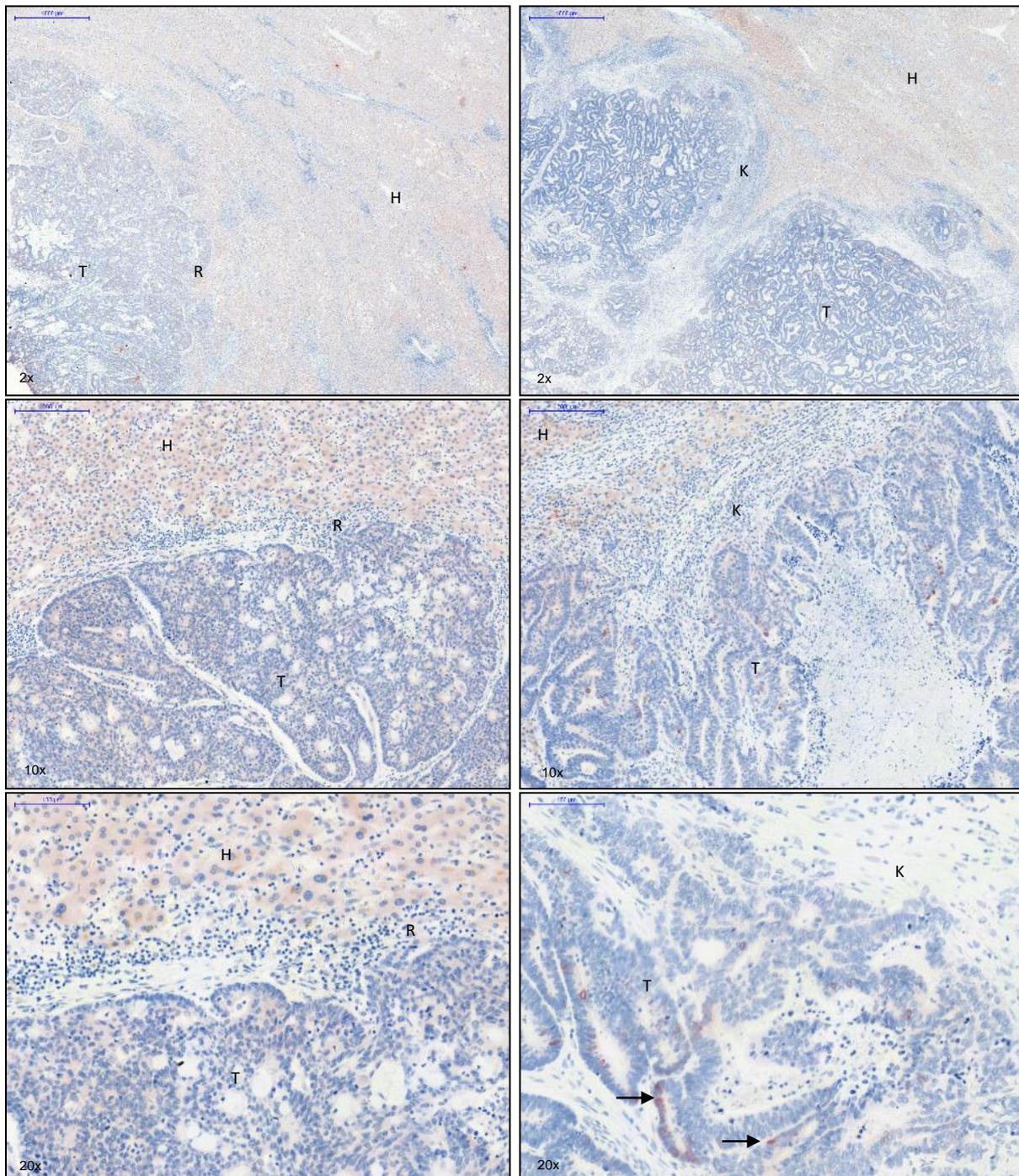


Abbildung 13: SOX-10-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache, 10-fache und 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von SOX 10 an der Membran und im Zytoplasma von Tumorzellen bekapselter Metastasen, im Bild mit Pfeilen gekennzeichnet. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Twist färbte sich im Zytoplasma tumornaher Leberzellen bei bekapselten Lebermetastasen. Auf molekularer Ebene zeigte sich der Transkriptionsfaktor ebenfalls in bekapselten Lebermetastasen hochreguliert im Vergleich zu nicht bekapselten Metastasen und zur Kontrolle.

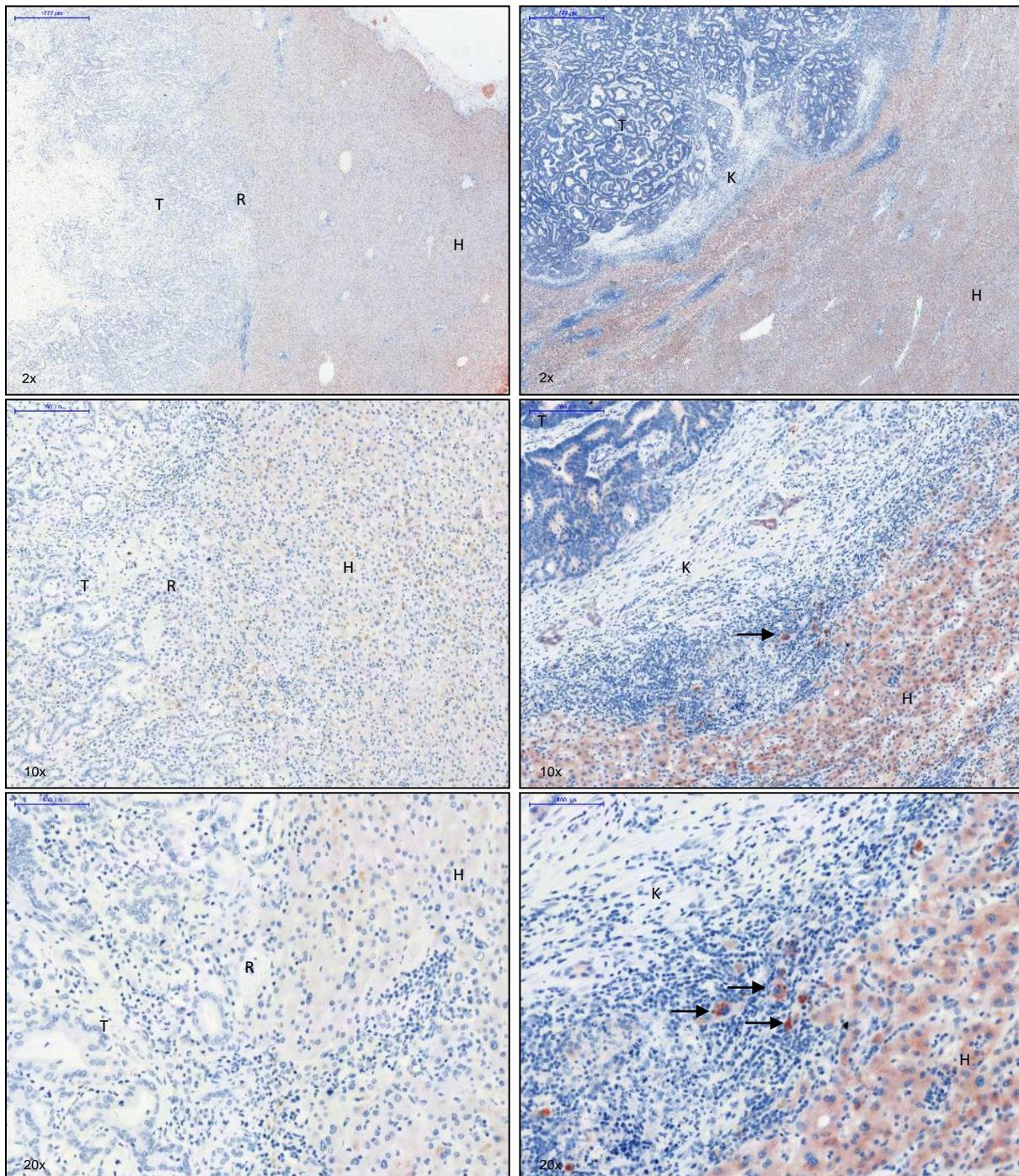


Abbildung 14: Twi1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache, 10-fache und 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Twi1 im Zytoplasma tumornaher Zellen bei bekapselten Metastasen, im Bild mit Pfeilen gekennzeichnet. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

#### 4.2.2 Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie

Sind bei einer Erhöhung der EMT-Transkriptionsfaktoren bei bekapselten CRCLM deren Aktivatoren ebenfalls erhöht? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Genexpression der TGF- $\beta$ -Superfamilie und des Wnt-Pathway analysiert.

Die zur TGF- $\beta$ -Superfamilie zählenden knochenmorphogenetischen Proteine (Bone morphogenetic proteins, kurz BMP) 2 und 7, Nodal und auch TGF- $\beta$  2 und 3 (Transforming growth-factor) wurden in Lebermetastasen mit Kapsel stärker exprimiert. Bei TGF- $\beta$  1 bestand kein Unterschied zwischen bekapselten und nicht bekapselten Metastasen; bei beiden Arten war die Expression der mRNA im Vergleich zu Normalgewebe nicht erhöht.

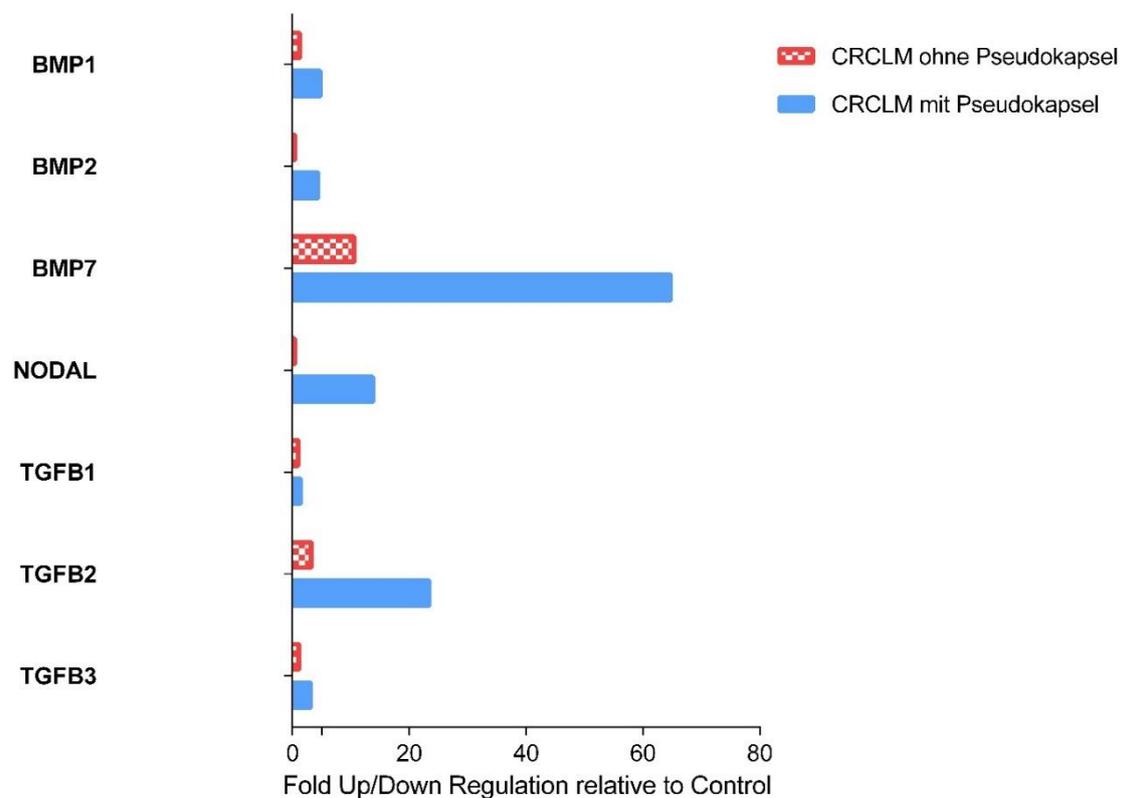


Abbildung 15: Hoch- und Herunterregulation von Proteinen der TGF- $\beta$ -Superfamilie bei bekapselten (blau) und nicht bekapselten (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle). BMP 1 zählt nicht zur TGF- $\beta$ -Superfamilie, wurde hier jedoch gemeinsam mit den Mitgliedern 2 und 7 der knochenmorphogenetischen Proteine dargestellt.

#### 4.2.3 Essentielle Genprodukte im Wnt-Pathway

Wir prüften die für den Wnt-Signalweg wesentlichen Proteine  $\beta$ -Catenin (Ctnnb1), Wnt 11, 5a und 5b, Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  und den Frizzled class Rezeptor 7 (Fzd 7) via PCR und konnten eine vermehrte Expression in bekapselten kolorektalen Lebermetastasen nachweisen. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs resultiert unter anderem in der Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus. Eine veränderte Regulation der Transkription von Zielgenen ist die Folge, EMT-Transkriptionsfaktoren wie Snail 1 und 2 oder Twist werden vermehrt abgeschrieben (vgl. 1.2: Ätiologie). (4)

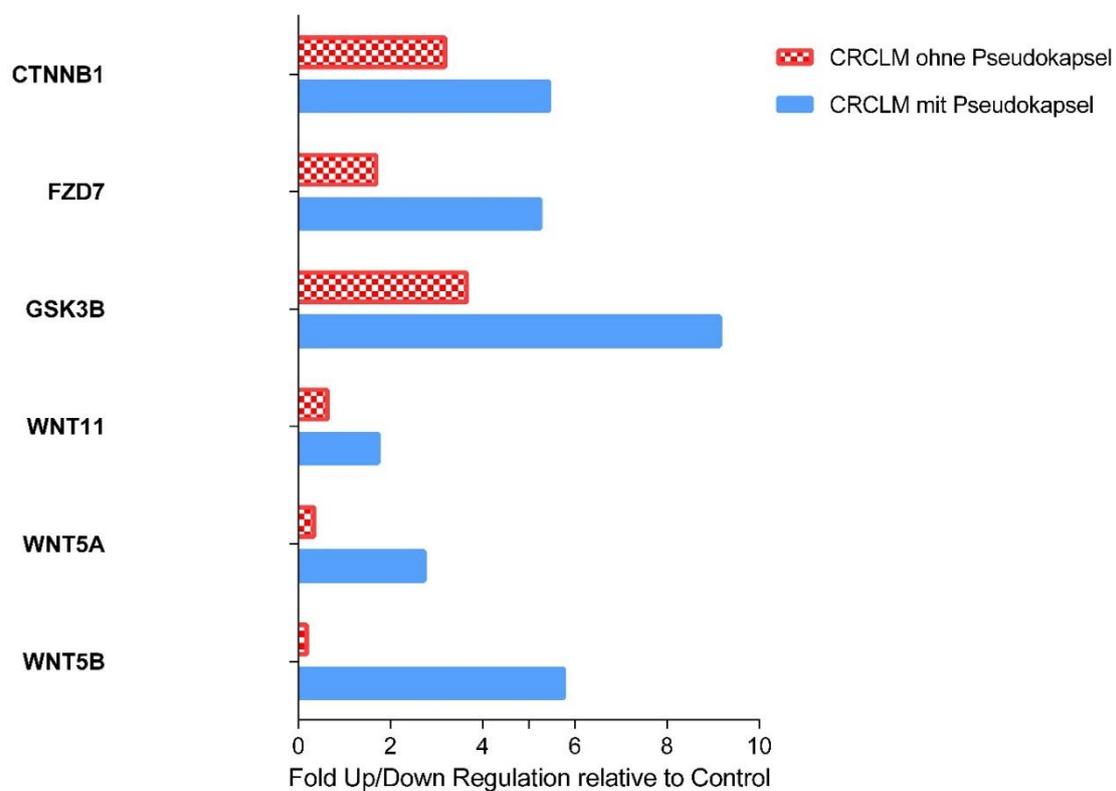


Abbildung 16: Hoch- und Herunterregulation von Proteinen des Wnt-Pathways bekapselter (blau) und nicht bekapselter (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle).

Immunhistochemisch untersuchten wir die phosphorylierte Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (pGSK-3- $\beta$ ) und  $\beta$ -Catenin. Dabei fand sich pGSK-3- $\beta$  im Zytoplasma tumornaher Hepatozyten, vor allem bei CRCLM ohne Kapsel, sowie im Zytoplasma randständiger Tumorzellen bei CRCLM mit Kapsel. pGSK-3- $\beta$  und Aktin bilden einen Komplex mit  $\beta$ -Catenin. Dies führt zur Ubiquitinierung und zum proteosomalem Abbau von  $\beta$ -Catenin. Bei Metastasierung akkumuliert  $\beta$ -Catenin durch Ausfall dieser Regulation in den Tumorzellen. (4)

Eine vermehrte Expression von pGSK-3- $\beta$  könnte auf den Versuch der Zelle hinweisen, der Häufung von  $\beta$ -Catenin entgegenzuwirken. pGSK-3- $\beta$  im Zytoplasma von Tumorzellen bekapselter Metastasen könnte deren Metastasierungstendenz mindern und einen weiteren Mechanismus zum Schutz des umliegenden Gewebes bilden.

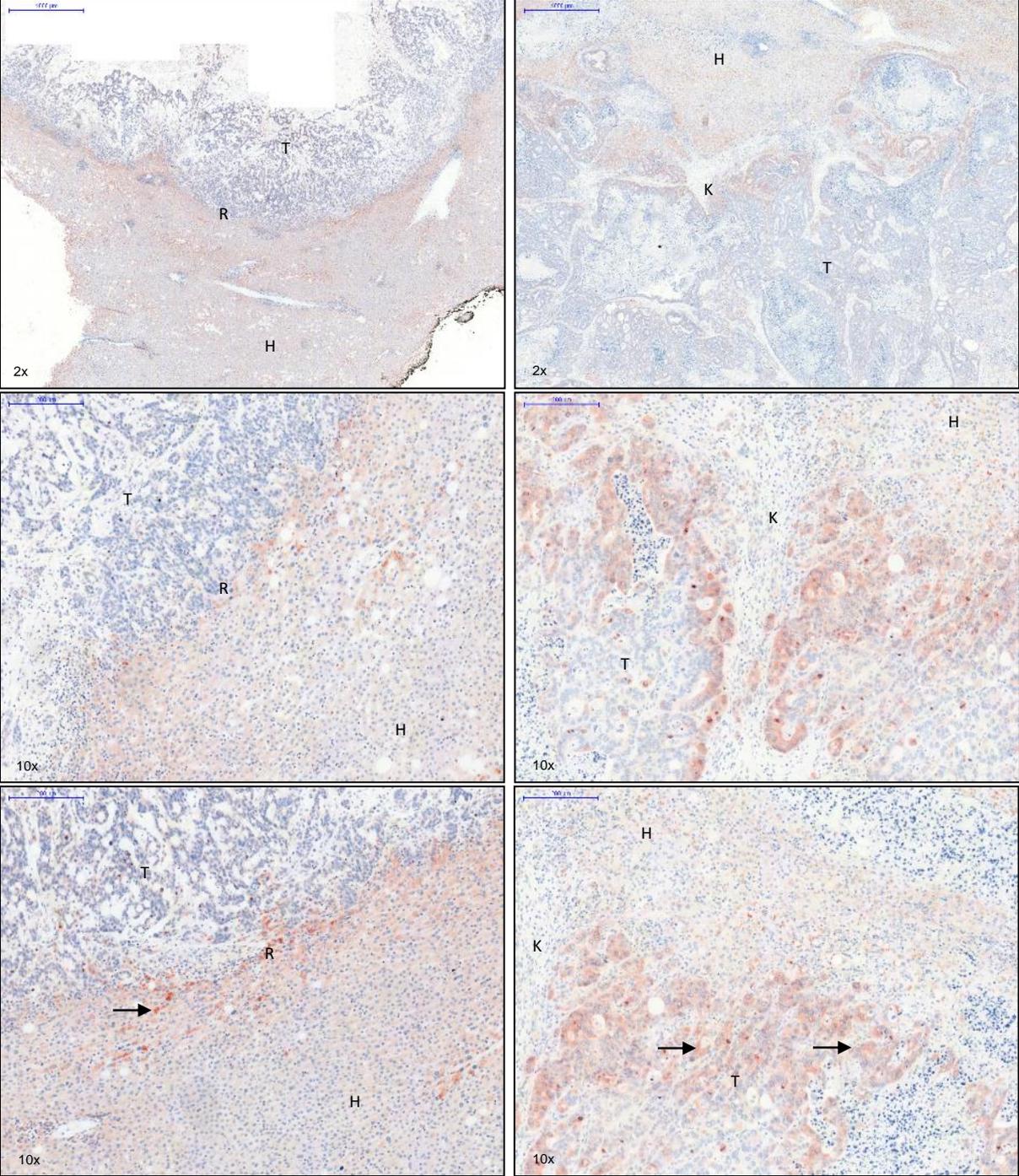


Abbildung 17: pGSK-3- $\beta$ -Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von pGSK-3- $\beta$  im Zytoplasma von Hepatozyten im Randbereich nicht bekapselter Metastasen und in Tumorzellen im Randbereich bekapselter Metastasen, im Bild mit Pfeilen gekennzeichnet. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Die intranukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin als Resultat der Aktivierung des Wnt-Pathways war immunhistochemisch deutlich nachzuvollziehen. Das Protein färbte sich in den Tumorzellen des Randbereiches nukleär und membranständig, während es in Hepatozyten ausschließlich an der Membran vertreten war. Die Tendenz zu EMT und Metastasierung der Tumorzellen wurde vor allem im Randbereich der CRCLM deutlich.

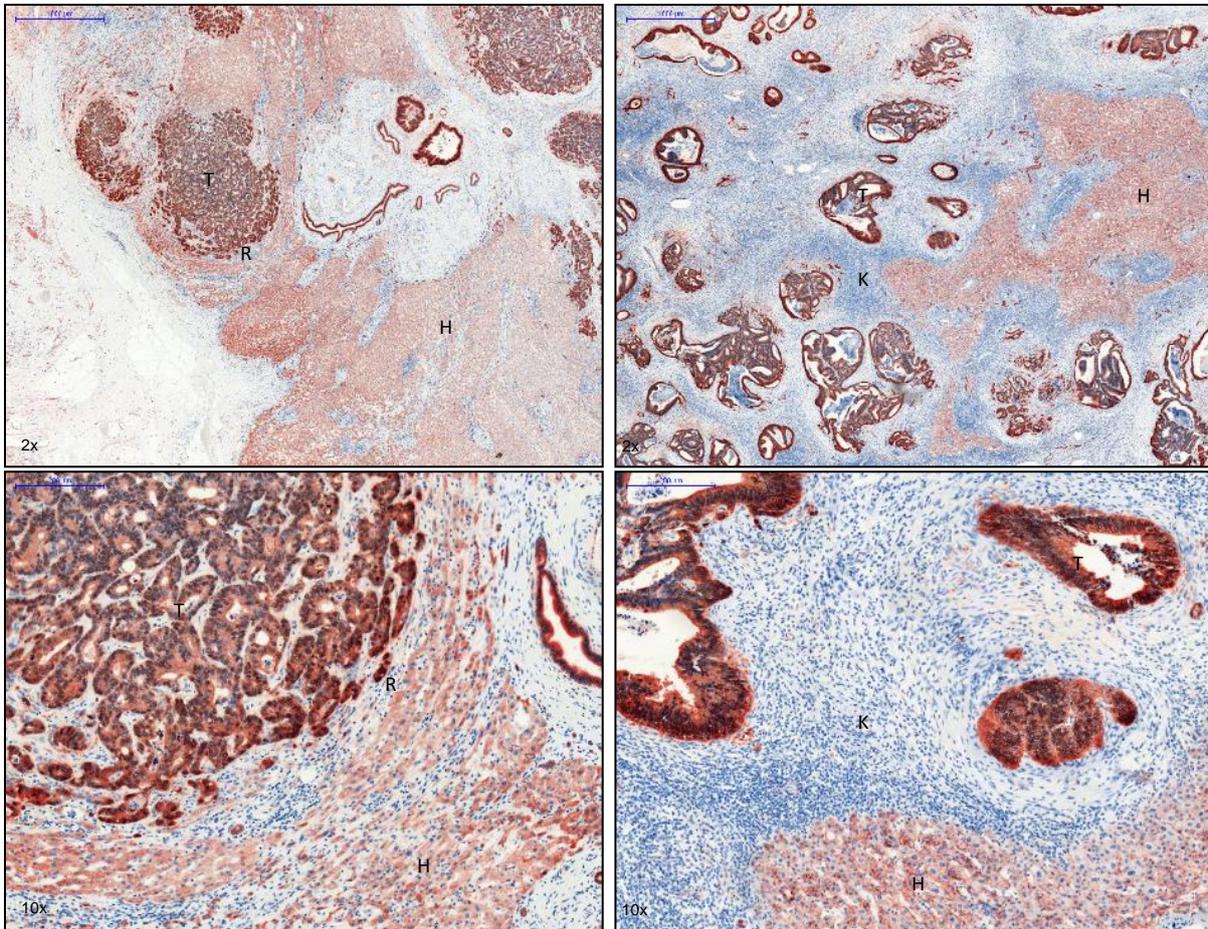


Abbildung 18:  $\beta$ -Catenin-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von  $\beta$ -Catenin im Nukleus der Tumorzellen, während es in den umgebenden Hepatozyten nur membranständig auftritt. Die zelluläre Akkumulation und anschließende Einlagerung von  $\beta$ -Catenin im Nukleus der Tumorzellen wird mit dem Verlust von E-Cadherin in Zusammenhang gebracht und ebenfalls als EMT-spezifisches Phänomen betrachtet. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

#### 4.2.4 Für Zellkontakte relevante Proteine

Die intrazelluläre und -nukleäre Häufung von  $\beta$ -Catenin induziert eine erhöhte Expression der EMT-Transkriptionsfaktoren. Eine Reduktion von Zell-Zell-Kontakten ist die Folge (vgl. 1.3.5: Die epitheliale mesenchymale Transition) (4). Wichtig ist die verminderte Expression von E-Cadherin als Zeichen einer EMT der randständigen Tumorzellen – diese konnten wir immunhistochemisch und mit Hilfe von Immunfluoreszenz nachweisen. Bei nicht bekapselten CRCLM war das Fehlen von E-Cadherin dabei stärker ausgeprägt.

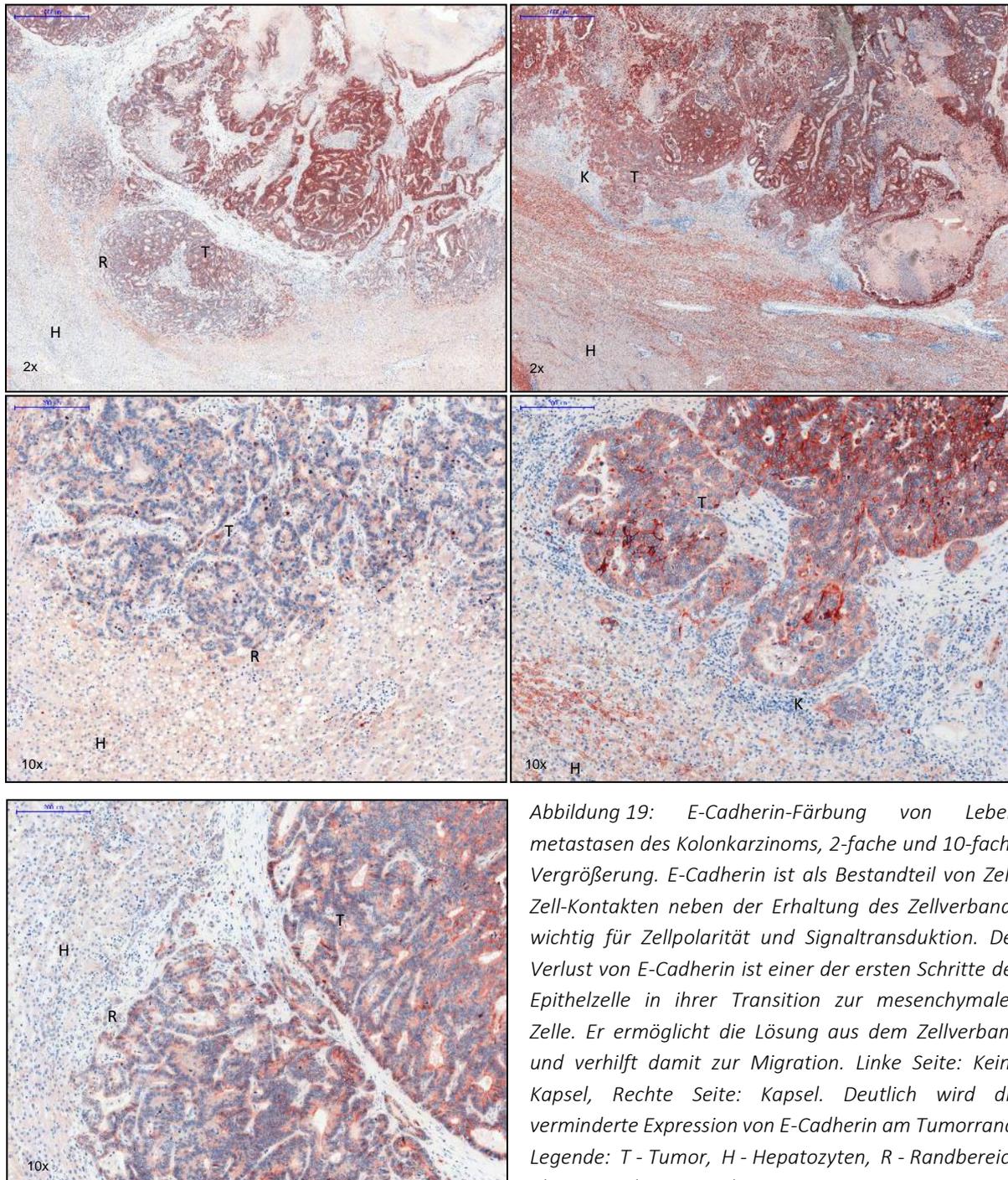


Abbildung 19: E-Cadherin-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. E-Cadherin ist als Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten neben der Erhaltung des Zellverbands wichtig für Zellpolarität und Signaltransduktion. Der Verlust von E-Cadherin ist einer der ersten Schritte der Epithelzelle in ihrer Transition zur mesenchymalen Zelle. Er ermöglicht die Lösung aus dem Zellverband und verhilft damit zur Migration. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die verminderte Expression von E-Cadherin am Tumorrand. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

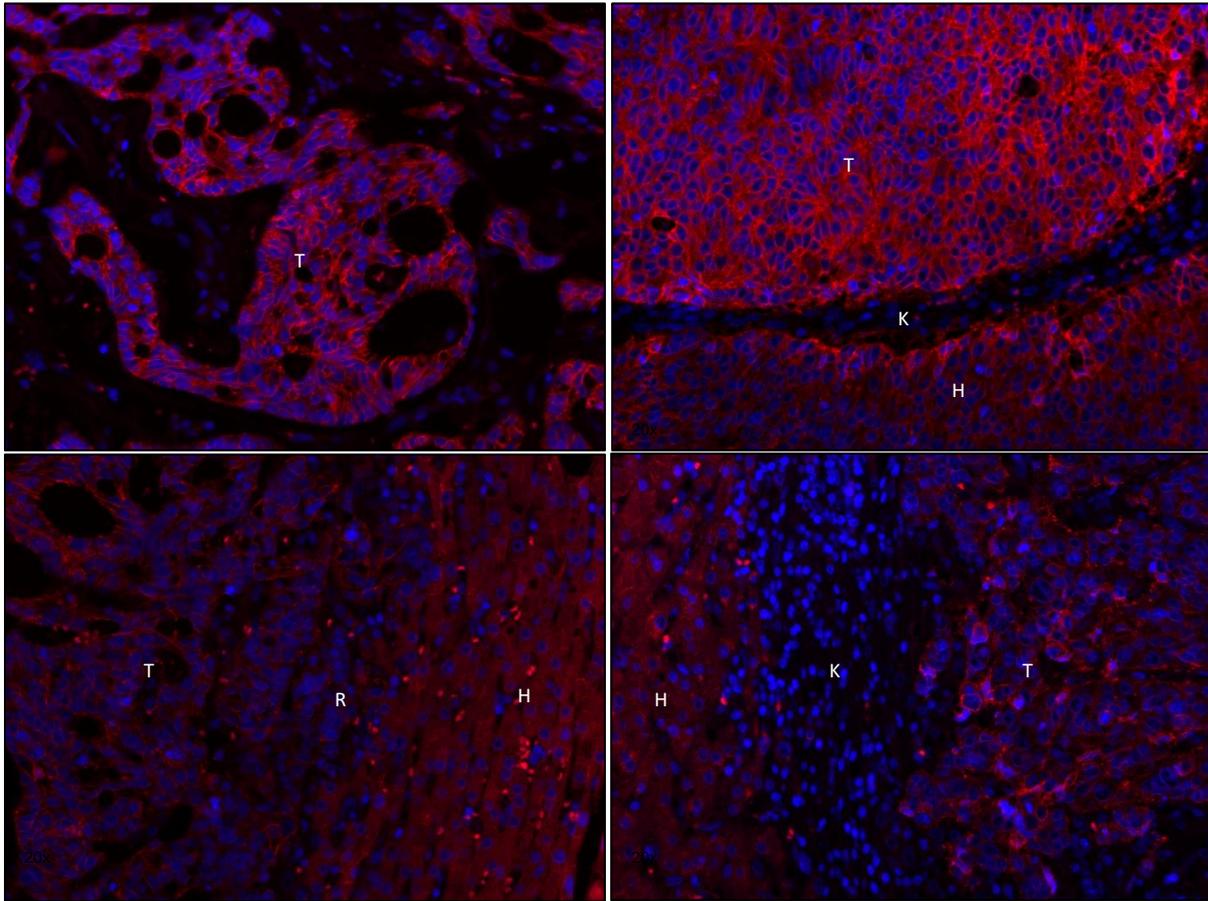


Abbildung 20: E-Cadherin-Immunofluoreszenzfärbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 20-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, oberes Bild: Tumorausschnitt, unteres Bild: Tumorrand. Rechte Seite: Kapsel, Tumorrand. Deutlich wird die verminderte Expression von E-Cadherin am Tumorrand gegenüber dem zentralen Tumor, ein Hinweis für eine epitheliale mesenchymale Transition der randständigen Tumorzellen. Die Zellen gewinnen die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband zu lösen und zu migrieren. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Interessanterweise zeigten sich die Ergebnisse der PCR dazu konträr: E-Cadherin war sowohl in bekapselten als auch in nicht bekapselten Lebermetastasen stärker exprimiert als in der gesunden Kontrolle. Dabei weist die PCR die Genexpression eines Zellgemisches aus Tumorzellen, Hepatozyten und anderen Zellen im Randbereich der Metastase quantitativ nach, mit Hilfe der Immunohistochemie gelingt der qualitative Nachweis der Produktion von Proteinen in einzelnen Zellen. Die Metastasen besitzen also mehr über E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Kontakte als die Hepatozyten untereinander. N-Cadherin als Marker für mesenchymale Zellen war insgesamt weniger häufig vorhanden als E-Cadherin, da die für die PCR genutzten Gewebeschnitte hauptsächlich aus epithelialen Zellen bestehen. Es konnte jedoch ein höheres Vorkommen bei bekapselten CRCLM festgestellt werden.

In der gesamten Gruppe der für Zell-Zell-Kontakte wichtigen Proteine zeigte sich eine vermehrte Bildung in bekapselten CRCLM gegenüber nicht bekapselten. Desmocollin 2, ein Bestandteil von Desmosomen, wurde von Metastasen verstärkt im Vergleich zu Normalgewebe exprimiert. Auch das Protein Moesin, das unter anderem für die Vernetzung von Plasmamembran und Aktinzytoskelett wichtig ist, fand sich häufiger in bekapselten Metastasen.

Zusätzlich konnte man eine deutlich stärkere Bildung der Intermediärfilamente Keratin 7, 14 und 19 feststellen. Das für das kolorektale Karzinom positive Zytokeratin 19 war immunohistochemisch im gesamten Tumorbereich interzellulär vorhanden. Zudem traten einige Zytokeratin-positive Zellen extraneoplastisch auf. Auffallend war eine Minderung der Expression von Keratin 19 am Rand nicht bekapselter Metastasen, während es bei bekapselten Metastasen auch am Tumorrand stark exprimiert wurde.

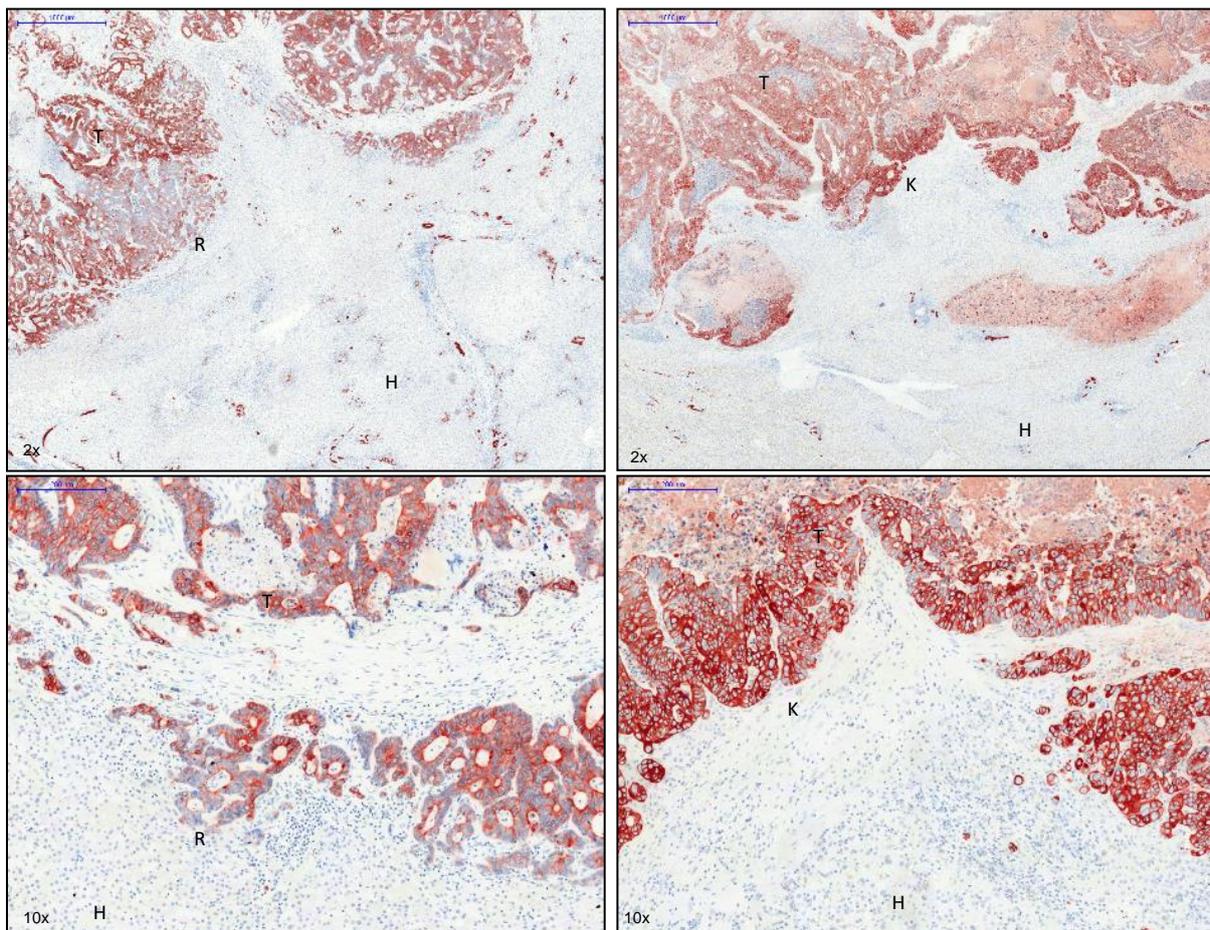


Abbildung 21: Keratin-19-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die interzelluläre Expression von Keratin 19 im Tumorbereich. Bei Lebermetastasen ohne Kapsel vermindert sich die Expression im Gegensatz zu bekapselten Metastasen im Randbereich. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Die PCR von Steap 1 (Six-transmembrane-epithelial-antigen-of-the-prostate-1) zeigte eine Häufung des Oberflächenantigens von Zell-Zell-Kontakten in bekapselten Metastasen.

Immunhistochemisch konnte in der Umgebung aller Metastasen bei Färbung mit Anti-Steap-1-Antikörper eine Positivität des Zytoplasmas fibroblastenähnlicher Zellen zwischen den Hepatozyten festgestellt werden. Das Zytoplasma der Tumorzellen war teilweise rötlich, die Tumorzellkerne waren teilweise rot-violett gefärbt.

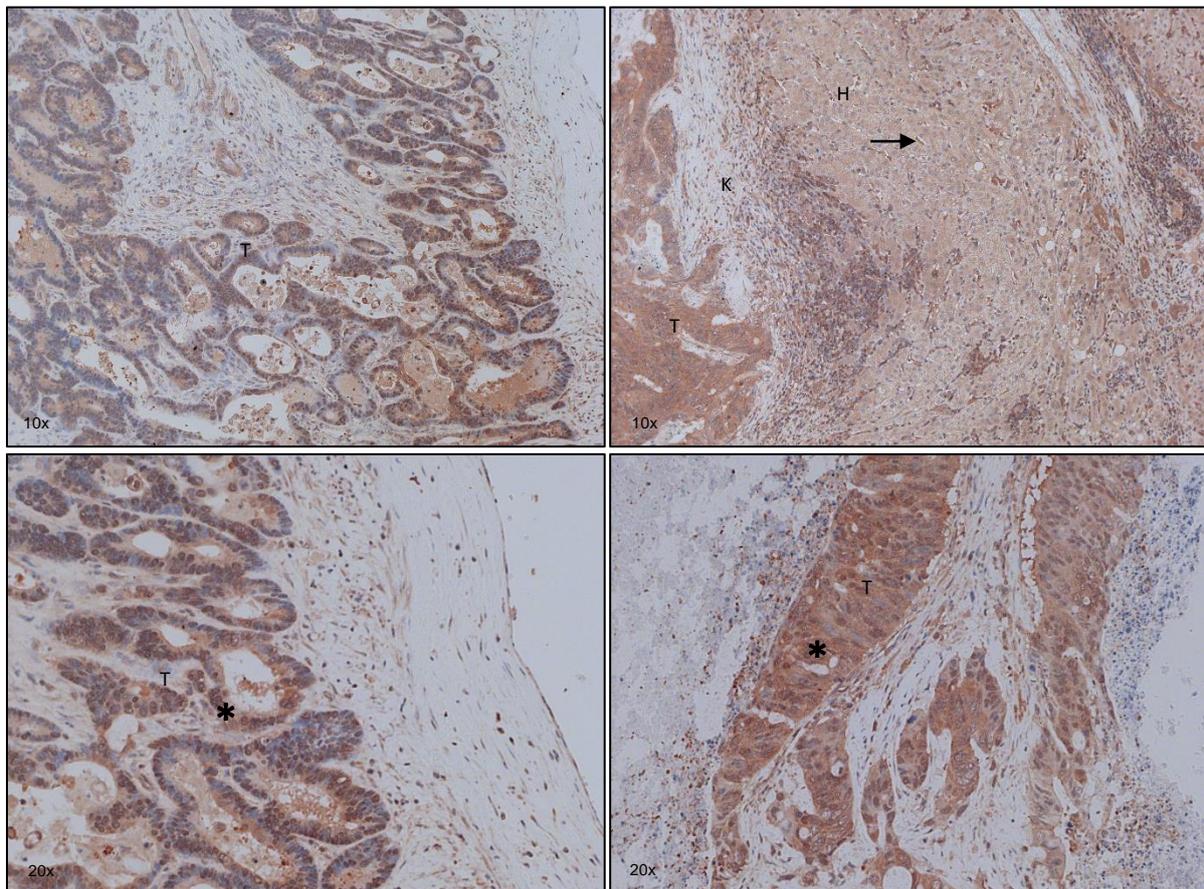


Abbildung 22.1: Steap-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms. Linke Seite: CRCLM ohne Kapsel, Metastase zentral, Rotfärbung der Tumorzellkerne, 10- und 20-fache Vergrößerung. Rechte Seite: CRCLM mit Kapsel, Übersicht Tumor mit rot gefärbten Tumorzellkernen, 10- und 20-fache Vergrößerung. Die Pfeile markieren fibroblastenähnliche Zellen mit rot gefärbtem Zytoplasma zwischen den Hepatozyten. Die Sterne markieren rot gefärbte Tumorzellkerne. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

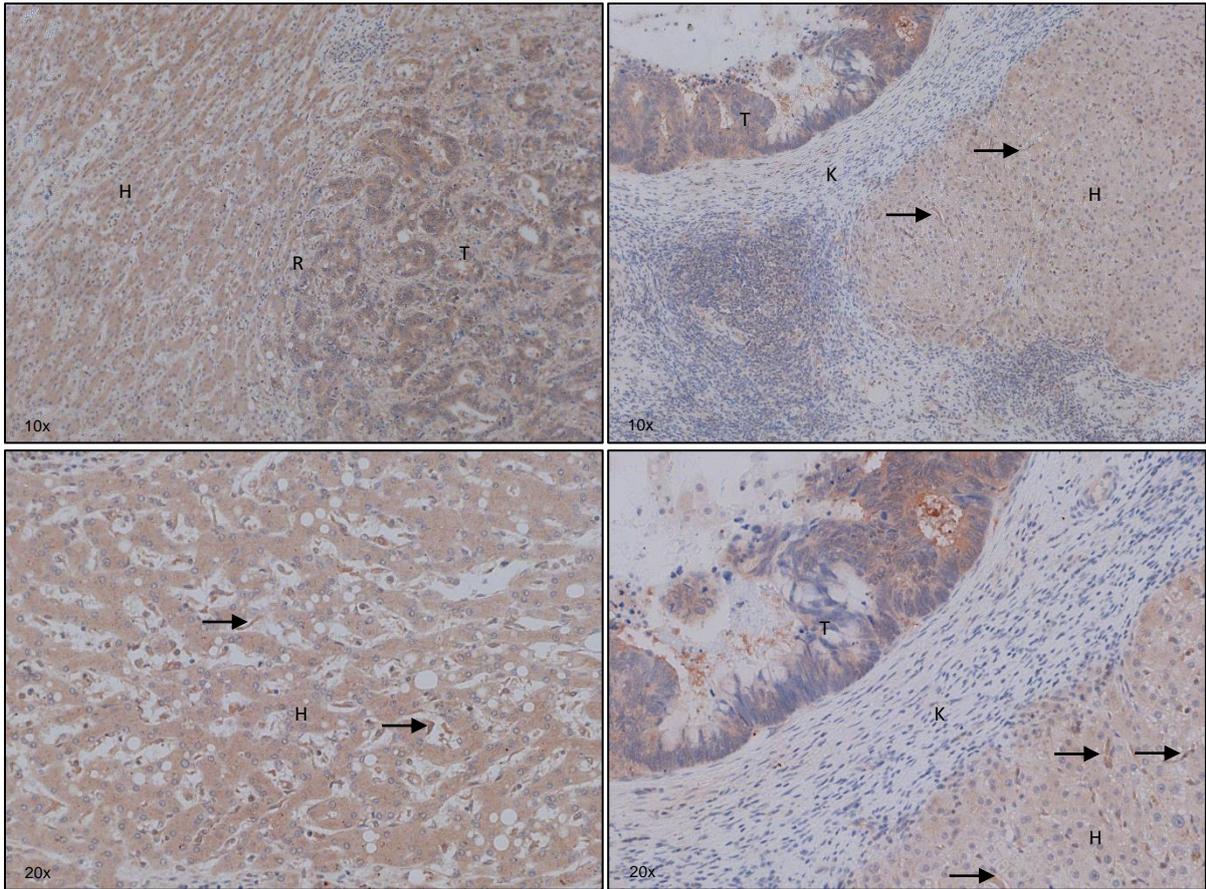


Abbildung 22.2: Steap-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms. Linke Seite: Tumorrand ohne Kapsel, 10-fache Vergrößerung sowie metastasenferne Hepatozyten, 20-fache Vergrößerung. Rechte Seite: Tumorrand mit Kapsel, 10- und 20-fache Vergrößerung. Die Pfeile markieren fibroblastenähnliche Zellen mit rot gefärbtem Zytoplasma zwischen den Hepatozyten. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Das für die Mikrotubulistabilisation wichtige Mikrotubuli-assoziierte Protein 1b (MAP1b) zeigte in allen geprüften Geweben keine Expressionsunterschiede. In Kolonkarzinomen wird das Protein nicht synthetisiert (152). Immunhistochemisch konnte es im Zytoplasma einzelner, die bekapselten CRCLM umgebender Zellen nachgewiesen werden. Eine Expression weist auf modellierende Prozesse in Bezug auf das Zytoskelett hin (153) (vgl. 5.3 Die EMT-Aktivität am Tumorrand korreliert mit der Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel.): die vereinzelt gefärbten, die Kapsel umgebenden Zellen könnten im Begriff sein, ihre Morphologie zu verändern und als Hinweis auf eine epitheliale mesenchymale Transition gewertet werden. Am Tumorrand nicht bekapselter Metastasen konnte MAP1b nicht nachgewiesen werden.

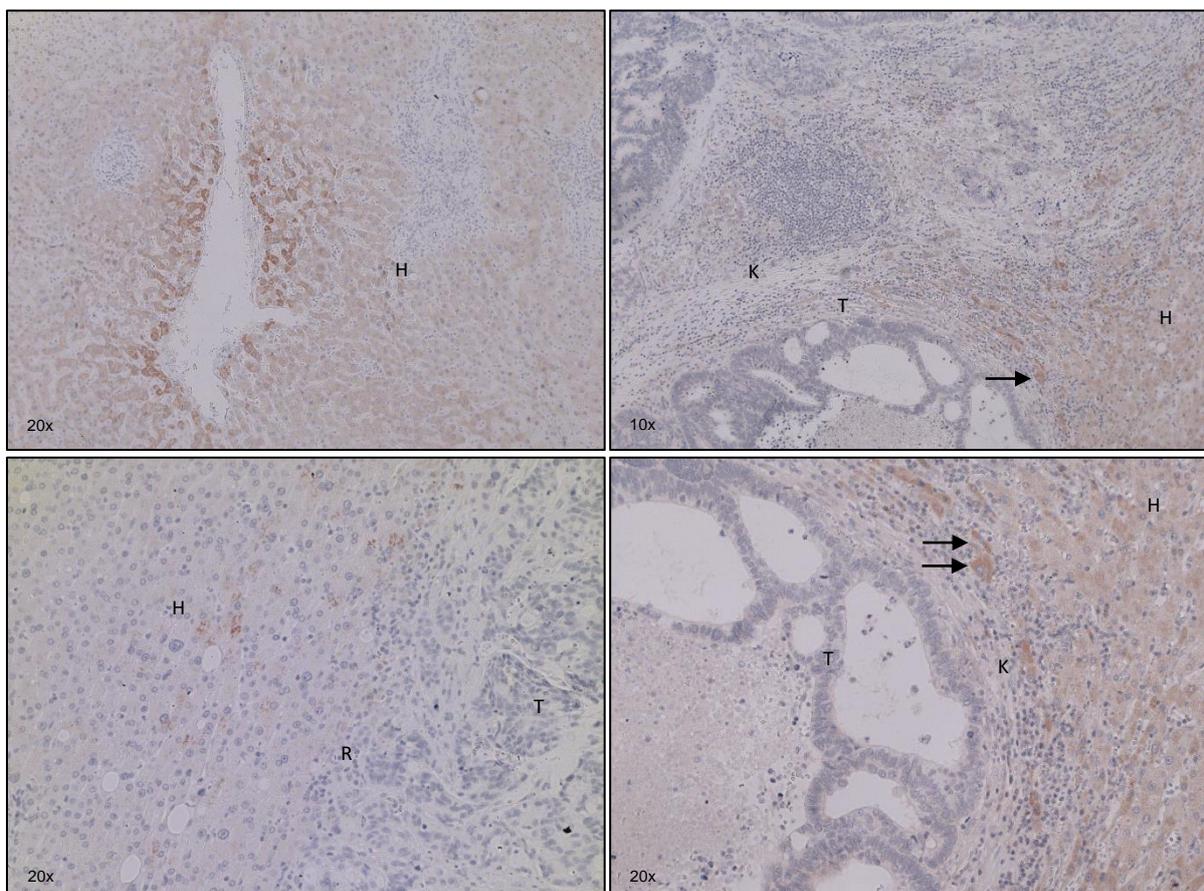


Abbildung 23: MAP1b-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Bild oben links: Verstärkte Expression im Zytoplasma perivaskulärer Hepatozyten, 20-fache Vergrößerung. Bild unten links: Tumorrand ohne Kapsel: MAP1b konnte nicht nachgewiesen werden, 20-fache Vergrößerung. Rechte Seite: Deutlich wird die Expression von MAP1b im Zytoplasma einzelner die Kapsel umgebender Hepatozyten, im Bild mit Pfeilen gekennzeichnet, 10- und 20-fache Vergrößerung. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

Eine Repression des desmosomalen Proteins Desmoplakin wird mit EMT assoziiert. Diese konnten wir via PCR in unseren Proben nicht nachweisen – es zeigte sich unverändert in Metastasen gegenüber Normalgewebe. In diesem Fall wäre eine immunhistochemische Färbung des Metastasenrandes vonnöten, um einzelne, sich aus ihrem Verband lösende Zellen auf den Verlust von Desmoplakin zu beurteilen. Die integralen Membranproteine Integrin  $\beta 1$  und Integrin  $\alpha V$  zeigten sich bei bekapselten Metastasen im Vergleich zur Kontrolle vermehrt exprimiert, in nicht bekapselten Metastasen war nur Integrin  $\beta 1$  stärker exprimiert als in Normalgewebe. Das Gen für Integrin  $\alpha 5$  wurde bei beiden Metastasenarten gegenüber Normalgewebe nicht vermehrt transkribiert. Die Gene des F-11-Rezeptors als Bestandteil von Tight Junctions sowie der Glykoproteine N-Cadherin und Fibronectin 1 zeigten keine relevanten Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit ihrer Transkription zwischen den verschiedenen Proben.

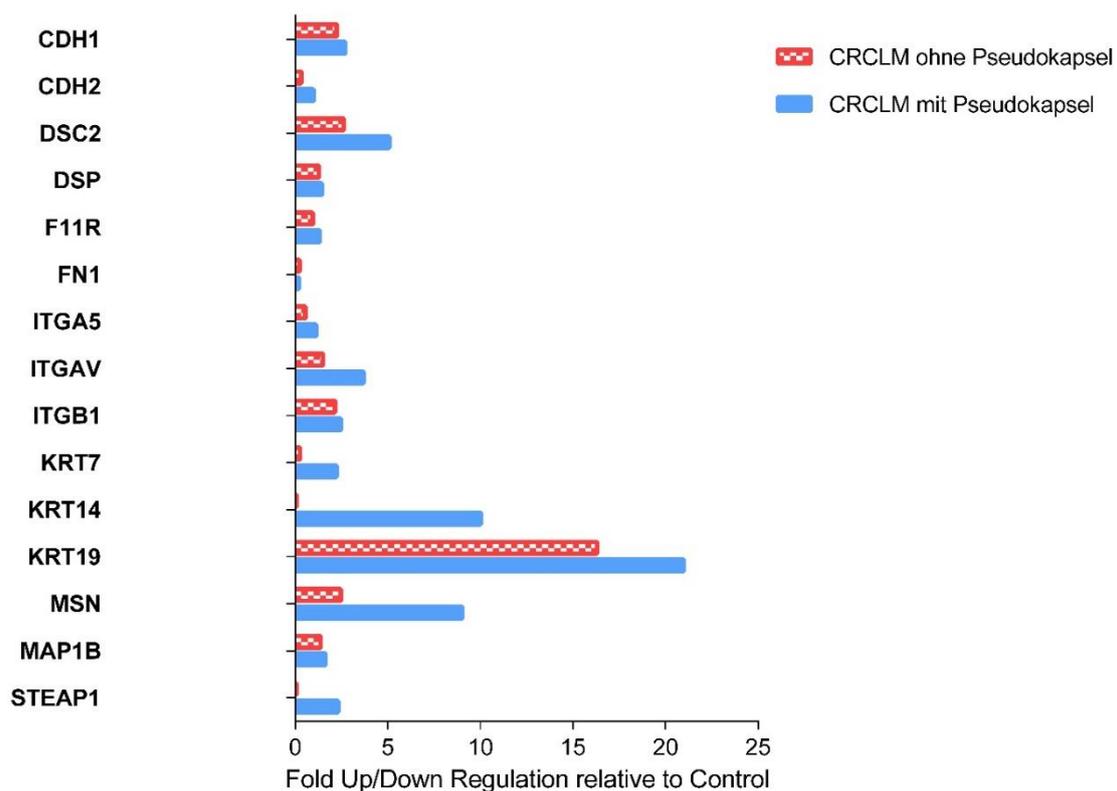


Abbildung 24: Hoch- und Herunterregulation von für Zell-Zell-Kontakte relevanten Genen bei bekapselten (blau) und nicht bekapselten (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle).

#### 4.2.5 Für Kollagen und Matrix relevante Genprodukte

In bekapselten und nicht bekapselten Lebermetastasen wurden im Vergleich zu Normalgewebe vermehrt für Kollagen und Matrix wichtige Genprodukte abgeschrieben. In dieser Untergruppe konnte kein Vorreiter der Metastasenarten festgestellt werden.

Spp1-mRNA (Osteopontin) war in Lebermetastasen im Gegensatz zur Kontrolle erhöht, besonders in CRCLM ohne Kapsel war die Transkription des Gens hochreguliert. Im Vergleich zu Normalgewebe fand sich in den Lebermetastasen und ihren Randbereichen eine starke Erhöhung der Matrixmetalloproteinasen (MMP 2, 3 und 9). Während MMP 2 in CRCLM mit und ohne Kapsel eine ähnliche Quantität aufwiesen, wurden MMP 3 und 9 im Randbereich bekapselter Metastasen häufiger produziert. Metallopeptidase-Inhibitor 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1), welcher durch eine Komplexbildung mit Metalloproteinasen die durch MMPs verursachte Proteolyse stoppt (75), und das Glykoprotein Versican wurden ebenfalls in Lebermetastasen gegenüber Normalgewebe vermehrt exprimiert. Im Vergleich der beiden Metastasenarten untereinander zeigten sich keine relevanten Expressionsunterschiede.

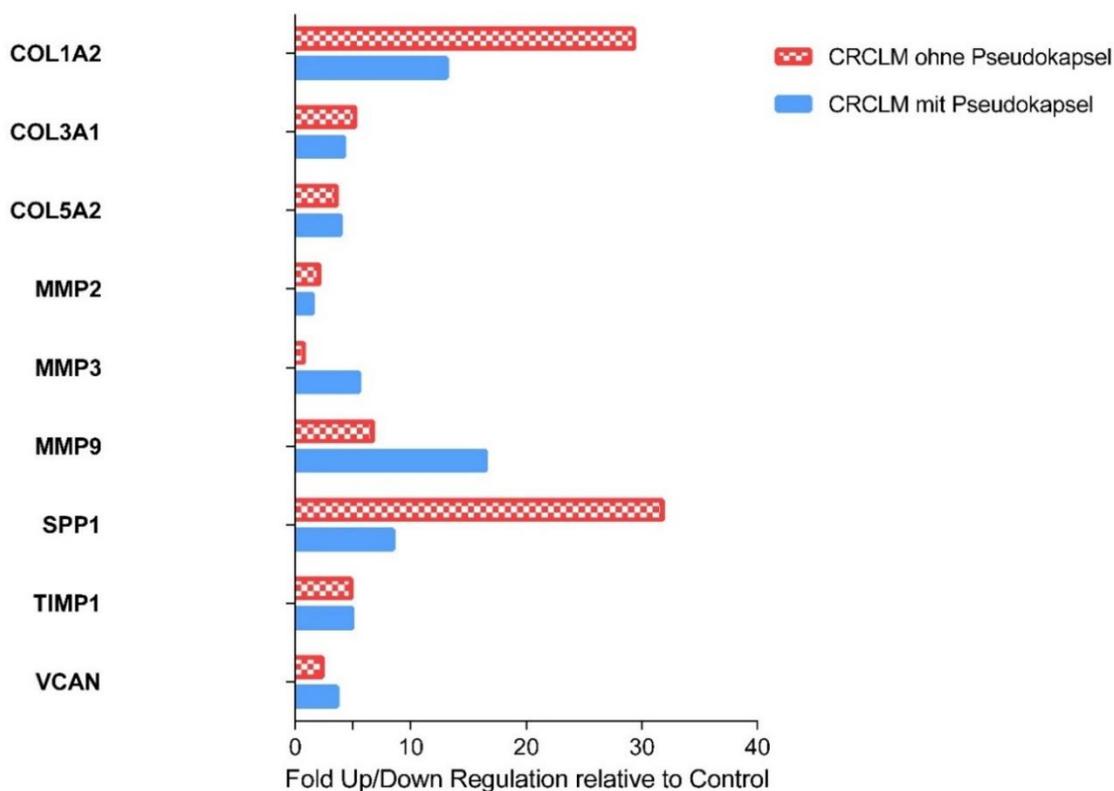


Abbildung 25: Hoch- und Herunterregulation von für Kollagen und Matrix relevanten Genen bei bekapselten (blau) und nicht bekapselten (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle).

#### 4.2.6 Tumorsuppressorgene

Das Transmembranprotein Tomoregulin 1 zeigte sich in den die Kapsel umgebenden Zellen und wurde dementsprechend in Lebermetastasen mit Kapsel signifikant stärker exprimiert als in nicht bekapselten und in Normalgewebe (vgl. 4.3: Custom Arrays).

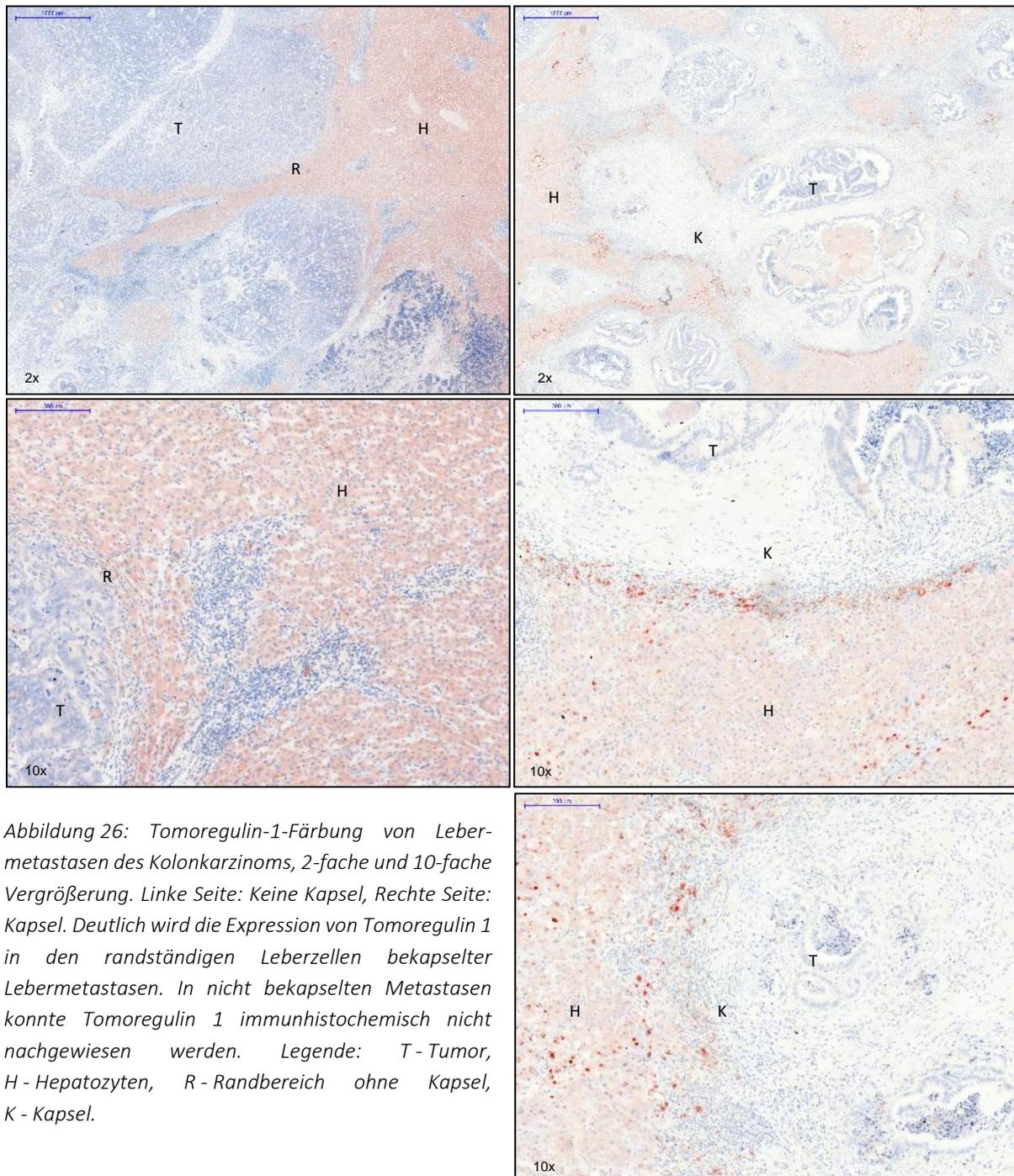


Abbildung 26: Tomoregulin-1-Färbung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms, 2-fache und 10-fache Vergrößerung. Linke Seite: Keine Kapsel, Rechte Seite: Kapsel. Deutlich wird die Expression von Tomoregulin 1 in den randständigen Leberzellen bekapselter Lebermetastasen. In nicht bekapselten Metastasen konnte Tomoregulin 1 immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Legende: T - Tumor, H - Hepatozyten, R - Randbereich ohne Kapsel, K - Kapsel.

### 4.3 Custom-Arrays zur quantitativen Validierung der EMT-Arrays

Bei der quantitativen Validierung der EMT-PCR-Arrays durch die Custom-PCR-Arrays konnten die vorigen Ergebnisse bestätigt werden. Bei Metastasen mit Kapsel konnte eine Hochregulation von Snail 1, 2 und 3, Wnt 5a und 5b, Tomoregulin 1, Nodal, Twist, pGSK-3- $\beta$  und TGF- $\beta$  2 nachgewiesen werden. Caldesmon 1 und TGF- $\beta$  1 waren in Metastasen mit Kapsel ähnlich häufig exprimiert wie in Normalgewebe und nicht bekapselten Metastasen.

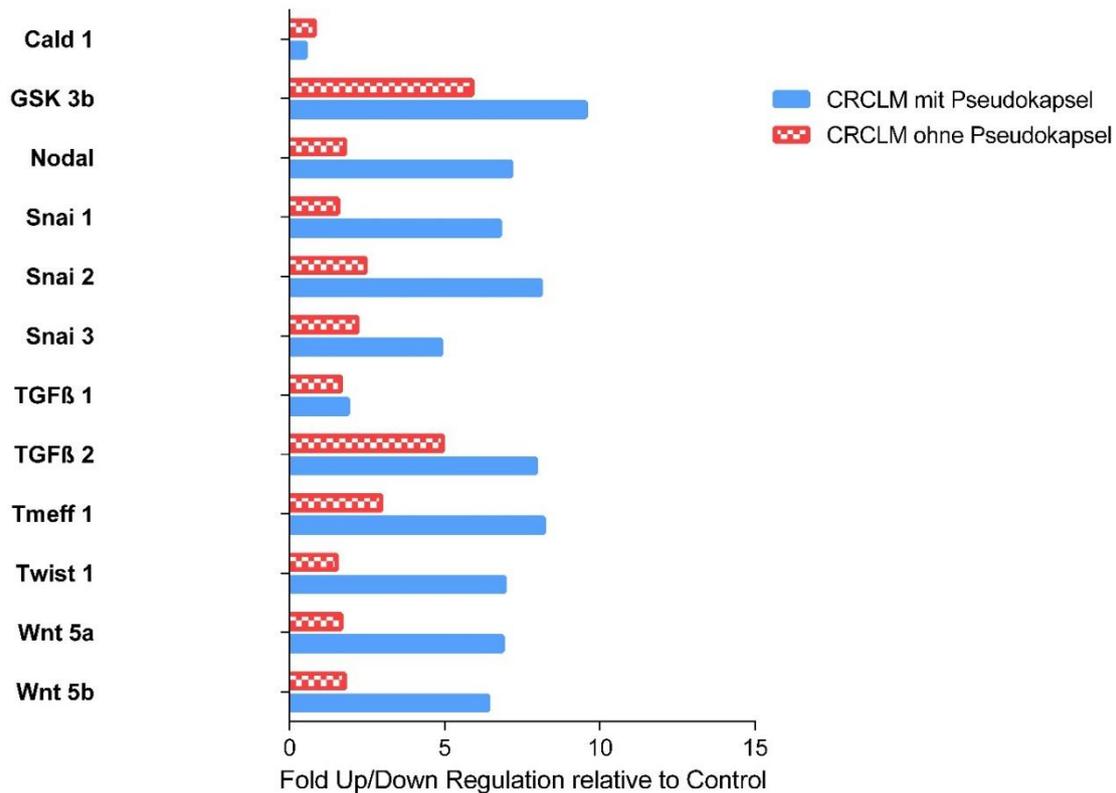


Abbildung 27: Hoch- und Herunterregulation der 12 im Custom Array amplifizierten Gene von bekapselten (blau) und nicht bekapselten (rot kariert) Lebermetastasen, dargestellt als Mehrfaches von gesundem Lebergewebe (Kontrolle).

Bekapselte im Vergleich zu nicht bekapselten Metastasen zeigten ebenso eine statistisch signifikante Hochregulation von Snail 1, 2 und 3, Wnt 5a und 5b, Tomoregulin 1, Nodal und Twist ( $p < 0,02$ ). pGSK-3- $\beta$ , Caldesmon 1 und TGF- $\beta$  2 zeigten sich signifikant unterschiedlich exprimiert, werden jedoch im biologischen Sinn nicht als hoch reguliert verstanden (bei einer Fold Regulation  $< 2$ ,  $p < 0,03$ ). TGF- $\beta$  1 war in Metastasen mit Kapsel ähnlich häufig exprimiert wie in nicht bekapselten Metastasen ( $p > 0,05$ ).

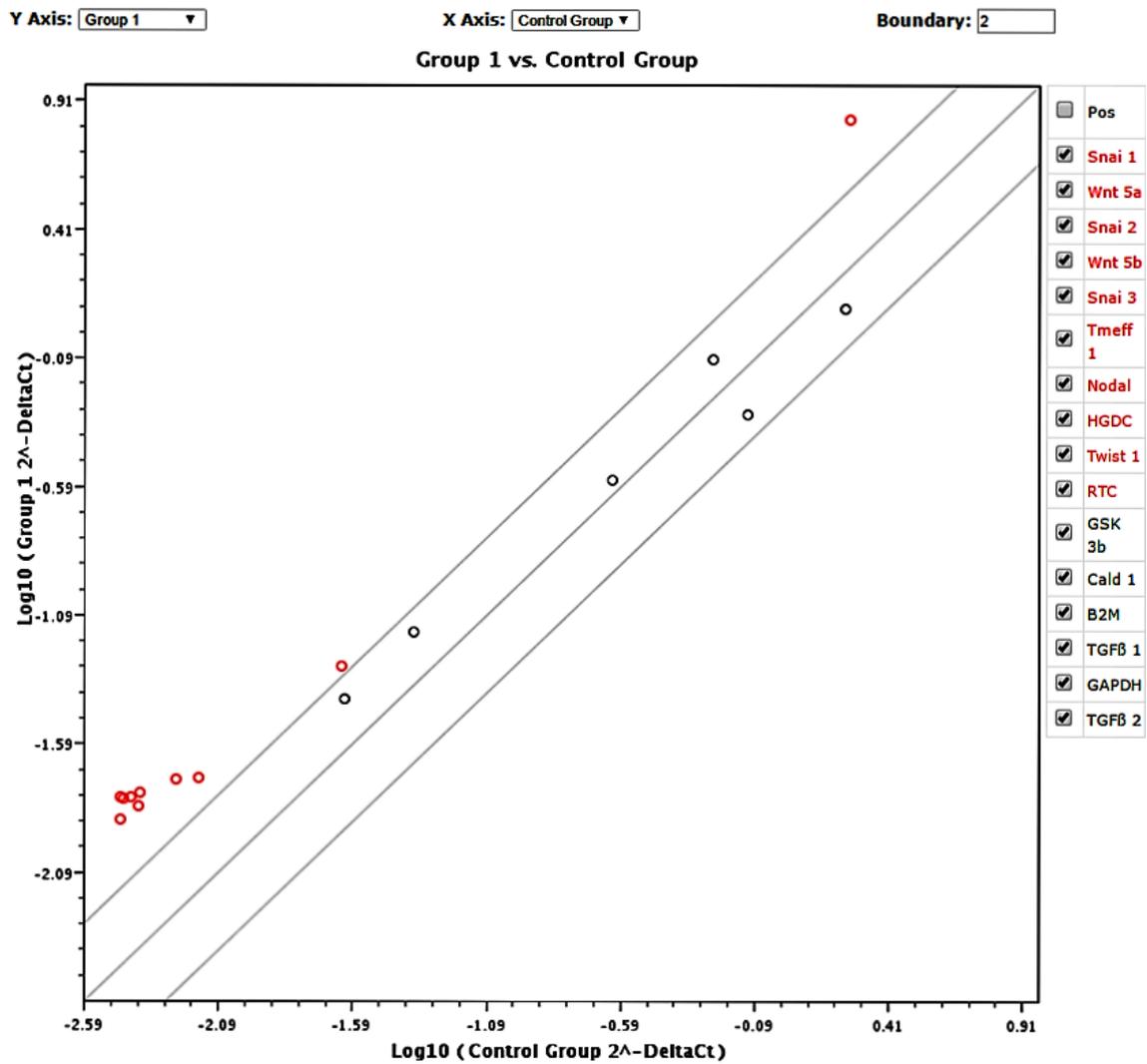


Abbildung 28: Scatter-Plot der Ergebnisse der Custom-Arrays. Aufgetragen sind die gegen die Housekeeping-Gene  $\beta$ -2-Mikroglobulin und GAPDH normalisierten Genexpressionen ( $\log(2^{-\Delta Ct})$ ) der Metastasen mit Kapsel (Gruppe 1, y-Achse) gegen die der Metastasen ohne Kapsel (Control Group, x-Achse).

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Identifizierung der Kapselkomponenten beweist eine Produktion durch mesenchymale Zellen

Die Untersuchung der Genexpression einzelner Komponenten der fibrösen Pseudokapsel ergab ein erhöhtes Vorkommen der Kollagene I, III und V bei CRCLM im Vergleich zu Normalgewebe der Leber. Kollagen I und III konnten dabei mittels Immunohistochemie als Bestandteile der Kapsel identifiziert werden. Beide werden von mesenchymalen Zellen exprimiert, während Epithelzellen vermehrt Kollagen IV als Basalmembrankomponente produzieren (65).

Eine Erhöhung der Kollagenproduktion bei CRC wurde bereits *in vivo* beobachtet (154–156). Die durch die Anwesenheit von Tumorzellen stattfindende verstärkte Kollagenproduktion via durch den Tumor rekrutierte Myofibroblasten konnte von der Arbeitsgruppe Coulson-Thomas et al. *in vitro* demonstriert werden: Bei Ko-Kultivierung und direktem Zell-Zell-Kontakt von kolorektalen Tumorzellen und Fibroblasten wurden Letztere aktiviert und zur Produktion der Kollagene I, III, IV und V angeregt. Auch Proteoglykane, unter anderem Versican, wurden verstärkt exprimiert. Die dichte ECM verminderte in dieser Studie die Migration der neoplastischen Zellen (vgl. 5.2: Konfiguration der ECM). (154)

Versican wurde in den hier durchgeführten Experimenten sowohl in bekapselten als auch in nicht bekapselten CRCLM verglichen mit Normalgewebe vermehrt exprimiert. Mehrere Studien bestätigen eine hochregulierte Expression des Chondroitinsulfats bei verschiedenen Tumoren (157–161), auch bei kolorektalen Lebermetastasen konnte eine hochregulierte Expression via PCR-Array dargestellt werden (162). Versican wird häufig in peritumorösem Gewebe nachgewiesen (149) und konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch als Komponente der den Tumor umgebenden fibrösen Pseudokapsel und in den Tumorsepten identifiziert werden. Bei Adenokarzinomen wird Versican häufig von peritumorösen Stromazellen exprimiert, kann aber auch von den Tumorzellen selbst produziert werden (149). Das Proteoglykan fördert durch seine anti-adhäsiven Eigenschaften die Migrationsfähigkeit der Zellen: es bilde sich eine Hülle aus Versican und Hyaluronen um die migrierende Zelle, sodass sie nicht an der ECM anhafte. Nur am führenden Pol der Zelle sei diese Hülle nicht vorhanden, sodass die Zelle an dieser Stelle spezifisch ECM binden und sich an ihr fortbewegen könne. (149) Ein hohes Versicanlevel wird daher mit einem invasiven Phänotyp und Metastasenbildung assoziiert – bei einigen Tumoren wurde eine inverse Korrelation mit dem Patientenoutcome konstatiert (157–159).

Die neoplastische Modulation der Versicanexpression wird als Mechanismus des Karzinoms verstanden, das umgebende Mikromilieu zu kontrollieren und eine Metastasierung zu vereinfachen. Auch bei den hier untersuchten CRCLM ist es möglich, dass die peritumorösen Fibroblasten durch Signale des Tumors rekrutiert und zur Produktion von Versican angeregt werden. Einen besonderen Einfluss auf die Invasivität von Karzinomen bei der Entstehung von ECM im peritumorösen Raum hat jedoch die Dichte, Zusammensetzung und Anordnung der einzelnen ECM-Bestandteile. Auch wenn Versican in vielen Studien die Invasion des Tumors erleichterte, so ist es im Fall unserer Studie als intermediäres Filament Bestandteil einer fibrösen Kapsel mit protektiver Funktion.

Als Hauptproduzenten der bindegewebigen Kapsel können also mesenchymale Zellen festgelegt werden. Eine zusätzliche Produktion durch Karzinomzellen kann im Fall des Proteoglykans Versican nicht ausgeschlossen werden.

## 5.2 Die Konfiguration der ECM-Fibrillen beeinflusst die Schutzfunktion der Kapsel

Die Kapselbestandteile schützen das umliegende gesunde Gewebe vor Tumorzellinvasion, eine tragende Rolle spielt dabei ihre Ausrichtung im Raum: In den bekapselten CRCLM konnte eine parallele Konfiguration der Kollagenfibrillen in der Pseudokapsel in Bezug auf die invasive Tumorfront dargestellt werden. Eine Fortbewegung der neoplastischen Zellen entlang der extrazellulären Matrix ist möglich (149); durch die Ausrichtung der Fibrillen wird ein Entweichen aus der Kapsel jedoch erschwert.

In 2D- und 3D-Ko-Kultur-Systemen wurde eine durch die ECM-Vermehrung hervorgerufene verminderte Migration und Invasion neoplastischer CRC-Zellen festgestellt. Die parallel zur invasiven Tumorfront platzierten Fibrillen scheinen nicht als Leitstruktur für migrierende invasive neoplastische Zellen dienen zu können. Zudem sei ein Anhaften an verdickten Fibrillen erschwert. Des Weiteren könnte eine eingeschränkte Diffusion löslicher Chemoattraktoren und Wachstumsfaktoren der Tumorzellen durch eine zunehmend verdickte Kollagenbarriere die Invasionsfähigkeit des Karzinoms mindern. (154) In Studien zu Brustkrebs wurde die Migration neoplastisch veränderter Zellen an zur Tumorfront perpendikular angeordneten Kollagenfibrillen nachgewiesen und mit einem invasiveren Phänotyp assoziiert (163). Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen zur invasiven Tumorfront scheint demnach ein Faktor zu sein, der auf Protektion oder Invasion des umliegenden gesunden Gewebes entscheidenden Einfluss nimmt.

In den hier durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von Lebermetastasen des CRCs mit fibröser Pseudokapsel kann keine Verdickung der Kollagenfibrillen, die eine Haftung motiler Zellen erschwert, nachgewiesen werden. Jedoch ist ebenfalls eine parallele Konfiguration der Kollagenfibrillen zur Tumorfront festzustellen. Bei gleichzeitiger Assoziation mit erhöhtem Patientenüberleben sprechen diese Ergebnisse für eine in vivo nachgewiesene Schutzfunktion durch Minimierung der Migrationsmöglichkeiten der CRCLM-Zellen bei zur Tumorfront parallel angeordneten Kollagenfibrillen.

5.3 Die EMT-Aktivität am Tumorrand korreliert mit der Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel. Dabei ist eine EMT in verschiedenen Zelltypen nachweisbar. Die Genexpression am Rand bekapselter CRCLM weist auf Prozesse hin, die Wundheilung und Fibrose ähneln.

Essentiell für die Bildung der fibrösen Pseudokapsel ist der Prozess der epithelialen mesenchymalen Transition. Eine erhöhte Genexpression der für die EMT wichtigen Genprodukte bei CRCLM mit Kapsel konnte in dieser Arbeit belegt werden. Es werden die Ergebnisse der einzelnen Untergruppen (vgl. 4.2: EMT-Aktivität in bekapselten und nicht bekapselten CRCLM) vor dem Hintergrund aktueller Literatur interpretiert. Schließlich wird die Bedeutung der gesamten Genexpressionsunterschiede zwischen den Metastasenarten diskutiert.

#### EMT-Transkriptionsfaktoren

Via PCR und Immunohistochemie konnten wir eine vermehrte Genexpression von Transkriptionsfaktoren der EMT nachweisen. Snail 1, 2, 3, SOX 10, Twist und ZEB 2 zeigten sich dabei bei bekapselten CRCLM vermehrt exprimiert. Interessant ist dabei die immunhistochemische Darstellung der Proteine: Snail 3 und SOX 10 werden in Nuklei beziehungsweise an der Membran von Karzinomzellen in nicht bekapselten CRCLM angefärbt, während Snail 1 im Zytoplasma von Karzinomzellen und die Metastase umgebenden Zellen sichtbar wird und Twist in Zellen am Tumorrand dargestellt werden kann. Die EMT konnte also in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden.

Snail 3 gehört zu den Zinkfingerproteinen der Snail-Familie (164) und gilt damit ebenfalls als EMT-Induktor. Allerdings existieren bisher deutlich weniger Studien zu Snail 3 als zu seinen Verwandten Snail 1 und Snail 2. Das Vorkommen in Skelettmuskelzellen und im Thymus von Mäusen und ein Einfluss auf die Hämatopoese konnten nachgewiesen werden (165, 166). Welche Rolle das Protein allerdings tatsächlich bei der EMT spielt, ist noch unklar. Während der EMT in der Embryonalentwicklung von Mäusen scheint Snail 3 keine essentielle Funktion inne zu haben: nach Ausschalten des Allels konnte in Snail 3 - defizienten adulten Mäusen keinerlei Fehlbildung nachgewiesen werden (167). In einer Studie von Gras et al., welche die unterschiedliche Bedeutung der Snail-Proteine während der Tumorentwicklung untersuchte, zeigten Mammakarzinomzellen nach Injektion mit Snail 3 - kodierenden retroviralen Konstrukten Eigenschaften mesenchymaler Zellen, waren im Vergleich zu Snail 1

produzierenden Karzinomzellen allerdings deutlich weniger invasiv (168). In unserer Studie spricht die starke Expression von Snail 3 in den Nuklei der Tumorzellen bekapselter Lebermetastasen für eine Aktivierung der EMT, die jedoch nicht mit verstärkter Invasivität der Zellen einhergeht. Eine genauere Interpretation unserer Ergebnisse kann nur durch weitere Forschung über die Funktion von Snail 3 erreicht werden.

SOX 10 nimmt als Transkriptionsfaktor unter anderem Einfluss auf die embryonale Entwicklung. Eine Überexpression konnte in Mammakarzinomzellen mit einer erhöhten Stammzell- und Progenitorzellaktivität in Verbindung gebracht werden und resultierte ebenso in der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps (169). SOX 10 scheint in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Funktionen auszuführen. Ein durch Mutation verursachter Funktionsverlust des Proteins ist mit Demyelinisierung des ZNS und PNS sowie einer Aganglionose des Gastrointestinaltrakts und Hypopigmentierung vergesellschaftet (170). Gleiches gilt wohl für die Tumorentwicklung verschiedener Gewebe: Während SOX 10 in Melanomen und Tumoren des ZNS hochreguliert ist, zeigt es sich in gastrointestinalen Karzinomen herunterreguliert (171). In einer Studie von Tong et al. wurde SOX 10 eine Funktion als Tumorsuppressorgen zugewiesen. Es soll über eine noch nicht vollständig geklärte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin den Wnt-Pathway inhibieren und so Proliferation und Metastasierung hemmen (171). Die Hypothese „SOX 10 als Tumorsuppressorgen bei gastrointestinalen Karzinomen“ lässt sich ebenso auf die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente anwenden: in nicht bekapselten CRCLM ist SOX 10 nicht exprimiert – in bekapselten CRCLM finden sich hingegen Zellen mit SOX 10 Expression an ihrer Membran – ein möglicher Hinweis auf den Versuch, den Wnt-Pathway und die  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung zu hemmen und damit das Wachstum des Tumors zu mindern. Gleichzeitig könnte es auch ein Hinweis auf eine stattfindende EMT beziehungsweise auf verstärkte Stammzellaktivität sein.

Snail 1 und Twist (zu ihrer Funktion als EMT-Aktivatoren vgl. 1.3.5: Die epitheliale mesenchymale Transition) lassen sich immunhistochemisch in einigen die Metastasen umgebenden Zellen nachweisen. Findet dort, außerhalb der Metastase, eine EMT zur Ausbildung der bindegewebigen Kapsel, ähnlich dem Prozess bei Wundheilung und Fibrose, statt? Ist im Setting der bekapselten CRCLM ein Zusammenspiel zwischen Tumor- und umgebenden Zellen, das in einer weniger aggressiven Tumorform mündet, möglich? Definitiv konnte in dieser Arbeit durch Immunhistochemie eine erhöhte EMT-Aktivität in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden: in Tumorzellen und nicht klar identifizierbaren

Zellen am Tumorrand – Hepatozyten, hepatische Sternzellen oder auch (Myo)Fibroblasten kommen in Frage.

Aktivatoren der EMT-Transkriptionsfaktoren

Die in der Folge untersuchten Aktivatoren der EMT-Transkriptionsfaktoren, Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie und des Wnt-Pathway, zeigten sich bei bekapselten CRCLM ebenfalls häufig erhöht:

TGF- $\beta$  induziert die epitheliale mesenchymale Transition über verschiedene Mechanismen (vgl. 1.3.5: Die epitheliale mesenchymale Transition). Unter anderem wird über eine Aktivierung der SMAD-Familie eine erhöhte Expression von Snail 1 erreicht. Zusätzlich wird TGF- $\beta$ -vermittelt über Ras und MAP-Kinase, den PI3-Kinase/Akt, Notch- und Wnt-Signalweg Snail 1 rekrutiert beziehungsweise eine EMT vorangetrieben (73, 172, 173). In den PCR-Ergebnissen unserer Studie konnte allerdings kein Unterschied in der Expression von TGF- $\beta$  1 zwischen bekapselten und nicht bekapselten CRCLM festgestellt werden. TGF- $\beta$  2 und 3 zeigten sich bei bekapselten CRCLM jedoch stärker exprimiert. Alle drei TGF- $\beta$ -Isoformen zeigten sich *in vitro* fähig zur EMT-Induktion (173).

Die zur TGF- $\beta$ -Superfamilie zählenden knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) 2 und 7 sind wichtig für die Embryonalentwicklung, vor allem für die Entwicklung von Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Über eine Komplexbildung mit verschiedenen Proteinen der SMAD-Familie wirken sie ebenfalls auf Wachstum und Differenzierung sowie Apoptose anderer Zellarten ein und sind in Entstehung und Metastasierung neoplastischer Zellen involviert. (174) Doch welche Rolle BMP in der Entwicklung von Karzinomen spielen, wird in der aktuellen Forschung kontrovers diskutiert (175). Abhängig vom Mitglied der BMP-Familie und dem jeweiligen Ursprungsgewebe des Tumors ergeben sich unterschiedliche Auswirkungen auf den Progress der Zellen. Bei einem Großteil der sporadischen Kolonkarzinome sei der BMP-Pathway inaktiviert (176). In einer Studie zeigten sich BMP-2-exponierte Kolonkarzinomzellen vermehrt motil und invasiv, während eine Blockade von BMP 2 in einer MET resultierte (177). Eine Studie zum oralen Plattenepithelzellkarzinom berichtet das Gegenteil: BMP 2 vermindere die Transkription von Snail und rufe eine MET hervor (178).

BMP 7 gilt als endogener Gegenspieler der durch TGF- $\beta$ -induzierten EMT. Es bewirkt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Produktion von E-Cadherin. In Mäusen mit schwerer Nierenfibrose konnte durch systemische Gabe von BMP 7 – vermutlich über MET – eine

Wiederherstellung epithelialer Strukturen und dadurch eine Besserung der Organfunktion erreicht werden (174, 179). Eine inhibitorische Funktion für BMP 7 zeigte sich ebenfalls in einer Studie über EMT beim Cholangiokarzinom. Eine Hemmung der TGF- $\beta$ -induzierten Twist- und N-Cadherin-Expression durch BMP 7 setzte die Migrationsfähigkeit der Karzinomzellen herab (180). Doch auch in der Funktion von BMP 7 ist man sich uneinig - in geschädigten Epithelzellen der Luftwege, sowie in Magen- und Prostatakarzinomzellen verursache das Protein eine EMT (175, 181).

BMP 7 zeigt sich in unseren PCR-Ergebnissen in bekapselten CRCLM deutlich gegenüber CRCLM ohne Kapsel erhöht. Die E-Cadherin-Fraktion in der immunhistochemischen Untersuchung ist bei bekapselten CRCLM ebenso erhöht. Daraus ergeben sich mehrere hypothetische Ableitungen: Erstens: Bei Patienten mit bekapselten CRCLM wirken intrazelluläre Mechanismen der durch TGF- $\beta$  vorangetriebenen Tumor-EMT entgegen: Die Rekompensation des E-Cadherin-Verlustes durch eine vermehrte Aktivierung von BMP 7 sowie eine vermehrte Transkription von SOX 10 und pGSK-3- $\beta$  in Tumorzellen als der Versuch, die durch TGF- $\beta$  in Gang gesetzte Signalkaskade aufzuhalten und die EMT der Tumorzellen zu stoppen. Zweitens: Der Tumor wird vom Körper als Wunde bekämpft, und BMP 7 ist bei bekapselten CRCLM erhöht, um das Ausmaß der entstehenden Fibrose einzudämmen. Drittens: BMP 7 treibt die EMT voran und ist ein Indiz für erhöhte EMT-Aktivität bei bekapselten CRCLM.

Auch das Zytokin Nodal fördert die EMT und ist ebenso wichtig für die Embryonalentwicklung. Nach der Embryonalentwicklung wird es zunächst nicht mehr exprimiert und ist später in der Brustdrüsenentwicklung und Plazentation wieder aktiv. (73, 182) In Studien konnte die Aktivierung von Snail durch Nodal nachgewiesen werden. In Brustkrebs und Melanomen zeigte sich bei Nodal-Überexpression eine erhöhte Invasions- und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen (183, 184). Auch in HCC korreliert eine Überexpression von Nodal mit einer erhöhten Tumorausbreitung und einer schlechten Prognose für den Patienten (185). Nodal wird in den hier durchgeführten Experimenten in bekapselten Metastasen vermehrt exprimiert. Dies gilt als Zeichen für eine epitheliale mesenchymale Transition – sowohl für Tumorzellen, wie in den hier genannten Studien dargestellt, als auch für andere Zellen. Die nachgewiesene verstärkte EMT-Aktivität bei bekapselten CRCLM kann auch in diesem Fall als gleichzeitig zur Metastasierungstendenz des Karzinoms stattfindende EMT anderer Zellen interpretiert werden. Ebenfalls könnte das Protein Tomoregulin für die erhöhte Genexpression von Nodal bei bekapselten CRCLM eine Rolle spielen. Tomoregulin 1 zeigt sich in unseren

Ergebnissen in bekapselten CRCLM signifikant vermehrt exprimiert und ist in den die Metastasen umgebenden Zellen angesiedelt. Das Transmembranprotein inhibiert Nodal selektiv und reguliert BMP (186, 187). Eine Funktion als antiproliferativ wirkendes Tumorsuppressorgen wird in einer Studie zu Hirntumoren vermutet (188). Über die Expression von Tomoregulin 1 in kolorektalen Karzinomen sind bisher keine Studien erschienen. Eine reziprok gesteigerte Expression von Nodal und dessen Inhibitor Tomoregulin 1 in bekapselten CRCLM ist denkbar.

Das vermehrte Aufkommen von Genprodukten des Wnt-Pathways bei bekapselten Lebermetastasen ist als Hinweis auf eine vermehrte EMT-Aktivität zu werten. Die durch den Wnt-Liganden verursachte Akkumulation von  $\beta$ -Catenin in der Zelle (vgl. 1.2.1: Die kolorektale Karzinogenese) führt über eine Komplexbildung zu einer Translokation in den Nukleus (4). Dort kann regulatorisch auf die Transkription von Zielgenen eingewirkt werden (189). Sowohl immunhistochemisch als auch via PCR konnten wir die nukleäre Akkumulation beziehungsweise die vermehrte Transkription von  $\beta$ -Catenin nachweisen. Bei Ablauf des Wnt-Signalwegs wird pGSK-3- $\beta$  durch Wnt-Ligand inhibiert. Dabei bindet Wnt unter anderem an den Oberflächenrezeptor Frizzled, dessen Transkription in unseren PCR-Ergebnissen in bekapselten Metastasen hochreguliert war. Auch Wnt 5a und 5b konnten als deutlich vermehrt exprimiert nachgewiesen werden ( $p < 0,02$ ) – der Wnt-Pathway ist in bekapselten CRCLM also stärker aktiviert. Die immunhistochemisch nachgewiesene Ansammlung von pGSK-3- $\beta$  im Zytoplasma randständiger Hepatozyten und Tumorzellen könnte ein Hinweis sein auf den Versuch, die Inhibition durch Wnt-Liganden kompensatorisch durch Überproduktion von pGSK-3- $\beta$  auszugleichen und damit die Degradation und Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin voranzutreiben. Eine Studie zur EMT in gastrointestinalen Karzinomen wies ein ähnliches Ergebnis auf: neben einer Snail- und  $\beta$ -Catenin-Akkumulation zeigte sich pGSK-3- $\beta$  erhöht. Dies wurde als Nachweis der Regulationsfunktion von pGSK-3- $\beta$  gewertet, die es über die Expression von Snail und  $\beta$ -Catenin während der EMT habe. (190)

Für Zellkontakte wichtige Proteine

Immunhistochemisch wird die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Nukleus vor allem im Randbereich beider Metastasenarten sichtbar, während gleichzeitig eine verminderte E-Cadherin-Expression nachgewiesen konnte. Die randständigen Tumorzellen weisen damit

eine besonders hohe EMT-Aktivität auf: das immunhistochemische Ergebnis veranschaulicht die Neigung der Zellen, sich aus ihrem Zellverband zu lösen. In Metastasen ohne Kapsel fällt dies etwas deutlicher auf als in bekapselten CRCLM. Dies könnte ein Hinweis sein auf einen weniger invasiven und besser differenzierten Phänotyp der Karzinomzellen in bekapselten CRCLM (73). Eine Erhöhung von BMP 7 als Gegenspieler der TGF- $\beta$ -induzierten EMT und von pGSK-3- $\beta$  als Kompensationsmechanismus zur Regulation der  $\beta$ -Catenin-Anhäufung bei bekapselten CRCLM könnten unter anderem dafür ursächlich sein.

N-Cadherin findet sich in Karzinomen vermehrt exprimiert (74). Es stabilisiert den Fibroblast-Growth-Factor-Rezeptor (FGFR) 1, dies wiederum aktiviert den FGF-2-Signalweg. Eine erhöhte Produktion von Matrixmetalloproteinase (MMP) 9 ist die Folge. Deshalb wird N-Cadherin mit dem invasiven Phänotyp von Karzinomen in Verbindung gebracht. Außerdem könne eine Expression von N-Cadherin an der Tumorzelloberfläche die Interaktion mit N-Cadherin-positiven Fibroblasten im Stroma und damit die Invasion erleichtern. (65) Die erhöhte Transkription des N-Cadherin-Gens und damit verbundene vermehrte Produktion von MMP 9 (vgl.: 1.3.5: Die epitheliale mesenchymale Transition und 4.2.5: Für Kollagen und Matrix relevante Genprodukte) in bekapselten Metastasen könnte darauf hinweisen, dass über die via Immunohistochemie bei beiden Metastasenarten dargestellte EMT in randständigen Tumorzellen hinaus zusätzlich in anderen Zellen eine EMT stattfindet: Sind N-Cadherin-positive Fibroblasten gegebenenfalls ursächlich für den erhöhten Wert bei bekapselten Metastasen? Eine immunhistochemische Färbung von N-Cadherin am Tumorrand wäre geeignet, die PCR-Ergebnisse, ähnlich wie bei der Färbung von E-Cadherin, qualitativ zu beurteilen.

Das Protein Moesin sorgt für Umbau und Reorganisation von Aktinfilamenten, wie sie während der EMT stattfinden: dünne kortikale Aktinbündel in epithelialen Zellen verdichten sich zu dicken kontraktile Fibrillen in mesenchymalen Zellen (191). Moesin verändert neben der Morphologie über eine Beeinflussung der Relokalisation von CD44 und  $\alpha$ -SMA in die Plasmamembran der Zelle auch die Adhäsions- und Kontraktionsfähigkeit von Zellen (191). Die erhöhte Transkription des Proteins in Metastasen gegenüber Normalgewebe ist ein Kennzeichen für eine verstärkte EMT-Aktivität bei metastasiertem Karzinom. Die häufigere Expression in bekapselten CRCLM gegenüber nicht bekapselten spricht für eine EMT, die zusätzlich zur von der Metastase ausgehenden EMT stattfindet. Das von Brunner et al. nachgewiesene erhöhte Vorkommen von  $\alpha$ -SMA im Kapselbereich unterstützt diese Annahme.

Die in der PCR getesteten Keratine 7, 14 und 19 werden von adulten Hepatozyten nicht synthetisiert (192, 193). Keratin 19 ist in kolorektalem Karzinom zu finden, das bestätigen auch die Ergebnisse des PCR-Arrays, die das Intermediärfilament in Metastasen als vermehrt exprimiert angeben. Die Keratine (CK) 7 und 14 sind in kolorektalem Karzinom selten zu finden (193), passend dazu zeigen die Ergebnisse der PCR eine geringe Expression bei Metastasen ohne Kapsel sowie in gesundem Normalgewebe. Es fällt jedoch eine Hochregulation von Keratin 7 und noch stärker von Keratin 14 in bekapselten Metastasen auf. Eine erhöhte Produktion von Keratin 7 findet sich ebenfalls bei Fibrose der Leber (192), Keratin 14 wird unter anderem verstärkt bei idiopathischer pulmonaler Fibrose synthetisiert (194).

Die verstärkte Expression von Keratin 7 und 14 kann auf ein Entstehen der Kapsel durch Prozesse, die Wundheilung und Fibrose ähnlich sind, hinweisen. Während der Wundheilung entstehen durch EMT mesenchymale Zellen, die weniger als entdifferenzierte Fibroblasten, als vielmehr als Zellen mit „intermediärem Phänotyp“ beschrieben werden können. Sie exprimieren die Keratine 5 und 14. (195) Diese werden auch von aktivierten Keratinozyten synthetisiert, die am Rande einer Wunde angesiedelt sind und Wundheilung und Reepithelialisierung vorantreiben (196). Das Karzinom, auch beschrieben als Wunde, die niemals heilt (197), könnte im Falle dieser Lebermetastasen zu einer „Immunantwort“ in Form einer Kapselbildung um die Metastasen geführt haben. Dafür spricht nicht nur die erhöhte Produktion von CK 14, sondern auch die von Brunner et al. dokumentierte Anwesenheit von Immunzellen an der Kapsel. CK 7, 14 und 19 werden außerdem von fetalen Hepatoblasten synthetisiert (193). Vessey und Hall fanden 2001 bei Ratten mit Leberverletzung einen sogenannten „ovalen“ Zelltyp, der von hepatischen Stammzellen abstamme und bei Regeneration der Leber aktiviert werde (198). Dieser Zelltyp exprimiere CK 19, CK 7 und sei auch zur Produktion von CK 14 fähig (193).

Die bei CRCLM vorliegende Zytokeratinexpression könnte zusätzlich auf eine durch den Tumor hervorgerufene Leberschädigung mit konsekutiver Aktivierung hepatischer Stammzellen zur Lebergeweberegeneration hinweisen. Immunhistochemisch sind Zytokeratine zwischen den Tumorzellen zu erkennen. Bekapselte Metastasen zeigen dabei im Randbereich eine starke Färbung von Keratin 19, während diese bei Metastasen ohne Kapsel am Rand nachlässt. Keratine sind Epithelzellmarker, eine verminderte Expression ist ein Hinweis auf eine EMT. Die Ergebnisse der Immunhistochemie und der PCR lassen vermuten, dass nicht bekapselte Metastasen eine geringere Differenzierung, stärkere Tumor-EMT am Rand und damit ein

höheres Invasionspotenzial aufweisen, während in bekapselten Metastasen neoplastische Epithelzellen in ihrem Zellverband differenzierter und geordneter bleiben und damit auch als weniger aggressiv eingestuft werden können (vgl. 1.3.1: Histopathologische Veränderungen). Das Antigen Steap 1 (Six-transmembrane-epithelial-antigen-of-the-prostate-1) ist ein Transmembranprotein und wurde in vielen verschiedenen Karzinomen, unter anderem dem Kolonkarzinom, nachgewiesen (199).

Es soll über den Transfer kleiner Moleküle der interzellulären Kommunikation und möglicherweise auch der Adhäsion dienen (200). Der mit dem Tumorwachstum einhergehende Connexinverlust, der eine Reduktion von Gap Junctions darstellt und die Möglichkeiten des Austauschs zwischen den Zellen verringert, werde durch eine erhöhte Produktion von Steap 1 ausgeglichen. Steap 1 ermögliche die Kommunikation zwischen Tumorzellen untereinander, sowie den von ihnen rekrutierten Stromazellen und aus dem Knochenmark stammenden Zellen. (200) Yamamoto et al. demonstrierten dies anhand eines Fluoreszenzfarbstofftransfers zwischen Tumor- und Stromazellen, der sich bei hohen Steap-1-Vorkommen in den Tumorzellen deutlich stärker darstellte als bei Zellen aus Steap-1-negativen Karzinomlinien. Gleichzeitig produzierten die rekrutierten Stromazellen, Fibroblasten und Makrophagen auf niedrigerem Level ebenfalls Steap 1. Die durch Steap 1 vermittelte interzelluläre Verständigung sei wichtig für die Karzinomproliferation: De facto bildeten die Steap-1-positiven Karzinomzellen im Xenograft-Mausmodell größere Tumoren als Steap-1-Negative. In vitro hatte die Expression von Steap 1 jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation der neoplastischen Zellen. (200)

Dies ist ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der in vivo vorhandenen durch den Tumor rekrutierten Stromazellen für die Expansion des Karzinoms im Individuum. Eine Inhibition von Steap 1 durch monoklonale Antikörper konnte in Studien das Wachstum neoplastischer Zellen minimieren und stellt damit eine Option für die Entwicklung einer Antitumortherapie dar (201). Hohe Steap-1-Vorkommen in CRC korrelieren mit verkürzter Überlebenszeit (202). In unserer Studie ist Steap 1 in bekapselten CRCLM erhöht. Immunhistochemisch kann es im Zytoplasma in spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Zellen zwischen den Hepatozyten nachgewiesen werden. Außerdem waren Zellkerne und Zytoplasma der Karzinomzellen beider Metastasenarten positiv für den EMT-Marker, ein Beleg für interzelluläre Kommunikation zwischen den Tumorzellen. Im Falle unserer Studie stimmt die erhöhte Steap-1-Expression nicht mit der in anderen Studien konstatierten kürzeren Überlebenszeit überein und wird als

Zeichen für verstärkten Stoffaustausch der Tumorzellen untereinander bei Tumorzellbegrenzung durch eine fibröse Kapsel gewertet.

Einen weiteren Hinweis auf vermehrte EMT-Aktivität bei bekapselten CRCLM gibt die immunhistochemische Färbung von MAP1b. Vor allem in der Entwicklung neuronalen Gewebes ist MAP1b als Stabilisator des Zellgerüsts zum Beispiel bei der Ausbildung von Dendriten bekannt (203). Auch bei der Organisation des Zytoskeletts von Podozyten der Niere konnte eine erhöhte Aktivität des Proteins nachgewiesen werden (153). Einzelne Zellen am Rand der bekapselten Lebermetastasen färben sich positiv für das Mikrotubuli-stabilisierende Protein. Dies könnte auf Strukturveränderungen des Zytoskeletts hinweisen und eine gerade stattfindende EMT im Kapselbereich kennzeichnen.

Integrine sind heterodimere Oberflächenrezeptoren, die durch Bindung spezifischer Epitope intrazelluläre Signalwege aktivieren, welche wiederum Einfluss haben auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Bei mindestens 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Einheiten existieren mehr als 20 verschiedene Integrine. (204) Zu den Integrin-spezifischen Liganden gehören Epitope von Kollagenen. Diese werden in Folge einer durch den Tumor hervorgerufenen Wundheilungsreaktion, wahrscheinlich durch aktivierte hepatische Myofibroblasten, vermehrt produziert. Integrine vermitteln während der Tumor-EMT zwischen extrazellulärer Matrix und Karzinomzellen: Vom Tumor ausgesandte Metalloproteasen degradieren Kollagene – genau wie Metalloproteasen von aktivierten Myofibroblasten bei einer Entzündungsreaktion. (205)

Durch die Degradation werden Integrin- $\alpha$ V-spezifische Epitope des Kollagens freigelegt – das in der Membran der Karzinomzellen vorhandene Integrin bindet an diese und treibt über die Aktivierung intrazellulärer Prozesse die Proliferation der Zelle voran. Eine Blockade von Integrin  $\beta$ 1 und  $\alpha$ V verminderte in Karzinomzellen die Adhäsionsfähigkeit und Proliferationskapazitäten. (205) Verschieden aggressive Typen kolorektaler Lebermetastasen weisen unterschiedliche Integrin-Expressionsmuster auf (205). In dieser Studie kann eine Differenz der Integrin-Expression zwischen CRCLM mit und ohne fibröse Kapsel festgestellt werden. Dabei sind die Integrinuntereinheiten  $\beta$ 1 und  $\alpha$ V in bekapselten Metastasen vermehrt exprimiert verglichen mit Normalgewebe, und die Integrinuntereinheit  $\alpha$ V ist in bekapselten CRCLM stärker vorhanden als in nicht bekapselten. Immunhistochemische Untersuchungen von  $\beta$ 1-Integrin der Arbeitsgruppe Conti et al. wiesen die Expression in Hepatozyten und kolorektalen Lebermetastasen nach, die in den Tumorzellen und den sie umgebenden Stromazellen stärker

ausfiel (205). Die Integrine  $\alpha V$  und  $\beta 1$  werden ebenfalls von stromalen Zellen exprimiert (206). Die Integrine  $\alpha V\beta 6$  und  $\alpha V\beta 8$  scheinen außerdem die Myofibroblastendifferenzierung zu triggern. Die Integrine  $\alpha V\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  wohl ebenfalls, da eine Inhibition die Differenzierung zu Myofibroblasten erschwert. (206) Möglicherweise sind bei unseren Metastasen mit Kapsel mehr aktivierte  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten vorhanden, die für eine verstärkte Expression von Integrin  $\alpha V$  verantwortlich sind. Gleichzeitig ist eine Interpretation der PCR-Ergebnisse schwierig, da in unserer Studie nur einzelne  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten der Integrine untersucht wurden, die in ihren Kombinationen untereinander verschiedene Funktionen ausführen.

#### Kollagen und Matrix

Osteopontin reguliert die Knochenmineralisation und -resorption. Als Zytokin steuert es die Migration und Adhäsion von Immunzellen im Entzündungsstoffwechsel. Osteopontin wird zusätzlich zu den Apoptoseinhibitoren gezählt. (207) Die Bindung an CD 44 oder Integrine (zum Beispiel an die ebenfalls in CRCLM vermehrt exprimierten Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\alpha V$ ) bewirkt eine Tumorphiliferation (208). Nach einer Aktivierung über das ras-Onkogen zeigt es sich in vielen Karzinomen erhöht, so auch im CRC. Induktion von Osteopontin führte zu Tumorphiliferation und Metastasierung, eine Inhibition zur Tumorreduktion. (209–211) Die Erhöhung in CRCLM gegenüber Normalgewebe der Leber, besonders in nicht bekapselten Metastasen, kann ein Hinweis sein auf eine besonders aggressive Wachstumsform.

Die Expression der Metalloproteasen 2, 7 und 9 ist in kolorektalen Karzinomen erhöht (75, 212, 213). Die in unserer Studie untersuchten MMP 2, 3 und 9 zeigten sich ebenfalls in CRCLM mit und ohne Kapsel vermehrt exprimiert. Ein Unterschied in der Expression zwischen den CRCLM zeigte sich bei MMP 3 und 9, diese waren im Randbereich bekapselter CRCLM häufiger vorhanden. In mehreren Studien ist eine erhöhte MMP-Expression mit einer invasiveren Tumorform und einem schlechteren Outcome der Patienten assoziiert (213, 214). Bei Patienten mit bekapselten Lebermetastasen ist das Gegenteil der Fall, sie leben länger als Patienten mit nicht bekapselten CRCLM. Es muss zusätzlich ein anderer Mechanismus stattfinden, der für die Erhöhung der MMP-Expression verantwortlich ist und eventuell sogar gleichzeitig einen protektiven Effekt auf die Lebenszeit des Patienten hat: In entzündetem Gewebe sezernieren Makrophagen und aktivierte Fibroblasten, sowie in der Leber hepatische Myofibroblasten, neben Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  und FGF-2 die Metalloproteasen 2, 3 und 9 (73, 205). Eine Basalmembranzerstörung der umgebenden Epithelzellen mit Degradation von Laminin

und Kollagen 4 sind die Folge, damit beginnt die Rekrutierung epithelialer Zellen zur Transition in die mesenchymale Zelle (73). Die Erklärung für eine Erhöhung der MMP 3 und 9 bei besserem Outcome der Patienten könnte in einer zusätzlich stattfindenden fibrotischen EMT liegen, die zur Ausbildung einer protektiven Kapsel um die CRCLM führt.

Der endogene Gegenspieler der Metalloproteinasen TIMP 1 wird in beiden Metastasentypen vermehrt exprimiert, untereinander unterscheidet sich der Grad der Expression dabei nicht. Eine erhöhte Expression in kolorektalen Karzinomen als Antwort auf vermehrte MMP-Produktion ist belegt (213, 215). Das Protein konnte in fibroblastenähnlichen Zellen an der invasiven Tumorfront lokalisiert werden (216). TIMP 1 korreliert jedoch mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium. Neben seiner antiproteolytischen Funktion, welche die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe erschwert, soll es antiapoptotisch, proliferationsstimulierend und regulierend auf die Angiogenese wirken (212, 213, 215).

Im Vergleich der beiden Metastasenarten zeigt sich bei bekapselten CRCLM eine erhöhte Genexpression der für die epitheliale mesenchymale Transition wichtigen Gene. Bei einer weniger aggressiven Wachstumsform eines Karzinoms würde man zunächst von einer reduzierten EMT-Aktivität ausgehen: der Tumor zeigt deshalb eine geringe Tendenz zur Invasion. Die Kombination von erhöhter EMT-Aktivität und einem weniger invasiven Phänotyp verwundert zunächst. Es lässt ein zusätzlich ablaufendes Geschehen vermuten, das eine vergleichbare Genexpressionserhöhung nach sich zieht: eine Art „fibrotische“ EMT, mit der auch die Bildung der Kapsel um den Tumor erklärt wäre. Bei dieser EMT, vergleichbar mit dem Prozess der Wundheilung, werden dieselben Pathways zur Umwandlung von epithelialen Zellen in einen mesenchymalen Phänotyp aktiviert. Die Hochregulation von EMT-Transkriptionsfaktoren und ihren Aktivatoren findet dort ebenso statt wie bei der Metastasierung von Karzinomen. Für eine EMT, wie sie bei Wundheilung und Fibrose stattfindet, sprechen auch die Erhöhung von Keratin 7 und 14 bei bekapselten CRCLM und eine Erhöhung der Expression von Moesin sowie von Integrinuntereinheiten, die eine Rolle spielen bei der Myofibroblastendifferenzierung. Ähnlich kann die Erhöhung der Metalloproteasen 3 und 9 bei verminderter Invasivität des Karzinoms und der gleichzeitige Nachweis von  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen durch die Arbeitsgruppe Brunner et al. interpretiert werden (133).

Ebenso verleiht die verstärkte Anwesenheit von Immunzellen im Tumorrandbereich bekapselter CRCLM dem Vorgang der Kapselbildung den Charakter einer Immunantwort zur

Abwehr des Fremdkörpers Karzinom. Die Pseudokapselbildung ist dennoch nicht mit dem Prozess der Fibrose gleichzusetzen, da kein Umbau des hepatischen Gewebes mit Funktionsverschlechterung des Organs erfolgt, sondern vielmehr durch verstärkte ECM-Produktion ein spezifischer Schutzwall um die invadierenden Zellen gebildet wird. Dies erfordert eine hochkomplexe Organisation und interzelluläre Kommunikation aller beteiligten Zellen, zu deren Aufklärung wir mit dieser Studie einen kleinen Beitrag leisten können.

Eine weitere mögliche Interpretation wäre die Hochregulation der Transkription EMT-spezifischer Gene durch die Karzinomzellen bekapselter CRCLM, weil eine Ausbreitung durch die fibröse Pseudokapsel eingeschränkt ist, und die Tumorzellen umso mehr versuchen, zu entweichen. Die immunhistochemischen Färbungen belegen jedoch auch in Nicht-Tumorzellen eine EMT-spezifische Genproduktion, weshalb wir uns auf die Kombination von EMT der invadierenden Tumorzellen und EMT im Sinne einer Wundheilung bei bekapselten CRCLM festlegen, der die alleinige EMT der Karzinomzellen bei CRCLM ohne Kapsel gegenübersteht.

5.4 Bekapselte CRCLM sind besser differenziert und zeigen eine erhöhte Expression antiinvasiver Proteine, während nicht bekapselte CRCLM auf molekularer und immunhistochemischer Ebene ein Proteinmuster aufweisen, das ein aggressiveres Wachstumspotenzial hat

Während der Untersuchung der Differenzen des Tumormikromilieus bekapselter und nicht bekapselter CRCLM fiel eine Reihe von Proteinen auf, die zusätzlich zur physischen Barriere der Kapsel zum Schutz des gesunden Gewebes beitragen:

Das Calmodulin, Aktin und Myosin bindende Protein Caldesmon lässt sich via Immunohistochemie im bindegewebigen Bereich der Kapsel darstellen. Neben der Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen ist es auch in Nicht-Muskelzellen vorhanden. Dort stabilisiert es Aktinfilamente und ist an Zellformveränderungen beteiligt (150). Es wird dabei als negativer Regulator von Zellmotilität, Proliferation und MMP-Freisetzung gehandelt, indem es besonderen Einfluss auf die Bildung von Podosomen, bei Karzinomzellen auch Invadopodien genannt, nimmt. (151). Diese sich stetig verändernden Hervorwölbungen der Zellmembran sind besonders wichtig für die Fortbewegung der Zelle und für die Freisetzung und Aufnahme von Botenstoffen. MMPs werden hier zur Degradation extrazellulärer Matrix freigesetzt. In humanen CRC-Zellen konnte durch exogene Zugabe von Caldesmon ein Rückgang invasiver Podosomen nachgewiesen werden, während eine Depletion von Caldesmon die Invasion in umliegendes Gewebe vereinfachte. (217) Das Ergebnis dieser Studie ist besonders wichtig für die Interpretation unserer immunhistochemischen Färbungen. Die externe Bildung von Caldesmon im Kapselbereich schränkt die Invasivität der Karzinomzellen der bekapselten CRCLM ein.

Der Nachweis von pGSK-3- $\beta$  im Zytoplasma der Tumorzellen bekapselter CRCLM deutet auf den Versuch hin, die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und damit die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Pathways aufzuhalten. Verminderte Tumor-EMT und geringeres Invasionspotenzial wären die Folge. Auf eine Inhibition des TGF- $\beta$ -Pathways weist ebenfalls die erhöhte Transkription von BMP 7 hin. Schutz vor Invasion könnte die durch BMP 7 verursachte Aktivierung der E-Cadherin-Produktion und die Hemmung von Tumor-induzierter Twist- und N-Cadherin-Expression bewirken. Das in bekapselten CRCLM verstärkt exprimierte Tomoregulin 1 mindert über Nodal-Inhibition die Aktivierung von Snail und kann als weiterer Schutzmechanismus interpretiert werden. Gesetzt den Fall, SOX 10 agiere bei gastrointestinalen Tumoren als Tumorsuppressor und TGF- $\beta$ -Pathway-Inhibitor, kann seine Erhöhung und immunhistochemisch nachgewiesene

Expression in bekapselten CRCLM ebenfalls als Zeichen der Protektion des gesunden Gewebes gewertet werden. Interessant herauszufinden wäre dabei, warum Zellen des Karzinoms ein Tumorsuppressorgen exprimieren. Bei der Proliferation und Metastasierung von Karzinomen ist häufig die Rede von Tumor-Stroma-Interaktion. Gemeint ist dabei die Kommunikation zwischen Tumorzellen und umgebendem Stroma, häufig im Sinne einer Einflussnahme des Tumors auf das ihn umgebende Gewebe. So können sich Karzinomzellen perfekte Voraussetzungen für Invasion und Ansiedlung in gesundem Gewebe schaffen. Unsere Studie bietet Anlass, über die entgegengesetzte Wirkungsrichtung nachzudenken – eine „Stroma-Tumor-Interaktion“: in bekapselten CRCLM wäre es möglich, dass Stromazellen sowie umliegende Immunzellen die Genexpression des Karzinoms beeinflussen, und beispielsweise eine Produktion von SOX 10 oder pGSK-3- $\beta$  in Karzinomzellen triggern.

Die immunhistochemisch nachgewiesene vermehrte Expression von Keratin 19 im Randbereich der Kapsel ist ein Hinweis darauf, dass bekapselte CRCLM besser differenziert sind. Gleichzeitig zeigt sich der Verlust von E-Cadherin immunhistochemisch bei CRCLM ohne Kapsel stärker und deutet auf eine Wachstumsform mit erhöhter Invasivität hin. Dafür sprechen ebenfalls die erhöhte Expression von Osteopontin und die immunhistochemisch nachgewiesene vermehrte Produktion von Snail 1 in den Karzinomzellen von CRCLM ohne Kapsel.

## 5.5 Vergleich bekapselter kolorektaler Lebermetastasen mit bekapseltem hepatozellulären Karzinom

Bei der Untersuchung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) konnte die Bildung einer fibrösen Kapsel um den Tumor nachgewiesen werden. Diese war ebenfalls mit verlängertem Patientenüberleben assoziiert und gilt als positiver prognostischer Faktor bei HCC: verminderte direkte Leberinvasion, weniger Mikrosatelliten und venöse Permeation sind die Folge. Die Dicke der Kapsel spiele dabei keine Rolle (218–221). Die Kapsel entwickle sich im Verlauf der Erkrankung und sei bei frühen Tumorstadien noch nicht zu diagnostizieren (222). Weder der Grad der Fibrose der Leber noch die Tumorgöße habe einen Einfluss auf das Vorhandensein einer Kapsel (220, 223). Interpretiert wird die Kapselbildung hier als Interaktion zwischen Tumor und gesundem Lebergewebe, vermittelt durch hepatische Sternzellen (hepatic stellate cells, HSC) beziehungsweise Myofibroblasten (218, 223–225).

In der Kapselregion des HCC ließen sich in mehreren Studien  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin-positive Zellen mit angelagertem Kollagen 1 respektive aktivierte hepatische Sternzellen in Anwesenheit von Prokollagen-1-mRNA und  $\alpha$ -SMA darstellen. Aktivierte hepatische Sternzellen wurden ebenso in der Region zwischen Tumor - in diesem Fall sowohl bei HCC und kolorektalen Lebermetastasen – und Normalgewebe ohne Kapsel nachgewiesen, jedoch in geringerem Ausmaß (224). Hepatische Sternzellen sind ruhende Zellen, die Vitamin A speichern und Basalmembran­komponenten produzieren. Eine Aktivierung – durch Leberverletzung, oxidativen Stress, TGF- $\beta$  1 oder PDGF – resultiert in der Änderung ihrer sternförmigen Morphologie in Richtung einer (myo)fibroblastenähnlichen Zellstruktur, dem Verlust ihrer Retinoide und der Produktion von ECM und  $\alpha$ -SMA. (220, 224, 226) Eine Produktion der fibrösen Pseudokapsel durch aktivierte hepatische Sternzellen ist auch bei kolorektalen Lebermetastasen gut vorstellbar.  $\alpha$ -SMA-positive Zellen konnten in der Kapselregion dargestellt werden. Immunhistochemisch ließen sich in Nicht-Tumorzellen am Rand der Kapsel Snail 1, Twist und MAP1b darstellen, die wichtig sind für Zellformveränderung und möglicherweise gerade den Aktivierungsprozess hepatischer Sternzellen darstellen.

Bei beiden Tumorarten ist die Kapsel als Schutz des umliegenden Gewebes zu werten und als Zeichen für eine bessere Prognose des erkrankten Patienten. Eine Triggerung der Kapselbildung von außen ist auch bei HCC noch nicht möglich. Die Entwicklung der Kapsel bei einer anderen Karzinomentität in der Leber lässt vermuten, dass Zellen der Leber in gleicher Weise auf den sich ausbreitenden Tumor reagieren und eine Kapsel bilden, um das Lebergewebe zu schützen.

Dies unterstreicht die Bedeutung spezifischer, in der Leber vorhandener Zellen auf den Prozess der Kapselbildung.

## 5.6 Schwächen der Studie

Die in unserer Studie gewählte Methodik des PCR-Arrays verschafft einen Überblick über einige Gene und Genprodukte, die für die epitheliale mesenchymale Transition wichtig sind. Dabei untersucht die PCR die Quantität der Transkription eines Gens im Gewebe. Eine Zuordnung von EMT-Genexpression zu einer Zellentität ist bei dieser Methode nicht möglich. Tumorzellen, Hepatozyten, fibroblastische Zellen, hepatische Sternzellen oder Immunzellen befinden sich alle im untersuchten Randbereich der CRCLM. Um herauszufinden, in welchen Zellen bestimmte Gene vermehrt exprimiert werden, setzten wir immunhistochemische Methoden ein. Hierdurch wurde eine genauere Lokalisation der Genexpression möglich. Natürlich ließ sich dies im Rahmen dieser Arbeit nicht auf alle 84 im PCR-Array geprüften respektive auf die 47 in Kategorien eingeteilten Gene anwenden. Weitere immunhistochemische Untersuchungen der in der PCR untersuchten Gene wären nötig, um exaktere Rückschlüsse auf die Aktivität der beteiligten Zellen im Tumorrandbereich zu ziehen. Je mehr Proben untersucht werden, desto höher ist die statistische Signifikanz der Ergebnisse – eine höhere Anzahl an untersuchten CRCLM würde die Validität unserer Studie erhöhen.

Zudem waren die untersuchten Gewebeschnitte nicht frisch, sondern bereits paraffiniert. Frisches Gewebe hat eine bessere Qualität und liefert genauere Ergebnisse. Die Paraffinierung von Gewebe führt zu verlinkter RNA. Eine 15-minütige Inkubation der Probe bei 80 °C soll Quervernetzungsprodukte der RNA lösen, dennoch wäre bei frischen Gewebeschnitten eine diesbezügliche Fehlerquelle ausgeschlossen. Allerdings gestaltete sich die Beschaffung der bereits bearbeiteten Proben als deutlich einfacher und zudem konnten dieselben CRCLM verwendet werden, die von Brunner et al. bereits zur Untersuchung der Kapsel genutzt wurden. Eine weitere Herausforderung der Studie ist die Vielfalt an Genen im PCR-Array, die beteiligt sind an der EMT, deren Funktion in verschiedenen Geweben jedoch noch nicht erforscht ist. Statt definitive Konklusionen aus den Ergebnissen ableiten zu können, bleibt häufig die Notwendigkeit zu Vermutungen und möglichen Interpretationen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Makroskopisch können CRCLM unterschieden werden in CRCLM mit und ohne fibröse Kapsel. CRCLM mit Kapsel korrelieren mit einem verlängertem Patientenüberleben. In dieser Arbeit wurden das Tumormikromilieu der CRCLM untersucht und weitere Erkenntnisse bezüglich der Mechanismen gewonnen, die einen Schutz umliegendes Lebergewebes ermöglichen.

Kollagen I, Kollagen III und Versican konnten als Komponenten der Kapsel identifiziert werden. Zusammenfassend kann von einer Produktion der fibrösen Pseudokapsel kolorektaler Lebermetastasen durch Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften ausgegangen werden. Das Tumormikromilieu am Rand kolorektaler Lebermetastasen mit umgebender fibröser Kapsel weist sowohl mikroskopisch als auch auf molekularer Ebene Schutzmechanismen vor Invasion durch Karzinomzellen auf: Die parallel zur invasiven Tumorfront angeordnete extrazelluläre Matrix erschwert das Ausweichen neoplastischer Zellen über die Kapsel hinaus. Das erhöhte Vorkommen von E-Cadherin und Keratin 19 zwischen den Tumorzellen auch am Rand bekapselter CRCLM im Vergleich zu Tumorzellen ohne Kapsel weist auf eine bessere Differenzierung und geringere Aggressivität der Metastase hin. Die verstärkte Transkription von pGSK-3- $\beta$ , BMP 7, SOX 10 und Tomoregulin 1 sowie der immunhistochemische Nachweis von pGSK-3- $\beta$ , SOX 10 und Caldesmon in bekapselten CRCLM deuten auf Mechanismen hin, welche die EMT beziehungsweise die Invasion der Karzinomzellen aufhalten sollen. Der fehlende Schutzmechanismus der fibrösen Pseudokapsel bei CRCLM ohne Kapsel ist auf molekularer Ebene mit einem aggressiveren Genexpressionsmuster verknüpft: Osteopontin zeigt sich in nicht bekapselten CRCLM deutlich erhöht, immunhistochemisch war Snail 1 in den Karzinomzellen häufiger nachzuweisen und der E-Cadherin-Verlust am Randbereich der Metastase größer.

Die Aktivität der epithelialen mesenchymalen Transition ist bei kolorektalen Lebermetastasen mit umgebender fibröser Kapsel höher als bei kolorektalen Lebermetastasen ohne Kapsel. Wir gehen dabei von einer Kombination der EMT invadierender Tumorzellen am Metastasenrand und der EMT zur Rekrutierung Kapsel-produzierender Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften aus. Dieser kombinierten EMT steht bei kolorektalen Lebermetastasen ohne Kapselbildung lediglich die EMT der am Metastasenrand befindlichen Tumorzellen entgegen. Die bei bekapselten CRCLM erhöhte Fraktion von Keratin 7 und 14, die vermehrte Moesin- und Integrinexpression bei Anwesenheit  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen im Kapselbereich, das Vorkommen

von Immunzellen im Randbereich und eine erhöhte MMP-3- und -9-Aktivität ohne gleichzeitig erhöhte Invasivität des Karzinoms sprechen für einen Prozess, welcher der EMT bei Wundheilung und Fibrose ähnelt. Der Vergleich der Kapselbildung bei CRCLM mit einer anderen Karzinomentität in der Leber hebt die Bedeutung von lebereigenen Zelltypen für die Kapselbildung hervor.

Die in dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse unterstützen die Resultate der Arbeitsgruppe von PD Dr. Brunner: Lebergewebe um kolorektale CRCLM ist bei vorhandener fibröser Pseudokapsel besser geschützt. In nachfolgenden Studien sollte geprüft werden, ob die Hochregulation von pGSK-3- $\beta$ , BMP 7 oder SOX 10 als prognostischer Marker für ein verlängertes Patientenüberleben geeignet ist. Die Triggerung der Ausbildung einer Kapsel um Metastasen als therapeutische Option liegt – falls im Bereich des Möglichen – sicher in ferner Zukunft. Dennoch wurden durch die genauere Untersuchung der CRCLM Ergebnisse gewonnen, die eine Grundlage bieten für weitere Forschung und Ansätze zeigen, wie sich der gesunde Organismus gegen die Invasion von Tumorzellen zur Wehr setzen kann.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
APC-Gen	Adenomatous Polyposis Coli - Gen
BMP	Bone morphogenetic proteine
BRAF-Mutation	B-rapidly accelerated fibrosarcoma-Mutation
CEA	Carcino-embryonales Antigen
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomeninstabilität
CRC	Kolorektales Karzinom
CRCLM	Kolorektale Lebermetastasen
CT	Computertomografie
DCC	Deleted-in-Colorectal-Cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE tissue	Formalin-fixed, paraffin embedded tissue
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOBT	Fäkaler okkultter Bluttest
GSK 3-β	Glycogensynthase-Kinase 3-β
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HNPCC	Hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom-Syndrom
kRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LINE	Long-interspersed-nucleotid-element
LITT	Laserinduzierte Interstitielle Thermotherapie
MAP1b	Mikrotubuli assoziiertes Protein 1 b
MET	Mesenchymale epitheliale Transition
MLH	MutL Homolog
MMP	Matrixmetalloproteinase
MR	Magnetresonanztomografie
MSH	MutS Homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NFκB	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PGE2	Prostaglandin E2
PME	Partielle mesorektale Exzision
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie
SMAD	Mothers Against Decapentaplegic Homolog
SOX 10 ≙ SRY-Box 10	Sex Determining Region Y - Box 10
SSA	Sessil serratiertes Adenom

Steap 1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TIMP	Tissue-Inhibitor-Metalloproteinasen
TIMP 1	Metallopeptidase-Inhibitor 1
TME	Totale mesorektale Exzision
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TSA	Traditionell serratiertes Adenom
TWIST	Time-Without-Symptoms-of-disease-and-Toxicity-of-treatment-Gen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
VCAN	Versican
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vgl.	Vergleiche
Wnt	Wingless-Type MMTV Ingetration Site Family
ZEB	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015; 136(5):E359-E386. Available from: URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.29210>.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/), based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013.: based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site.; 2016. Available from: URL: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013).
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759–67.
4. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011; 6(1):479–507.
5. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, Lau W de, Oving I, Hurlstone A et al. The  $\beta$ -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell* 2002; 111(2):241–50.
6. 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.
7. Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 2001; 171(1):1–10.
8. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 1996; 87(2):175–85.
9. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997; 386(6627):796–804.

10. Szyłberg Ł, Janiczek M, Popiel A, Marszałek A. Large Bowel Genetic Background and Inflammatory Processes in Carcinogenesis – Systematic Review. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24:555–61.
11. Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H et al. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998; 78(9):1152–5.
12. Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K et al. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* 1996; 111(5):1369–72.
13. Kirley SD, D'Apuzzo M, Lauwers GY, Graeme-Cook F, Chung DC, Zukerberg LR. The Cables gene on chromosome 18Q regulates colon cancer progression in vivo. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(8):861–3.
14. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810):307–10.
15. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(10):724–37.
16. Pugh S, Thomas GA. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E<sub>2</sub>. *Gut* 1994; 35(5):675–8.
17. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107(4):1183–8.
18. Greenhough A, Smartt HJM, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C et al. The COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30(3):377–86.
19. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386(6625):623–7.
20. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712):643–9.
21. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6):2059–72.
22. Issa J-P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(12):988–93.

23. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3(11):1931–41.
24. Thiagalingam S, Laken S, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2698–702.
25. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(3):153–62.
26. Yamamoto H. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *WJG* 2012; 18(22):2745.
27. Aust DE. WHO classification 2010 for the lower gastrointestinal tract: what is new? *Pathologie* 2011; 32 Suppl 2:326–31.
28. Barras D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer* 2015; 7(Suppl 1):9–12.
29. Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(43):760–6.
30. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22(4):191–7.
31. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B et al. Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107(5 Suppl):1153–61.
32. Myers EA. Colorectal cancer in patients under 50 years of age: A retrospective analysis of two institutions' experience. *WJG* 2013; 19(34):5651.
33. Stewart SL, Wike JM, Kato I, Lewis, Michaud F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001. *Cancer* 2006; 107(5 Suppl):1128–41.
34. Risio M. The natural history of adenomas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2010; 24(3):271–80.
35. Levine JS, Ahnen DJ. Adenomatous Polyps of the Colon. *N Engl J Med* 2006; 355(24):2551–7.

36. Pickhardt PJ, Kim DH, Pooler BD, Hinshaw JL, Barlow D, Jensen D et al. Assessment of volumetric growth rates of small colorectal polyps with CT colonography: A longitudinal study of natural history. *The Lancet Oncology* 2013; 14(8):711–20.
37. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016.; 2014. Available from: URL: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/documents/document/acspc-042280.pdf>.
38. Lash RH, Genta RM, Schuler CM. Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J Clin Pathol* 2010; 63(8):681–6.
39. Butterworth AS, Higgins JPT, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006; 42(2):216–27.
40. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(10):2992–3003.
41. Morris EJA, Penegar S, Whitehouse LE, Quirke P, Finan P, Bishop DT et al. A retrospective observational study of the relationship between family history and survival from colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013; 108(7):1502–7.
42. Lynch HT, La Chapelle A de. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(10):919–32.
43. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(2):385–98.
44. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91(4):854–62.
45. Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol* 2006; 13:81–100.
46. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and Colorectal Cancer. *JAMA* 2008; 300(23):2765.
47. Oyesanmi O, Snyder D, Sullivan N, Reston J, Treadwell J, Schoelles KM. Alcohol Consumption and Cancer Risk: Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2010.
48. Zhu J-Z, Wang Y-M, Zhou Q-Y, Zhu K-F, Yu C-H, Li Y-M. Systematic review with meta-analysis: Alcohol consumption and the risk of colorectal adenoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40(4):325–37.

49. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: An overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Annals of Oncology* 2011; 22(9):1958–72.
50. Samad AKA, Taylor RS, Marshall T, Chapman MAS. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2005; 7(3):204–13.
51. Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y et al. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review of Prospective Studies. *PLoS ONE* 2013; 8(1):e53916.
52. Aleksandrova K, Pischon T, Buijsse B, May AM, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB et al. Adult weight change and risk of colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *European Journal of Cancer* 2013; 49(16):3526–36.
53. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut* 2013; 62(6):933–47.
54. Aykan NF. Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol Rev* 2015; 9(1).
55. Alexander DD, Cushing CA. Red meat and colorectal cancer: A critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obesity Reviews* 2011; 12(5):e472-e493.
56. Carr PR, Walter V, Brenner H, Hoffmeister M. Meat subtypes and their association with colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 2016; 138(2):293–302.
57. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y et al. A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: An Investigation of Potential Mechanisms Underlying this Association. *Cancer Research* 2010; 70(6):2406–14.
58. Zur Hausen H. Red meat consumption and cancer: Reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 2012; 130(11):2475–83. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.27413/full>.
59. LaPierre DP, Lee DY, Li S-Z, Xie Y-Z, Zhong L, Sheng W et al. The ability of versican to simultaneously cause apoptotic resistance and sensitivity. *Cancer Research* 2007; 67(10):4742–50.
60. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3(3):153–73.

61. Shussman N, Wexner SD. Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol. Rep.* 2014; 2(1):1–15. Available from: URL: <http://gastro.oxfordjournals.org/content/2/1/1.full>.
62. Bariol C, Hawkins NJ, Turner JJ, Meagher AP, Williams DB, Ward RL. Histopathological and clinical evaluation of serrated adenomas of the colon and rectum. *Mod Pathol* 2003; 16(5):417–23.
63. Lambert R, Kudo SE, Vieth M, Allen JI, Fujii H, Fujii T et al. Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions. *Gastrointest Endosc* 2009; 70(6):1182–99.
64. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom; 2014.
65. van Marck VL, Bracke ME. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Human Cancer: Landes Bioscience; 2013.
66. Psathakis D, Schiedeck TH, Krug F, Oevermann E, Kujath P, Bruch HP. Ordinary colorectal adenocarcinoma vs. primary colorectal signet-ring cell carcinoma: study matched for age, gender, grade, and stage. *Dis Colon Rectum* 1999; 42(12):1618–25.
67. Wittekind C, editor. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Berlin u.a.: Springer; 2010.
68. Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer* 1995; 75(S1):154–70. Available from: URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19950101\)75:1+<154::AID-CNCR2820751305>3.0.CO;2-Z/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<154::AID-CNCR2820751305>3.0.CO;2-Z/pdf).
69. Holch JW, Demmer M, Lamersdorf C, Michl M, Schulz C, Einem JCv et al. Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *VIS* 2017; 33(1):70–5. Available from: URL: <https://www.karger.com/Article/FullText/454687>.
70. Qiu M, Hu J, Yang D, Cosgrove DP, Xu R. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: A SEER based study. *Oncotarget* 2015; 6(36):38658–66.
71. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; 8(2):98–101.
72. Hadden WJ, Reuver PR de, Brown K, Mittal A, Samra JS, Hugh TJ. Resection of colorectal liver metastases and extra-hepatic disease: a systematic review and proportional meta-analysis of survival outcomes. *HPB (Oxford)* 2016; 18(3):209–20.

73. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(6):1420–8.
74. Shirkoohi R. Epithelial mesenchymal transition from a natural gestational orchestration to a bizarre cancer disturbance. *Cancer Science* 2013; 104(1):28–35. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cas.12074/full>.
75. LeGolvan MP, Resnick M. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. *J Surg Oncol* 2010; 102(8):898–908.
76. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92(8):827–39.
77. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):101–17.
78. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6-7):303–14.
79. Kroepil F, Fluegen G, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M et al. Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas. *PLoS ONE* 2012; 7(9):e46665.
80. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117(7):927–39.
81. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2006; 131(3):830–40.
82. Suzuki H, Masuda N, Shimura T, Araki K, Kobayashi T, Tsutsumi S et al. Nuclear beta-catenin expression at the invasive front and in the vessels predicts liver metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008; 28(3B):1821–30.
83. Kitayama J, Nagawa H, Tsuno N, Osada T, Hatano K, Sunami E et al. Laminin mediates tethering and spreading of colon cancer cells in physiological shear flow. *Br J Cancer* 1999; 80(12):1927–34.

84. Kyrø C, Skeie G, Loft S, Landberg R, Christensen J, Lund E et al. Intake of whole grains from different cereal and food sources and incidence of colorectal cancer in the Scandinavian HELGA cohort. *Cancer Causes Control* 2013; 24(7):1363–74.
85. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011; 343(nov10 1):d6617-d6617.
86. Lee JE, Chan AT. Fruit, Vegetables, and Folate: Cultivating the Evidence for Cancer Prevention. *Gastroenterology* 2011; 141(1):16–20.
87. Aune D, Lau R, Chan DSM, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E et al. Nonlinear Reduction in Risk for Colorectal Cancer by Fruit and Vegetable Intake Based on Meta-analysis of Prospective Studies. *Gastroenterology* 2011; 141(1):106–18.
88. Brotons C, Benamouzig R, Filipiak KJ, Limmroth V, Borghi C. A Systematic Review of Aspirin in Primary Prevention: Is It Time for a New Approach? *Am J Cardiovasc Drugs* 2015; 15(2):113–33.
89. Burn J, Gerdes A-M, Macrae F, Mecklin J-P, Moeslein G, Olschwang S et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: An analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *The Lancet* 2011; 378(9809):2081–7.
90. Burn J, Sheth H. The role of aspirin in preventing colorectal cancer. *Br Med Bull* 2016; 119(1):17–24.
91. Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS, Lederle FA, Bond JH, Mandel JS et al. Long-Term Mortality after Screening for Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2013; 369(12):1106–14.
92. Allison JE, Tekawa IS, Ransom LJ, Adrain AL. A Comparison of Fecal Occult-Blood Tests for Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med* 1996; 334(3):155–60.
93. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology\*†. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2008; 58(3):130–60. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/CA.2007.0018/full>.

94. Rockey DC, Paulson E, Niedzwiecki D, Davis W, Bosworth HB, Sanders L et al. Analysis of air contrast barium enema, computed tomographic colonography, and colonoscopy: Prospective comparison. *The Lancet* 2005; 365(9456):305–11.
95. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF et al. Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *N Engl J Med* 2012; 366(8):687–96.
96. Heresbach D, Barrioz T, Lapalus M, Coumaros D, Bauret P, Potier P et al. Miss rate for colorectal neoplastic polyps: A prospective multicenter study of back-to-back video colonoscopies. *Endoscopy* 2008; 40(4):284–90.
97. Leufkens A, van Oijen M, Vleggaar F, Siersema P. Factors influencing the miss rate of polyps in a back-to-back colonoscopy study. *Endoscopy* 2012; 44(05):470–5.
98. West NP, Hohenberger W, Weber K, Perrakis A, Finan PJ, Quirke P. Complete Mesocolic Excision With Central Vascular Ligation Produces an Oncologically Superior Specimen Compared With Standard Surgery for Carcinoma of the Colon. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(2):272–8.
99. Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, Macdonald JS, Labianca R, Haller DG et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients. *N Engl J Med* 2001; 345(15):1091–7.
100. Goldberg S, Klas JV. Total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer: a view from the USA. *Semin Surg Oncol* 1998; 15(2):87–90.
101. Moore JS, Cataldo PA, Osler T, Hyman NH. Transanal Endoscopic Microsurgery is more Effective than Traditional Transanal Excision for Resection of Rectal Masses. *Diseases of the Colon & Rectum* 2008; 51(7):1026–31.
102. Leong AF. Selective total mesorectal excision for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43(9):1237–40.
103. Zaheer S, Pemberton JH, Farouk R, Dozois RR, Wolff BG, Ilstrup D. Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1998; 227(6):800–11.
104. Hohenberger W, Lahmer G, Fietkau R, Croner RS, Merkel S, Göhl J et al. Neoadjuvante Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms. *Chirurg* 2009; 80(4):294–302.

105. Montedori A, Cirocchi R, Farinella E, Sciannameo F, Abraha I. Covering ileo- or colostomy in anterior resection for rectal carcinoma. In: Montedori A, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996.
106. Cirocchi R, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996.
107. Adam R, Wicherts DA, Haas RJ de, Ciaccio O, Levi F, Paule B et al. Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J Clin Oncol* 2009; 27(11):1829–35.
108. Cirocchi R, Trastulli S, Boselli C, Montedori A, Cavaliere D, Parisi A et al. Radiofrequency ablation in the treatment of liver metastases from colorectal cancer. In: Cirocchi R, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996.
109. Townsend A, Price T, Karapetis C. Selective internal radiation therapy for liver metastases from colorectal cancer. In: Townsend A, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 1996.
110. Survival Rates for Colorectal Cancer, by Stage; 2018 [cited 2018 May 29]. Available from: URL: <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-survival-rates>.
111. TNM Classification of Malignant Tumours - 7th ed. [cited 2018 May 29Uhr]. Available from: URL: [http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM\\_Classification\\_of\\_Malignant\\_Tumours\\_Website\\_15%20MAy2011.pdf](http://www.uicc.org/sites/main/files/private/TNM_Classification_of_Malignant_Tumours_Website_15%20MAy2011.pdf).
112. Nagtegaal ID, Quirke P, Schmoll H-J. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9(2):119–23.
113. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230(3):309-18; discussion 318-21.
114. Shirabe K, Takenaka K, Gion T, Fujiwara Y, Shimada M, Yanaga K et al. Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. *Br J Surg* 1997; 84(8):1077–80.

115. Haas RJ de, Wicherts DA, Flores E, Azoulay D, Castaing D, Adam R. R1 resection by necessity for colorectal liver metastases: is it still a contraindication to surgery? *Ann Surg* 2008; 248(4):626–37.
116. Yokoyama N, Shirai Y, Ajioka Y, Nagakura S, Suda T, Hatakeyama K. Immunohistochemically detected hepatic micrometastases predict a high risk of intrahepatic recurrence after resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2002; 94(6):1642–7.
117. Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999; 86(3):332–7.
118. Okano K, Yamamoto J, Moriya Y, Akasu T, Kosuge T, Sakamoto M et al. Macroscopic intrabiliary growth of liver metastases from colorectal cancer. *Surgery* 1999; 126(5):829–34.
119. Knijn N, de Ridder, Jannemarie A M, Punt CJA, de Wilt, Johannes H W, Nagtegaal ID. Histopathological evaluation of resected colorectal cancer liver metastases: what should be done? *Histopathology* 2013; 63(2):149–56.
120. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005; 241(5):715-22, discussion 722-4.
121. Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M. Resection of colorectal liver metastases. *World J. Surg.*; 19(1):59–71. Available from: URL: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00316981.pdf>.
122. Nakamura S, Yokoi Y, Suzuki S, Baba S, Muro H. Results of extensive surgery for liver metastases in colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1992; 79(1):35–8.
123. Yamamoto J, Sugihara K, Kosuge T, Takayama T, Shimada K, Yamasaki S et al. Pathologic support for limited hepatectomy in the treatment of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 1995; 221(1):74–8.
124. Holdhoff M, Schmidt K, Diehl F, Aggrawal N, Angenendt P, Romans K et al. Detection of tumor DNA at the margins of colorectal cancer liver metastasis. *Clin Cancer Res* 2011; 17(11):3551–7.

125. Kokudo N, Miki Y, Sugai S, Yanagisawa A, Kato Y, Sakamoto Y et al. Genetic and histological assessment of surgical margins in resected liver metastases from colorectal carcinoma: Minimum surgical margins for successful resection. *Arch Surg* 2002; 137(7):833–40.
126. Ayez N, Lalmahomed ZS, Eggermont AMM, Ijzermans JNM, Jonge J de, van Montfort K et al. Outcome of Microscopic Incomplete Resection (R1) of Colorectal Liver Metastases in the Era of Neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(5):1618–27.
127. Bodingbauer M, Tamandl D, Schmid K, Plank C, Schima W, Gruenberger T. Size of surgical margin does not influence recurrence rates after curative liver resection for colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg* 2007; 94(9):1133–8.
128. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E et al. High Prevalence of Activated Intraepithelial Cytotoxic T Lymphocytes and Increased Neoplastic Cell Apoptosis in Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability. *The American Journal of Pathology* 1999; 154(6):1805–13.
129. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23(3):609–18.
130. Ogino S, Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Kirkner GJ et al. LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 2008; 122(12):2767–73.
131. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES et al. A Cohort Study of Tumoral LINE-1 Hypomethylation and Prognosis in Colon Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2008; 100(23):1734–8.
132. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4):298–306.
133. Brunner SM, Kesselring R, Rubner C, Martin M, Jeiter T, Boerner T et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *Br J Surg* 2014; 101(13):1681–91.
134. Galon J. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* 2006; 313(5795):1960–4.

135. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G et al. In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(35):5944–51.
136. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T et al. Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(6):610–8.
137. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research* 2011; 71(4):1263–71.
138. Okano K, Yamamoto J, Kosuge T, Yamamoto S, Sakamoto M, Nakanishi Y et al. Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases. *Cancer* 2000; 89(2):267–75.
139. Raimundas Lunevicius et al. Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer; 2000.
140. Ohlsson B, Stenram U, Tranberg KG. Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience. *World J Surg* 1998; 22(3):268-76; discussion 276-7.
141. Lunevicius R, Nakanishi H, Ito S, Kozaki K, Kato T, Tatematsu M et al. Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127(3):193–9.
142. Qiagen GmbH. RNeasy FFPE Handbook: For purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections 2014; (HB-0375-004-1090267-HB-RNeasy-FFPE-1214-WW):14–6.
143. Qiagen GmbH. RT2 PreAMP cDNA Synthesis Handbook: For synthesis and preamplification of cDNA from For synthesis and preamplification of cDNA from small RNA samples and RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded samples. Microsoft Word - 1062770\_HBPre\_RT2PreAMPcDNASynthesisKit\_032011.doc 2011:17–21.
144. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487–91.

145. Qiagen GmbH. RT2 Profiler PCR Array Handbook: For pathway-focused gene expression profiling using real-time RT-PCR 2014; (HB-1011-005-1091079-HB-RT2Profiler-1214-WW).
146. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit 2007; 37(2):120–6.
147. Michael Walter Pfaffl. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOSpektrum 1/04; 10:92–5.
148. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. Methods 2001; 25(4):402–8.
149. Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, Russell DL, Horsfall DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. Cancer Metastasis Rev 2009; 28(1-2):233–45.
150. Pritchard K, Moody CJ. Caldesmon: A calmodulin-binding actin-regulatory protein. Cell Calcium 1986; 7(5-6):309–27.
151. Hai C-M. Caldesmon as a therapeutic target for proliferative vascular diseases. Mini Rev Med Chem 2008; 8(12):1209–13.
152. The Human Proteinatlas: MAP1B [cited 2018 Jun 10Uhr]. Available from: URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131711-MAP1B/pathology>.
153. Gödel M, Temerinac D, Grahammer F, Hartleben B, Kretz O, Riederer BM et al. Microtubule Associated Protein 1b (MAP1B) Is a Marker of the Microtubular Cytoskeleton in Podocytes but Is Not Essential for the Function of the Kidney Filtration Barrier in Mice. PLoS ONE 2015; 10(10):e0140116.
154. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, Paula CA de, Am Mader, Waisberg J et al. Colorectal cancer desmoplastic reaction up-regulates collagen synthesis and restricts cancer cell invasion. Cell Tissue Res 2011; 346(2):223–36.
155. Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. J Proteomics 2013; 94:473–85.
156. Hilska M, Collan Y, Peltonen J, Gullichsen R, Paajanen H, Laato M. The distribution of collagen types I, III, and IV in normal and malignant colorectal mucosa. European Journal of

Surgery 1998; 164(6):457–64. Available from: URL:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/110241598750004274/pdf>.

157. Pukkila M, Kosunen A, Ropponen K, Virtaniemi J, Kellokoski J, Kumpulainen E et al. High stromal versican expression predicts unfavourable outcome in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60(3):267–72.

158. Pirinen R, Leinonen T, Bohm J, Johansson R, Ropponen K, Kumpulainen E et al. Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. *Hum Pathol* 2005; 36(1):44–50.

159. Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR et al. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(4):963–71.

160. Wit M de, Belt EJ, Delis-van DPM, Carvalho B, Coupe VM, Stockmann HB et al. Lumican and versican are associated with good outcome in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2013; 20 Suppl 3:S348-59.

161. Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A. Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *The American Journal of Pathology* 2002; 160(2):549–57.

162. Lin HM, Chatterjee A, Lin YH, Anjomshoaa A, Fukuzawa R, McCall JL et al. Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis. *Oncol Rep* 2007; 17(6):1541–9.

163. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin signaling. *Cell* 2009; 139(5):891–906.

164. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human SNAIL3 (SNAI3) gene in silico. *Int J Mol Med* 2003; 11(3):383–8.

165. Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, Ozaki H et al. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(2):626–33.

166. Dahlem T, Cho S, Spangrude GJ, Weis JJ, Weis JH. Overexpression of Snai3 suppresses lymphoid- and enhances myeloid-cell differentiation. *Eur J Immunol* 2012; 42(4):1038–43.

167. Bradley CK, Norton CR, Chen Y, Han X, Booth CJ, Yoon JK et al. The Snail Family Gene Snai3 Is Not Essential for Embryogenesis in Mice. *PLoS ONE* 2013; 8(6).
168. Gras B, Jacquaroud L, Wierinckx A, Lamblot C, Fauvet F, Lachuer J et al. Snail family members unequally trigger EMT and thereby differ in their ability to promote the neoplastic transformation of mammary epithelial cells. *PLoS ONE* 2014; 9(3):e92254.
169. Dravis C, Spike BT, Harrell JC, Johns C, Trejo CL, Southard-Smith EM et al. Sox10 regulates stem/progenitor and mesenchymal cell states in mammary epithelial cells. *Cell Rep* 2015; 12(12):2035–48.
170. Inoue K, Tanabe Y, Lupski JR. Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation. *Annals of Neurology* 1999; 46(3):313–8. Available from: URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1531-8249\(199909\)46:3<313::AID-ANA6>3.0.CO;2-7/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1531-8249(199909)46:3<313::AID-ANA6>3.0.CO;2-7/pdf).
171. Tong X, Li L, Li X, Heng L, Zhong L, Su X et al. SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncotarget* 2014; 5(21):10571–83.
172. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19(2):156–72.
173. Nagaraj NS, Datta PK. Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(1):77–91.
174. Richard N. Wang. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases* 2014; 1(1):87–105. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304214000105/pdf?md5=c807e1659fd0757765b057e5674db5b7&pid=1-s2.0-S2352304214000105-main.pdf>.
175. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget* 2016; 7(47):78206–18.
176. Kodach LL, Wiercinska E, Miranda NFCCd, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP et al. The Bone Morphogenetic Protein Pathway Is Inactivated in the Majority of Sporadic Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 2008; 134(5):1332-1341.e3. Available from: URL: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508508003478/fulltext>.

177. Kang MH, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Oh SC, Yoo YA. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced EMT and invasion. *Oncol Rep* 2009; 22(3):525–34.
178. Chiba T, Ishisaki A, Kyakumoto S, Shibata T, Yamada H, Kamo M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mesenchymal-epithelial transition in HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells via Smad1/5/9 pathway suppression. *Oncol Rep* 2017; 37(2):713–20.
179. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Müller GA et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(6):F1060-7.
180. Duangkumpha K, Techasen A, Loilome W, Namwat N, Thanan R, Khuntikeo N et al. BMP-7 blocks the effects of TGF-beta-induced EMT in cholangiocarcinoma. *Tumour Biol* 2014; 35(10):9667–76.
181. McCormack N, Molloy EL, O’Dea S. Bone morphogenetic proteins enhance an epithelial-mesenchymal transition in normal airway epithelial cells during restitution of a disrupted epithelium. *Respiratory Research* 2013; 14(1):36. Available from: URL: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1465-9921-14-36?site=respiratory-research.biomedcentral.com>.
182. Sherbet GV. *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*: Elsevier; 2011. Available from: URL: <https://books.google.de/books?id=9qIS8leBmJcC>.
183. Quail DF, Zhang G, Findlay SD, Hess DA, Postovit L-M. Nodal promotes invasive phenotypes via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Oncogene* 2014; 33(4):461–73.
184. Fang R, Zhang G, Guo Q, Ning F, Wang H, Cai S et al. Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Lett* 2013; 333(1):66–75.
185. Chen J, Li J, Liu W, Jia W, Xu G, Ma J. Expression of Nodal in hepatocellular carcinoma and its relationship with angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2014; 52(3):188–92.
186. Harms PW, Chang C. Tomoregulin-1 (TMEFF1) inhibits nodal signaling through direct binding to the nodal coreceptor Cripto. *Genes Dev* 2003; 17(21):2624–9.

187. Chang C, Eggen BJL, Weinstein DC, Brivanlou AH. Regulation of nodal and BMP signaling by tomoregulin-1 (X7365) through novel mechanisms. *Dev Biol* 2003; 255(1):1–11.
188. Gery S, Yin D, Xie D, Black KL, Koeffler HP. TMEFF1 and brain tumors. *Oncogene* 2003; 22(18):2723. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/1206351.pdf>.
189. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(3):178–96.
190. Zheng H, Li W, Wang Y, Liu Z, Cai Y, Xie T et al. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and  $\beta$ -catenin expression during Fas-induced epithelial–mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *European Journal of Cancer* 2013; 49(12):2734–46. Available from: URL: <http://www.ejancer.com/article/S0959804913002177/fulltext>.
191. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell* 2011; 22(24):4750–64.
192. Chougule P, Sumitran-Holgersso S. Cytokeratins of the Liver and Intestine Epithelial Cells During Development and Disease. In: Hamilton G, editor. *Cytokeratins - tools in oncology*. Rijeka: InTech; 2012.
193. Pastuszak M, Groszewski K, Dyrła P, Wojtuń S, Gil J. Cytokeratins in gastroenterology. Systematic review. *Prz Gastroenterol* 2015; 10(2):61–70.
194. Jonsdottir HR, Arason AJ, Palsson R, Franzdottir, SR, Gudbjartsson T, Isaksson HJ et al. Basal cells of the human airways acquire mesenchymal traits in idiopathic pulmonary fibrosis and in culture. *Lab Invest* 2015; 95(12):1418–28.
195. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7:vii89-92.
196. Savagner P. *Rise and Fall of Epithelial Phenotype: Concepts of Epithelial-Mesenchymal Transition*: Springer London, Limited; 2007. Available from: URL: <https://books.google.de/books?id=DHmA12sU4n0C>.
197. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315(26):1650–9.
198. Vessey CJ, La Hall PDM. Hepatic stem cells: A review. *Pathology* 2001; 33(2):130–41.

199. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, Leong K, Mitchell SC et al. STEAP: A prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(25):14523–8.
200. Yamamoto T, Tamura Y, Kobayashi J-I, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Miyazaki A et al. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 plays a role for in vivo tumor growth via intercellular communication. *Exp Cell Res* 2013; 319(17):2617–26.
201. Challita-Eid PM, Morrison K, Etessami S, An Z, Morrison KJ, Perez-Villar JJ et al. Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo. *Cancer Research* 2007; 67(12):5798–805.
202. Moreaux J, Kassambara A, Hose D, Klein B. STEAP1 is overexpressed in cancers: a promising therapeutic target. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 429(3-4):148–55.
203. Riederer BM. Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull* 2007; 71(6):541–58.
204. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 2):393–401.
205. Conti JA, Kendall TJ, Bateman A, Armstrong TA, Papa-Adams A, Xu Q et al. The Desmoplastic Reaction Surrounding Hepatic Colorectal Adenocarcinoma Metastases Aids Tumor Growth and Survival via  $\alpha$  Integrin Ligation. *Clin Cancer Res* 2008; 14(20):6405–13. Available from: URL: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clinres/14/20/6405.full.pdf>.
206. Conti J, Thomas G. The role of tumour stroma in colorectal cancer invasion and metastasis. *Cancers (Basel)* 2011; 3(2):2160–8.
207. FW K, TM S. Ein Hormon stellt sich vor: Osteopontin. *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel - Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 2(2):26–7. Available from: URL: <http://www.kup.at/kup/pdf/7932.pdf>.
208. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Yamada S et al. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Research* 1999; 59(17):4427–34.

209. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(3):279–303.
210. Uhlmann ME, Georges RB, Boleij A, Eyol E, Kubarenko A, Adwan H et al. Influence of osteopontin expression on the metastatic growth of CC531 rat colorectal carcinoma cells in rat liver. *Cancer Gene Ther* 2011; 18(11):795–805.
211. Zhao M, Liang F, Zhang B, Yan W, Zhang J. The impact of osteopontin on prognosis and clinicopathology of colorectal cancer patients: a systematic meta-analysis. *Sci Rep* 2015; 5:12713.
212. Offenberg H, Brunner N, Mansilla F, Orntoft Torben F, Birkenkamp-Demtroder K. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles. *Mol Oncol* 2008; 2(3):233–40.
213. Said AH, Raufman J-P, Xie G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2014; 6(1):366–75.
214. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson M-L. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20(3):245–52.
215. Ishida H, Murata N, Hayashi Y, Tada M, Hashimoto D. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in colorectal cancer patients. *Surg Today* 2003; 33(12):885–92.
216. Holten-Andersen MN, Hansen U, Brünner N, Nielsen HJ, Illemann M, Nielsen BS. Localization of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 2005; 113(2):198–206. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.20566/full>.
217. Yoshio T, Morita T, Kimura Y, Tsujii M, Hayashi N, Sobue K. Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett* 2007; 581(20):3777–82.
218. Ishigami K, Yoshimitsu K, Nishihara Y, Irie H, Asayama Y, Tajima T et al. Hepatocellular carcinoma with a pseudocapsule on gadolinium-enhanced MR images: correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2009; 250(2):435–43.

219. Nagao T, Inoue S, Goto S, Mizuta T, Omori Y, Kawano N et al. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma. Clinical features and long-term prognosis. *Ann Surg* 1987; 205(1):33–40.
220. Ng IO, Lai EC, Ng MM, Fan ST. Tumor encapsulation in hepatocellular carcinoma. A pathologic study of 189 cases. *Cancer* 1992; 70(1):45–9.
221. Franco D, Capussotti L, Smadja C, Bouzari H, Meakins J, Kemeny F et al. Resection of hepatocellular carcinomas. Results in 72 European patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1990; 98(3):733–8.
222. Choi J-Y, Lee J-M, Sirlin CB. CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: part I. Development, growth, and spread: key pathologic and imaging aspects. *Radiology* 2014; 272(3):635–54.
223. Bridle KR, Crawford DHG, Powell LW, Ramm GA. Role of myofibroblasts in tumour encapsulation of hepatocellular carcinoma in haemochromatosis. *Liver Int* 2001; 21(2):96–104.
224. Ooi LP, Crawford DH, Gotley DC, Clouston AD, Strong RW, Gobe GC et al. Evidence that "myofibroblast-like" cells are the cellular source of capsular collagen in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997; 26(4):798–807.
225. Ishizaki M, Ashida K, Higashi T, Nakatsukasa H, Kaneyoshi T, Fujiwara K et al. The formation of capsule and septum in human hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 2001; 438(6):574–80.
226. Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37(1):3–15.

## Danksagung

Mein uneingeschränkter Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Brunner für die Übernahme und Herrn Professor Fichtner-Feigl für die Überlassung dieser Dissertation. Ihnen möchte ich herzlich für die Betreuung, anregende Diskussionen und Unterstützung während der Arbeit an der Dissertation danken.

Den Mitarbeitern des chirurgischen Labors Rebecca Kesselring, Manuela Kovács, Maria Martins, Tatjana Schifferstein und Christoph Rubner danke ich sehr für ihre Hilfe bei Fragen und Problemen während der Durchführung der Experimente.

Im Besonderen danke ich meiner Familie für konstruktive Kritik, stetige Motivation und Unterstützung im Erreichen meiner Ziele.