

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Untersuchung von Cytokeratinprofilen und ihrer prognostischen Relevanz bei kolorektalen Karzinomen**

#### **Eine TMA Untersuchung an 2919 Gewebeproben**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Valeska Christina Emde  
aus Arolsen

Gutachter: 1. Prof. Dr. I. Petersen

2. Priv.-Doz. Dr. Dr. med. M. Beil

3. Prof. Dr. T. Ried

Datum der Promotion: 21.11.2008

Für meine Eltern Maria Emde und Dr. Erich Emde

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kolorektale Karzinome .....	1
1.1.1. Epidemiologie .....	1
1.1.2. Pathologie .....	2
1.1.3. Molekularpathologie .....	3
1.1.3.1. Sporadische kolorektale Karzinome .....	3
1.1.3.2. Hereditäre kolorektale Karzinome .....	6
1.1.4. Klinik und Diagnostik .....	7
1.1.5. Stadieneinteilung .....	8
1.1.6. Prognose .....	9
1.1.7. Therapie .....	11
1.1.7.1. Therapie des Kolonkarzinoms .....	11
1.1.7.2. Therapie des Rektumkarzinoms .....	11
1.1.7.3. Palliative Therapie .....	13
1.1.8. Nachsorge .....	14
1.1.9. Screening .....	15
1.2. Cytoskelett und Cytokeratine .....	16
1.2.1. Cytoskelett .....	16
1.2.2. Cytokeratine .....	19
1.2.2.1. Einteilung der Cytokeratine .....	19
1.2.2.2. Molekularer Aufbau .....	20
1.2.2.3. Verteilungsmuster .....	21
1.2.2.4. Cytokeratinexpression in normalen Gewebe .....	22
1.2.2.5. Cytokeratinexpression in Tumorgewebe .....	22
1.2.2.6. Nachweis von Cytokeratinen .....	23
1.3. Herleitung der Aufgabenstellung und Ziele .....	24
<b>2. Material</b> .....	<b>25</b>
2.1. Tumorkollektiv .....	25
2.1.1. Patientendaten .....	25
2.1.2. Tumordaten .....	25
2.2. Materialien für die Gewebeaufbereitung und Datenauswertung .....	26
2.2.1. Antikörper .....	26
2.2.2. TMA-Herstellung .....	26
2.2.3. Immunhistochemie .....	27
2.2.4. Software und Datenbank .....	27
<b>3. Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1. Gewebe-Array-Verfahren .....	28
3.2. Immunhistochemie .....	31
3.3. Cluster Analyse .....	34
3.4. Statistische Analyse .....	35
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
4.1. Pathologisch-anatomische Befunde .....	36
4.1.1. Probenkollektiv .....	36

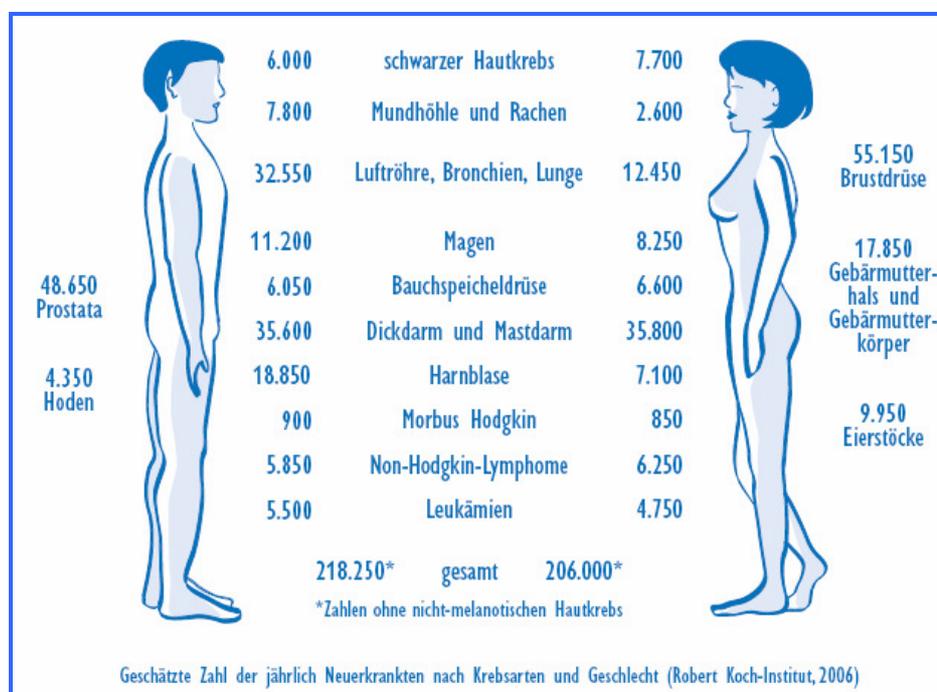
4.1.2. Patientenkollektiv .....	36
4.2. Immunhistochemie (IHC) .....	40
4.3. Hierarchische Clusteranalyse der IHC-Daten .....	46
4.4. Überlebensanalyse .....	48
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1. Methodik der Untersuchung .....	54
5.2. Cytokeratinstruktur und epithelial-mesenchymale Transformation .....	56
5.3. Cytokeratine als Markerproteine .....	58
5.3.1. CK20 .....	58
5.3.2. CK8/CK18 .....	58
5.3.3. CK14 .....	59
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>72</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Kolorektale Karzinome

#### 1.1.1. Epidemiologie

Unter den Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2006 war der Dick- und Mastdarmkrebs bei Männern mit 32.600 Neuerkrankungen auf Platz zwei hinter dem Prostatakarzinom von insgesamt 218.250 Neuerkrankungen. Bei Frauen befand er sich ebenfalls auf Platz zwei hinter dem Brustkrebs mit 35.800 von insgesamt 206.000 Neuerkrankungen und damit noch vor dem Lungenkrebs [Zahlen nach Robert-Koch-Institut Berlin, 2005] (Abbildung 1). Bei beiden Geschlechtern besteht ein Trend zu einer gesteigerten Inzidenz und Mortalität nach dem 50. Lebensjahr [Krebsregister Saarland].



**Abbildung 1:** Geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankten nach Krebsarten und Geschlecht (Geschäftsbericht Deutsche Krebshilfe, 2005)

In Deutschland ist der Dickdarmkrebs mit einem Anteil von 2,5% an sechster Stelle der zehn häufigsten Todesursachen [Statistisches Bundesamt Deutschland, 2005] (Tabelle 1). Insgesamt konnte die Mortalitätsrate aufgrund verbesserter Screeninguntersuchungen, Diagnostik und Therapie in den letzten Jahren gesenkt werden. In den USA sank in dem Zeitraum von 1993 bis 2002 die Todesrate für alle Krebsarten zusammengenommen um 1,8% pro Jahr für Männer und um 0,8% für Frauen. Die Mortalität sank insbesondere für Lungen-, Prostata-, Brust- und Dickdarmkrebs [Edwards et al., 2005; Jemal et al., 2006].

**Tabelle 1:** Zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland, 2005

Todesursache	Prozentualer Anteil
Chronisch ischämischen Herzkrankheiten	9,8%
akuten Myokardinfarkt	7,4%
Herzinsuffizienz	5,8%
Neoplasien der Lunge und der Bronchien	4,9%
Schlaganfällen	3,6%
Neoplasien des Dickdarms	2,5%
Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	2,5%
Pneumonie	2,3%
Neoplasien der Brustdrüse	2,1%
Diabetes mellitus	2,0%

Als primärer Risikofaktor für das CRC gilt in erster Linie die genetische Prädisposition. Zwei genetische Syndrome, die als Risikofaktoren gelten, sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nonpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Das HNPCC macht dabei ca. 5-15 % aller CRC aus [Park, Kim, 2005]. Weitere Faktoren sind ballaststoffarme sowie fett- und fleischreiche Ernährung, vorausgegangene Polypen, die chronisch ulzerative Colitis [Brentnall et al., 1996], Diabetes mellitus [La Vecchia et al., 1997], Alkoholabusus [Longnecker, 1990], Zigarettenkonsum [Colangelo et al., 2004] und vorausgegangene Krebserkrankungen.

Als protektive Faktoren gelten Sport [Colbert et al., 2001; Colditz et al., 1997], die regelmäßige Einnahme von nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) insbesondere Acetylsalicylsäure (ASS) [Giovannucci et al., 1995; Heath et al., 1994], postmenopausale Hormontherapie [Grodstein et al., 1999] und ein hoher Anteil an Früchten und Gemüse in der Nahrung [Slattery et al., 1997 und 1998; Jarvinen et al., 2001].

### 1.1.2. Pathologie

Die Hauptlokalisation des Dickdarmkarzinoms liegt im Rektum mit ca. 50%, gefolgt vom Sigma mit ca. 25%. Die verbleibenden 25% verteilen sich auf die restlichen Dickdarmabschnitte [Bockelmann et al., 1972]. Präkanzeröse Vorläuferläsionen sind polypöse Adenome, flache nicht-polypöse Adenome und gezahnte nicht-polypöse Adenome, so genannte „serrated adenomas“ [Jass, 2005].

Makroskopisch lassen sich die CRC in drei Formen einteilen. Der häufigste Typ ist der schüsselförmig-exulzerierte Typ mit zentraler Ulzeration, auch Ringwallkarzinom genannt, der sich in einen polypösen-exophytischen Typ umwandeln kann. Letztere ist

der zweithäufigste Typ und wächst blumenkohlartig mit scharfer Begrenzung zum umliegenden gesunden Gewebe. Der dritte Typ ist selten und wächst diffus-infiltrativ mit geringer Differenzierung.

Histologisch werden die Karzinomtypen nach der WHO-Klassifikation (Hamilton, Altonen, 2000) eingeteilt in konventionelle Adenokarzinome mit einem Anteil von 85-90% sowie muzinöse Adenokarzinome (5-10%), auch Gallertkarzinom genannt. Diese kennzeichnet, dass mindestens 50% der Tumormasse aus Schleim/Muzin besteht. Seltene Karzinome, die unter 1% der CRC sind: Plattenepithelkarzinome, diagnostizierbar anhand von Interzellularbrücken und Keratohyalin granula, adenosquamöse Karzinome und kleinzellig-neuroendokrine Karzinome. Als undifferenzierte Karzinome werden alle Karzinome bezeichnet, die mit ihrem Zellbild keinem der oben definierten Typen zuzuordnen sind [Hamilton et al., 2000]. Eine weitere Einteilung erfolgt nach dem so genannten „Grading“ (G1 gut differenziert, G2 mäßig differenziert, G3 schlecht differenziert, G4 undifferenziert) [Wittekind et al., 2002]

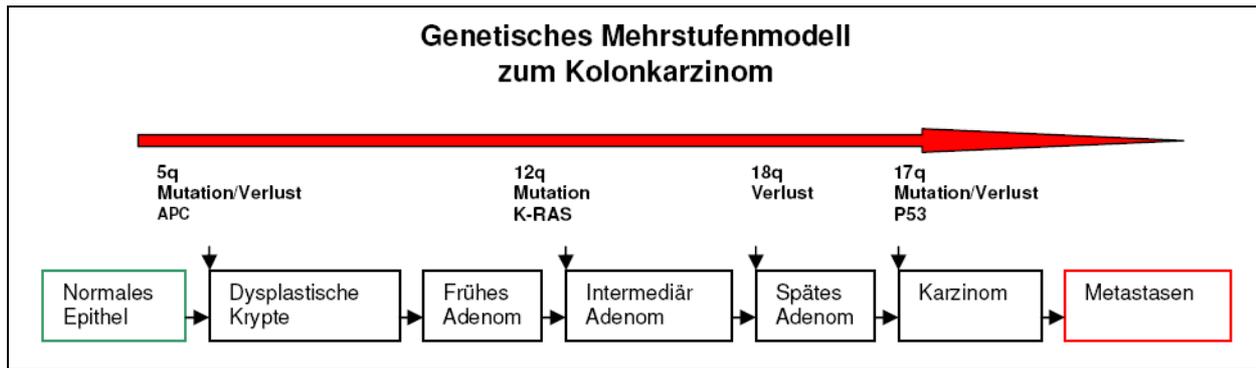
### **1.1.3. Molekularpathologie**

#### **1.1.3.1. Sporadische kolorektale Karzinome**

Neunzig Prozent aller CRC sind sporadisch bedingt und lassen sich nicht auf eine genetische Prädisposition wie bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Krebsyndrom (HNPCC-Syndrom) oder familiärer Häufung von Adenomen oder kolorektalen Karzinomen zurückführen [Abdel-Rahman, 2004; Laken 1997].

Eine der ersten Erkenntnisse der Karzinomentstehung im Dickdarm, war der Zusammenhang zwischen Adenomen und Karzinomen, wobei Adenome als Vorläufer für eine maligne Entartung dienen (Adenom-Karzinom-Sequenz).

Weitere Studien zeigten, dass die Akkumulation von genetischen Veränderungen notwendig sind, um eine Entwicklung von einer intakten Kolonschleimhaut hin zum invasiven Karzinom zu ermöglichen [Fearon, Vogelstein, 1990]. Bei diesem Progressionsmodell handelt sich um ein eher historisches Modell, da darin nur ein kleiner Teil der mittlerweile bekannten genetischen Veränderungen beim kolorektalen Karzinom dargestellt sind. Es beschreibt eine molekularpathologische Abfolge von genetischen Ereignissen, bei denen Tumorsuppressorgene ausgeschaltet werden und Onkogene wiederum aktiviert werden (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Verlauf der Tumorphprogression des Kolonkarzinoms modifiziert nach Fearon und Vogelstein 1990

Als ein frühes Ereignis der Umwandlung zum Karzinom soll der Funktionsverlust des APC-Gens stehen [Laken 1997; Kinzler et al., 1991]. APC bindet und inhibiert das Signaltransduktionsmolekül  $\beta$ -Catenin. Dieses dient dazu, im Zellkern den T-Zell-Transkriptionsfaktor Tcf zu aktivieren. APC bindet zusätzlich an die cytoplasmatische Seite von E-Cadherin und garantiert so den Zellzusammenhalt. Über eine Bindung an Mikrotubuli sorgt es dafür, dass die Zellen vom Proliferationspool in den Differenzierungs- und Absterbepool gelangen. Eine Mutation im APC-Gen führt zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, welches der erste Schritt zur Gewebsinvasion und Metastasierung ist und weiterhin zur Enthemmung der Zellproliferation führt. Als Folge kommt es zu einer epithelialen Hyperproliferation [Su et al., 1992].

Der Verlust von Methylgruppen (DNA-Hypomethylierung) ist ein weiteres Ereignis in der Karzinomentstehung. Dieser führt über Hemmung der Chromosomenkondensation zu ihrer Instabilität, zum Funktionsverlust und zu einer Hyperproliferation, die zu einem frühen Adenom führen kann bzw. zur malignen Transformation [Fearon, 1990].

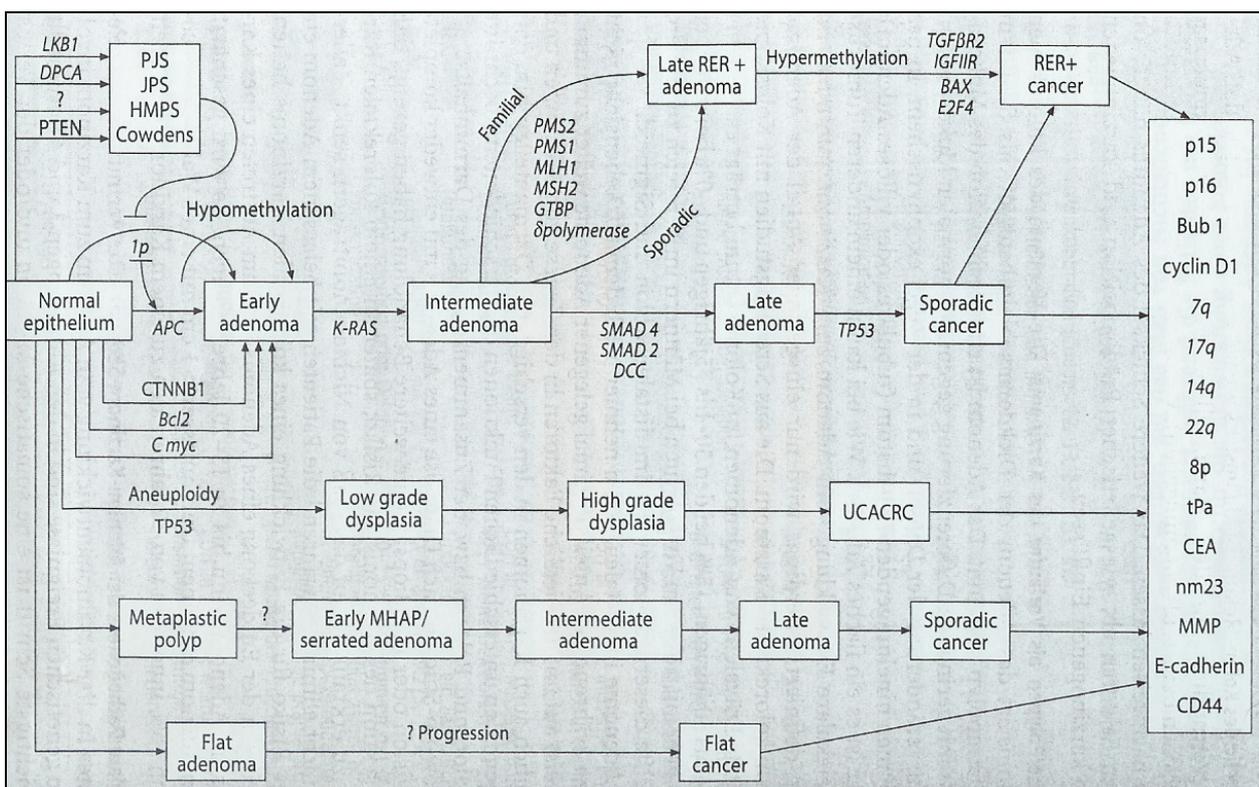
Bei 40-50% der CRC wurde zudem K-RAS Mutationen nachgewiesen [Wang et al., 2006]. Mutationen in RAS-Genen bewirken eine Hemmung des Abschaltmechanismus in der Zellaktivierung auf Grund einer schlechteren, bzw. verzögerten Abspaltung des gebundenen GTP. RAS-Proteine liegen an der Zellmembran und sind für den Signalweg in den Zellkern zuständig.

Eine wichtige Veränderung bei der Progression des kolorektalen Karzinoms betrifft das p53 Gen. Das Protein p53 steigt bei Zellschäden beispielsweise durch UV-Strahlen an [Dregoes et al., 2006]. Dieses Protein fungiert als Transkriptionsfaktor für weitere Gene (CDK-Inhibitor p21; Gene für DNA-Reparaturenzyme u. a.) und kontrolliert damit die DNA-Reparatur und den Zellzyklus. Der Verlust von p53 bedeutet somit ein Verlust

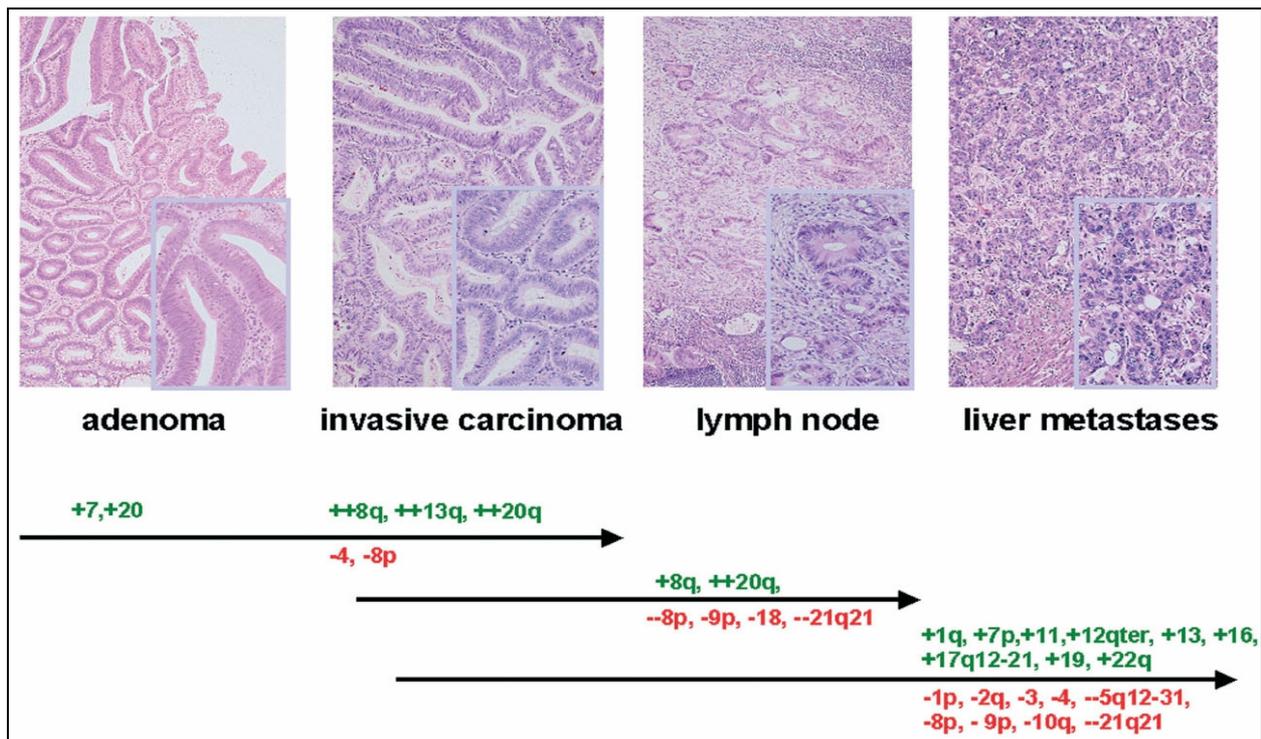
von Reparaturmechanismen und initiiert damit die kontrollierte Apoptose. Zusammenfassend ist für die Tumorprogression insgesamt weniger die Reihenfolge, als vielmehr die Anhäufung der Mutationen wichtig.

Ein neueres genetisches Modell, das die derzeitigen Forschungsergebnisse der Entstehung des kolorektalen Karzinoms zusammenfasst zeigt Abbildung 3.

Neben den Veränderungen in der Adenom-Karzinom-Sequenz werden auch Läsionen aufgeführt, die mit unterschiedlichen morphologischen Typen von Adenomen und Dysplasien verbunden sind. Insbesondere ist auch Aneuploidie als eine wichtige und häufige Mutationsform genetischer Veränderungen genannt. Kürzlich wurde auch basierend auf Analysen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) ein Progressions-Modell aufgestellt, dass einzelne chromosomale Veränderungen mit spezifischen Stadien der Tumorprogression assoziiert (Abbildung 4). In dem stärker auf einzelne Gene ausgerichteten Schema der Abbildung 3 sind auch Gene genannt, die mit hereditären kolorektalen Karzinomen assoziiert sind.



**Abbildung 3:** Genetisches Modell zur Entstehung des CRC [Ilyas et al., 1999; aus Schmoll, Höffken, Possinger, 2006]



**Abbildung 4:** Chromosomales Progressionsmodell des kolorektalen Karzinoms [Knösel et al., 2004]

### 1.1.3.2. Hereditäre kolorektale Karzinome

Die FAP wird autosomal dominant vererbt und geht mit der Entwicklung von multiplen adenomatösen Polypen einher. Kinzler et al. zeigte 1991, dass eine Keimzellmutation des APC-Gens auf Chromosom 5q21 vorliegt. Das Lebenszeitrisiko dieser Patienten an einem CRC zu erkranken liegt bei ca. 80% [Chung, Rustgi, 2003]

Das HNPCC-Syndrom (Hereditäre nonpolypöse kolorektale Karzinome) oder auch Warthin-Lynch-Syndrom genannt, zeichnet sich durch ein bevorzugt rechtsseitiges CRC vor dem 50. Lebensjahr ohne vorangegangene Polyposis aus. Bekannt sind bislang Mutationen in sechs „DNA-Mismatch“-Reparatur-Genen, die zu den „Caretaker-Genen“ gehören: MHL1, MHS6, MSH2 [Caldes et al., 2004], PMS1, PMS2, MLH3 [Lipkin et al., 2001]. Spontane DNA-Replikationsfehler werden nicht genau korrigiert, was zu einer Anhäufung genetischer Mutationen führt.

Die Karzinome weisen damit eine erhöhte genetische Instabilität auf. Es gibt drei Formen der genetischen Instabilität CIN (chromosomale Instabilität), MIN (Mikrosatelliten-Instabilität) und chromosomale Translokation. MIN tritt bei ca. 15% der CRC auf und ist das Ergebnis von Mutationen der „DNA-Mismatch“-Reparatur-Gene oder der Hypermethylierung von Promotoren des MLH1-Gens [Grady, 2004]. Diese Mikrosatelliteninstabilität weist eine günstigere Prognose auf und metastasiert weniger

häufig als mikrosatellitenstabile Tumore [Ueda et al., 2001]. CIN kennzeichnet numerische und chromosomale Alterationen. Diese entstehen durch eine Deregulierung der DNA-Replikations- und der Mitosespindel-Kontrollpunkte. Bei der Mehrheit kolorektaler Karzinome kann eine chromosomale Instabilität nachgewiesen werden sowie bei einer Reihe von Syndromen, die mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen: Ataxia-Telangiectasia, Bloom-Syndrom und die Fanconi Anämie [Charames, Babat, 2003].

#### **1.1.4. Klinik und Diagnostik**

Die Klinik des CRC ist sehr unspezifisch. An erster Stelle steht eine Tumoranämie, die zu allgemeinen Anämiezeichen wie Leistungsabfall, Müdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten führt. Die weitere Klinik hängt von der Tumorlokalisierung sowie von dessen Ausdehnung ab [Speights et al., 1991]. Weiterhin kommen Gewichtsverlust, Änderungen der Stuhlgewohnheiten, wie Flatulenz, Obstipation und intermittierende Diarrhöen sowie Schmerzen bei Patienten mit CRC vor. Blutauflagerungen im Stuhl findet sich am häufigsten bei Lokalisation im Rektum [Ruf et al., 2005].

Die Diagnostik des CRC umfasst apparative und laborchemische Untersuchungen. Die Primäruntersuchung erfolgt digital-rektal. Sie erlaubt eine orientierende Beurteilung der Sphinkterfunktion sowie der Tiefeninfiltration bei tief sitzenden Rektumkarzinomen. Zum direkten Tumornachweis eignet sich als Goldstandard die komplette Koloskopie mit Biopsie zur Sicherung der Lokalisation und Gewebedifferenzierung. Erst bei unvollständiger Koloskopie ist die Doppelkontrastuntersuchung des Kolons indiziert. Sie kann jedoch die Koloskopie nicht ersetzen.

Weitere obligate apparative Untersuchungen sind die Abdomensonographie zur Metastasensuche und Aszitesausschluss, Röntgen-Thorax in zwei Ebenen und Bestimmung der Tumormarker CEA und CA19-9. Ergänzende Untersuchungen bei differenzierteren Fragestellungen sind die transrektale Sonographie sowie die Computertomographie. Die Zystoskopie und die gynäkologische Untersuchung werden bei Verdacht auf Infiltration der umgebenden Organe eingesetzt.

Bei der Metastasensuche kommt neben Sonographie und dem CT ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen zum Einsatz. Ein Spiral- oder Mehrzeilen-Abdomen-CT ist routinemäßig

nur bei unklarem oder pathologischem Befund in der Abdomensonographie, das Spiral-CT des Thorax nur zur Abklärung von Lungenmetastasen indiziert [Schlag et al., 2006].

Als postoperativer Verlaufsparemeter eignet sich das Serum-CEA (carcino-embryonal-antigen) und CA19-9, da diese postoperativ abfallen und bei einem Rezidiv wieder ansteigen [Carpelan-Holmstrom et al., 2004]. Weiterhin eignen sich Serum CEA und CA19-9 als prognostischer Marker in Bezug auf das postoperative Überleben. Präoperativ erhöhte Serum-Marker sind nach einer Studie von Louhimo et al. aus dem Jahre 2002 signifikant mit einem schlechteren Überleben korreliert.

### 1.1.5. Stadieneinteilung

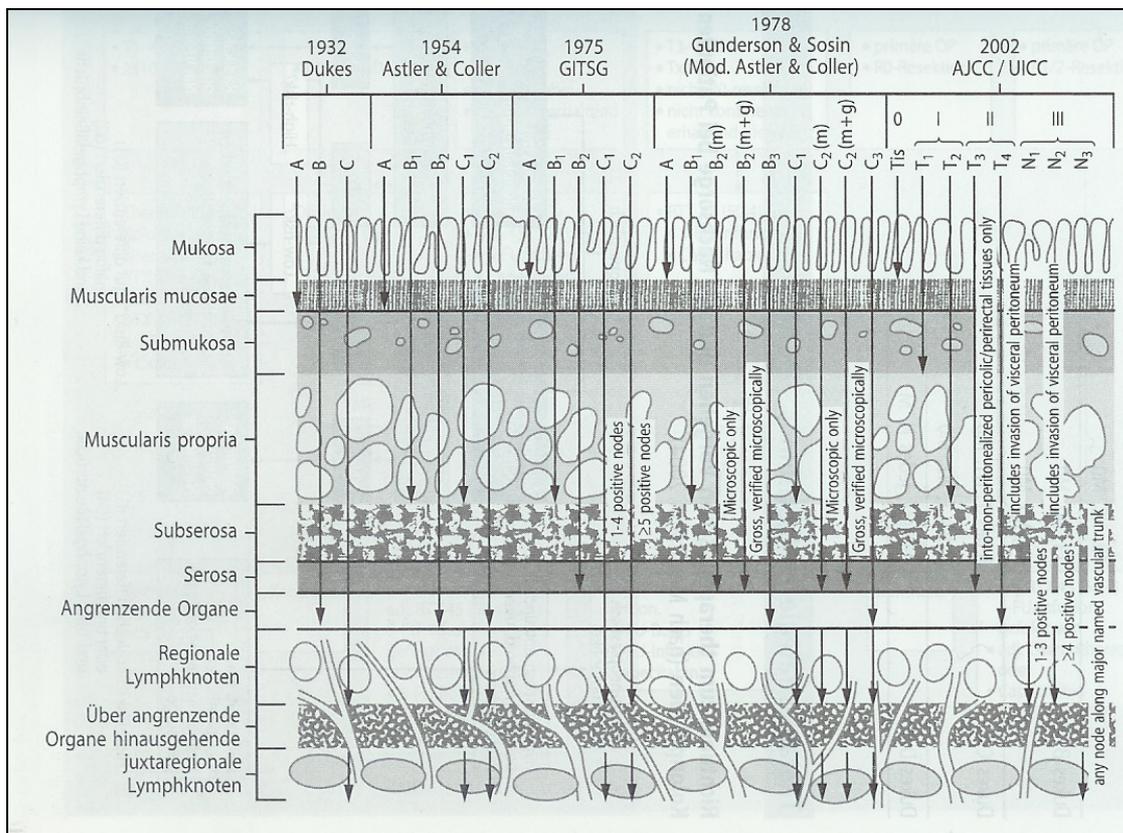
Das Wachstumsverhalten und die Metastasierung werden histopathologisch durch die pTNM-Stadien (Tabelle 2) und Dukes-Stadien beurteilt. Der Vorteil der TNM-Klassifikation, die 1997 durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC) neu festgelegt wurde, gegenüber der von Dukes besteht darin, dass sie differenziert die Infiltrationstiefe des Tumors, den Befall der regionalen Lymphknoten sowie Fernmetastasen berücksichtigt. Demgegenüber erfolgt bei Duke eine Reduktion auf ursprünglich 3, mittlerweile 4 festgelegte Kategorien, die eine differenzierte Beurteilung erschweren (Tabelle 3, Abbildung 5). Sie ist jedoch gerade wegen ihrer Reduktion auf wenige Stadien in der Praxis weit verbreitet.

**Tabelle 2:** TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms [nach Wittekind, Meyer, Bootz, TNM 6. Auflage; Springer Verlag, 2002]

<b>T Primärtumor</b>	
<b>TX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar
<b>T0</b>	keinen Anhalt für einen Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor infiltriert die Submukosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nicht peritonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe
<b>T4</b>	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe
<b>N Regionale Lymphknoten</b>	
<b>NX</b>	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 parakolischen bzw. pararektalen Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr parakolischen bzw. pararektalen Lymphknoten
<b>M Fernmetastasen</b>	
<b>MX</b>	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

**Tabelle 3:** Gegenüberstellung UICC/AJCC, TNM und Duker Klassifikation

UICC/AJCC	TNM	Dukes
Stadium 0	Tis, N0, M0	
Stadium 1	T1/2, N0, M0	Dukes A
Stadium 2		
Stadium 2A	T3, N0, M0	Dukes B
Stadium 2B	T4, N0, M0	
Stadium 3		
Stadium 3A	T1/2, N1, M0	Dukes C
Stadium 3B	T3/4, N1, M0	
Stadium 3C	Jedes T, N2, M0	
Stadium 4	Jedes T, Jedes N, M1	Dukes D



**Abbildung 5:** Zeitlicher Verlauf der Klassifikation des CRC und deren Unterschiede [Schmoll, Höffken, Possinger, 2006]

**1.1.6. Prognose**

Der beste Indikator für die Langzeitprognose bleibt das histopathologische Staging der pTNM-Klassifikation nach vollständiger Resektion des Tumors zum Diagnosezeitpunkt. Dabei spielen Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall, Zahl der befallenen Lymphknoten, das Vorhandensein von Fernmetastasen und der Resektionsstatus eine entscheidende Rolle. Dabei ist die 5-Jahres-Überlebensrate für das Rektumkarzinom nach dem UICC/AJCC Staging der sechsten Edition [O`Connell, 2004] schlechter, als

für das Kolonkarzinom (Tabelle 4 und 5). Prognostisch besonders ungünstig ist eine Infiltration in das Gefäßsystem sowie ein präoperativer Serumspiegel  $\geq 5$  ng/ml [Slentz, 1994].

**Tabelle 4:** UICC/AJCC Staging, TNM-Status des Rektumkarzinoms und 5-Jahres Überlebensrate

<b>Stage I</b>	T1-2, N0	71,5%
<b>Stage II</b>	T3-4, N0	52,4%
<b>Stage III</b>	Jedes T, N1-2	36,9%
<b>Stage IV</b>	Jedes T, N, M1	3,6%

**Tabelle 5:** UICC/AJCC Staging, TNM-Status und 5-Jahres Überlebensrate des Kolonkarzinoms

<b>Stage I</b>	T1-2, N0	93,2%
<b>Stage IIA</b>	T3, N0	84,7%
<b>Stage IIB</b>	T4, N0	72,2%
<b>Stage IIIA</b>	T1-2, N1	83,4%
<b>Stage IIIB</b>	T3-4, N1	64,1%
<b>Stage IIIC</b>	N2	44,3%
<b>Stage IV</b>		8,1%

Außer den gesicherten prognostischen Markern, wie dem pTNM-Status, der Gefäßinfiltration und dem Serum-CEA, gibt es weitere Marker wie zum Beispiel chromosomale Deletionen wie 18q, 1p36.1-36.2 und 4q35 als auch Gewinne auf 2q14-15, 15q22-23, 22q11.2, die als unabhängige prognostische Marker mit einem kürzeren Überleben des Patienten korrelierten. Diese fünf Marker erlauben eine Kategorisierung der Patienten in eine „low risk“ und eine „high risk“ Gruppe und können so im Rahmen einer „personalisierten Medizin“ als Einleitung einer spezifischen Therapieoption eine wichtige Rolle spielen [Knösel et al., 2003]. Als weitere mögliche prognostische Faktoren gelten Chromosomen Aneuploidie, molekulare Marker wie Tumorsuppressorgene (LOH 1p, LOH 8p, LOH 5q, LOH 17q), Onkogene (K-ras, c-myc) [Cerottini et al., 1998], Apoptosegene (bcl-2, BAX), Oberflächenmoleküle, Tumorangiogenese [Sternfeld et al., 1999] und die Proliferationsneigung des Tumors. Da noch keine prospektiven Studienergebnisse vorliegen, sind sie als unabhängige Biomarker bisher ohne klinische Relevanz.

Eine vom Patienten unabhängige Einflussgröße ist der Chirurg mit seiner jeweiligen Technik, der sowohl für ein Rezidiv, die postoperative Mortalität, wie auch für das 5-Jahres-Überlebensrate von Bedeutung ist [Hermanek et al., 2000].

### **1.1.7. Therapie**

Die Therapie gliedert sich in eine kurative, neoadjuvante, adjuvante und palliative Intervention. Ziel der kurativen Therapie ist beim Rektum-, wie auch beim Kolonkarzinom die Resektion des Tumors in toto, das heißt es wird eine R0-Resektion angestrebt. Um eine intraoperative Tumorzellverschleppung zu vermeiden, verwendet man eine „no-touch“ Technik mit genügendem Sicherheitsabstand nach oral und aboral und zur zirkumferentiellen Weichteilabtragungsebene.

#### **1.1.7.1. Therapie des Kolonkarzinoms**

Eine rechtsseitige Hemikolektomie erfolgt bei Befall des Coecums und des Kolon ascendens, eine linksseitige bei Befall des Kolon descendens. Jeweils erfolgt die Mitentfernung des Mesenteriums, des regionalen Lymphabflussgebietes und die Unterbindung der jeweiligen mesenterialen Gefäße. Bei Beteiligung des Kolon transversum erfolgt eine Kolon-Transversum-Resektion, je nach Lokalisation unter weiterer Resektion der jeweilig betroffenen Flexur oder eine erweiterte Hemikolektomie. Bei Karzinomen im mittleren und distalen Sigma erfolgt eine radikale erweiterte Sigmaresektion. Das Ausmaß der Darmresektion ist dabei von dem befallenen Lymphabflussgebiet abhängig [Schlag et al., 2006].

Für das UICC/AJCC Stadium I oder nach R0-Resektion besteht keine Indikation für eine postoperative adjuvante Chemotherapie. Diese besteht hingegen für das UICC/AJCC Stadium II und III nach R0-Resektion. Dabei ist das FOLFOX-Regime (5-FU, Folinsäure und Oxaplatin) derzeit die effektivste, aber auch die nebenwirkungsreichste adjuvante Therapie [Schlag et al., 2006].

#### **1.1.7.2. Therapie des Rektumkarzinoms**

Rektumkarzinome sind definiert als Tumore, deren aboraler Rand nach Messung mit einem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt sind. Rektumkarzinome werden nach ihrem Abstand von der Anokutanlinie in Karzinome des oberen Rektumdrittels 16-12 cm, des mittleren Rektumdrittels (6-12 cm) und des unteren Rektumdrittels (0-6 cm) unterteilt.

Die kurative Therapie des Rektumkarzinoms erfordert neben einer vollständigen Resektion des tumortragenden Rektums eine En-bloc-Entfernung des Mesorektums inklusive des regionalen Lymphabflussgebietes.

Beim Rektumkarzinom existieren je nach Lokalisation und Grading unterschiedliche Operationsmethoden. Die anteriore sphinkterkontinenzershaltene Rektumresektion, die abdomino-perineale Rektumexstirpation und die intersphinktäre Rektumresektion. Eine partielle Entfernung des Mesorektums erfolgt bei Tumoren im oberen Drittel, eine komplette, inklusive des regionären Lymphabflussgebiets bei Karzinomen der mittleren und unteren zwei Rektumdrittel unter Schonung der autonomen Nerven (Plexus hypogastricus superior, Nn. hypogastrici und Plexus hypogastrici inferiores). Zusätzlich kommen die Absetzung der A. mesenterica inferior und eine En-bloc-Resektion bei tumoradhärenten Organen hinzu.

Die Grenze des aboralen Sicherheitsabstandes liegt bei 5 cm, jenseits davon sind keine Satellitenmetastasen zu erwarten. Die transanale Lokalexzision (Vollwandexzision) kommt nur bei Low-Grade-T1-Karzinomen zum Tragen, bei denen keine Lymphgefäßinvasion vorliegt. Bei Karzinomen im unteren Drittel, die keinen distalen freien Tumorrand haben, wird eine abdominoperineale Rektumexstirpation mit Anlage eines endständigen Anus praeter sigmoidalis (Kolostoma) durchgeführt [Schlag et al., 2006; Schmiegel et al., 2004].

Im klinischen Stadium II und III und bei T4-Tumoren kann eine neoadjuvante Therapie durch präoperative Radio-Chemotherapie eine vollständige Resektion ermöglichen und Lokalrezidive reduzieren [Sauer, 2003]. Dabei wird die Radiotherapie konventionell fraktioniert 5x pro Woche bis zur Gesamtdosis von 50,4 Gy mit simultanen 5-FU basierten Chemotherapiezyklen durchgeführt. Anschließend erfolgt in UICC Stadium II und III postoperativ zusätzlich eine Chemotherapie.

Bei primär operierten Patienten des UICC-Stadiums II und III oder nach R1- Resektion wird postoperativ eine Radiochemotherapie begonnen. Diese setzt sich aus einer Bestrahlung der betroffenen Regionen mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy 5x pro Woche, bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy und paralleler 5-FU-Dauerinfusion zusammen. Nach Beendigung der Radiochemotherapie folgt 5x pro Woche eine 5-FU-Bolus Infusion alle vier Wochen für vier Zyklen als adjuvante Chemotherapie [Schlag et al., 2006].

### 1.1.7.3. Palliative Therapie

Für die palliative Therapie stehen verschiedene Therapieverfahren zur Verfügung, die individuell gewählt und dem jeweiligen Gesundheitszustand des Patienten angepasst werden. Indikation für eine palliative Therapie sind Tumorprogression und tumorbedingte Symptome. Allen gemeinsam ist, dass eine suffiziente Schmerztherapie Bestandteil sein sollte. Die Wahl besteht zwischen chirurgischen, chemotherapeutischen, medikamentösen, strahlentherapeutischen und endoskopischen Interventionen.

Für inoperable Kolonkarzinome stehen zur Wiederherstellung der Darmpassage Umgehungsanastomosen und ein Anus praeter zur Verfügung. Beim Rektumkarzinom kommen Kryo-, Laser- und Elektrotherapie, sowie transanale endoskopische Operationen zum Einsatz. Bei fraglicher Inoperabilität sollte jedoch die Resektion von Primärtumor und Metastasen angestrebt werden; zum einen, um Komplikationen wie Stenosen, Blutungen oder Tumoreinbruch vorzubeugen, zum anderen, um durch vollständige Resektion von Metastasen eine Heilung zu erzielen. Weiterhin kann nach erfolgreicher systemischer Chemotherapie die Resektabilität von Metastasen verbessert werden, so dass die Operationsindikation erneut zu überprüfen ist [Schlag et al., 2006].

Bei multiplen, diffusen sowie inoperablen Metastasen sollte aufgrund des besseren Ansprechens eine Chemotherapie angesetzt werden. Grundsätzlich ist hier der Kombinationstherapie mit 5-FU/Folinsäure + Oxaliplatin oder Irinotecan der Vorzug vor der Monotherapie zu geben. Durch die Kombinationschemotherapie kann eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von >17 Monaten erreicht werden [Douillard. et al., 2000].

Folgende first-line Therapieschemata stehen derzeit zur Verfügung:

**Tabelle 6:** Derzeitige first-line Therapieschemata bei multiplen, diffusen, inoperablen Metastasen beim Rektumkarzinom [AWMF Leitlinien, 2004]

- 5-FU/Folinsäure nach Mayo-, Machover- oder AIO-Protokoll
- Capecitabine Monotherapie
- 5-FU/Folinsäure (De Gramont-Schema)
- Irinotecan + 5-FU/Folinsäure nach FOLFIRI-Protokoll
- Oxaliplatin+ 5-FU/Folinsäure nach FOLFOX-Protokoll

Allgemein sollte die palliative Chemotherapie bis zum Nachweis der Tumorprogression fortgeführt werden. In klinischer Erprobung sind derzeit monoklonale Antikörper wie

Bevacizumab, einem Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor), der in Studien begleitend zum FOLFIRI-Protokoll verabreicht wird und Cetuximab, ein EGFR-Antikörper (epidermal growth receptor), der die in erster Linie begleitend zu Irinotecan eingesetzt wird [Schlag et al., 2006].

**1.1.8. Nachsorge**

In 10-30% der Fälle treten trotz kurativer Resektion Lokalrezidive, am häufigsten (>80%) in den ersten zwei postoperativen Jahren auf [Eckardt, Bernhard, 1997]. Die genaue Anamneseerhebung und die körperliche Untersuchung sind immer ein fester Bestandteil der Nachsorge. Nachuntersuchungen wie Kontrolle des Serum-CEA, Koloskopie, Sonographie des Abdomens, Röntgen-Thorax und Spiral-CT des Beckens hängen vom Tumorstadium ab und erfolgen in regelmäßigen Abständen [Schlag et al., 2006].

**Tabelle 7:** Nachsorgeempfehlung bei Patienten mit Kolonkarzinom UICC-Stadium II und III [modifiziert nach AWMF Leitlinien Kolorektales Karzinom, 2004].

Untersuchung	Monate										
	3	6	9	12	15	18	21	24	36	48	60
Anamnese, körperliche Untersuchung, CEA		+		+		+		+	+	+	+
Koloskopie		+							+		
Sigmoidoskopie (Rektoskopie)		+		+		+		+			
Abdomensonographie		+		+		+		+	+	+	+
Spiralcomputertomographie	+										

**Tabelle 8:** Nachsorgeempfehlung bei Patienten mit Rektumkarzinom\* [Hermanek et al., 1999]

Untersuchung	Monate						
	6	12	18	24	36	48	60
Anamnese, körperliche Untersuchung, CEA	+	+	+	++	+	+	++
Abdomen-Sonographie	+	+	+	+	+	+	+
Rektoskopie o. Sigmoidoskopie, evtl. Endosonographie	+	+	+		+	+	
Koloskopie				++			++
Computertomographie (Becken)	3 Monate nach Abschluss der tumorspezifischen Therapie (Operation bzw. adjuvanter Strahlen/ Chemotherapie)						

\* UICC-Stadium I (Rot), II + III (schwarz)

### 1.1.9. Screening

Für das Screening der asymptomatischen Bevölkerung wird ein Beginn ab dem 50. Lebensjahr empfohlen, soweit keine anderen Risikofaktoren vorliegen. Als Goldstandard umfasst dies die Koloskopie und die digital-rektale Untersuchung. Wiederholt wird die Koloskopie bei unauffälligem Befund alle 10 Jahre. Für Patienten, die eine Koloskopie ablehnen, steht die Sigmoidoskopie alle 5 Jahre, in Kombination mit dem Guajak-Test nach Greegor (Haemoccult®) mit jährlicher Kontrolle, zur Verfügung. Falls jegliche endoskopische Diagnostik abgelehnt wird, sollte der Guajak-Test jährlich erfolgen.

Als Risikogruppe für sporadische kolorektale Karzinome werden Personen definiert, die Verwandte 1. Grades von Indexpatienten mit CRC, kolorektalen Adenomen unter dem 50. Lebensjahr oder multiplen (>3) bzw. großen Adenomen (>1 cm) sind. Die erste Koloskopie sollte bei Risikopersonen 10 Jahre vor dem Erkrankungszeitpunkt des Indexpatienten erfolgen, bei dem das CRC bzw. die Adenome nachgewiesen wurden.

Risikopersonen für hereditäre kolorektale Karzinome, wie z.B. HNPCC-Patienten, sollten ab dem 25. Lebensjahr jährlich koloskopiert werden. Bei FAP erfolgt die erste Koloskopie mit dem zehnten Lebensjahr jährlich, bis zur Proktokolektomie [AWMF Leitlinien kolorektales Karzinom, 2004].

## 1.2. Cytoskelett und Cytokeratine

### 1.2.1. Cytoskelett

Alle eukaryoten Zellen verfügen über ein gut strukturiertes und dynamisches Cytoskelett. Dieses besteht aus einem Netzwerk von Protofilamenten und umfasst drei Hauptbestandteilen: 1. Mikrotubuli, 2. Mikrofilamente (Aktinfilamente) und 3. Intermediärfilamente (Tabelle 9). Diese Strukturen sind mitverantwortlich für die Zellteilung, die Form der Zelle, die Zellmotilität und die Zellpolarität. Zusätzlich gibt es noch eine Reihe anderer Proteine, die mit den Proteinfilamenten assoziiert sind [Welsch, 2006].

**Tabelle 9:** Bestandteile des Cytoskeletts der eukaryoten Zellen

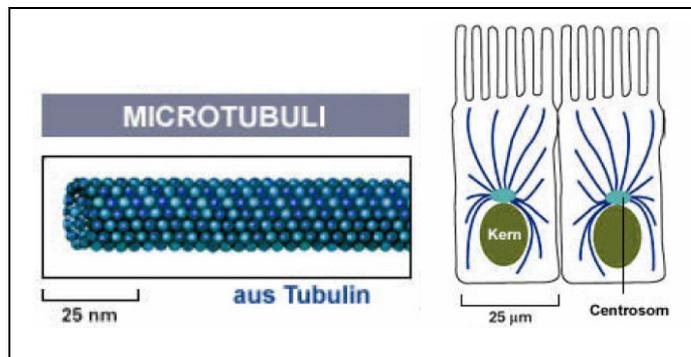
Bestandteile des Cytoskeletts	Größe	Vorkommen	Funktion
<b>Mikrotubuli</b>	Durchmesser: 24 nm Wanddicke: 5 nm Länge: bis 25 µm	Alle kernhaltige Zellen Zentriolen Geißeln Zilien	Stützfunktion Gestaltgebung Intrazellulärer Transport
<b>Mikrofilamente</b>	Dicke: 5-7 nm Durchmesser: 36 nm Länge: 1 µm	Jede Zelle	Mitose Zellkontraktion Stabilisierung der Zellmembran
<b>Intermediärfilamente</b>	Durchmesser: 8-10 nm Länge: mehrere µm	Zellen mit mechanischer Beanspruchung	Siehe Tabelle 11

**Mikrotubuli** kommen in allen kernhaltigen Zellen vor und sind zylinderförmig aufgebaut. Ihre Form erhalten sie durch die Zusammenlagerung von 13 Protofilamenten, die aus alpha- und beta-Tubulin bestehen. Der Zusammenbau dieser Untereinheiten erfolgt spontan, kann aber durch hohe Temperaturen beschleunigt werden. Ihr Durchmesser beträgt 24 nm, mit einer Wanddicke von 5 nm. Die Länge der Mikrotubuli ist variabel, so kann in Axonen bis zu 25 µm betragen.

Da Mikrotubuli polare Strukturen sind, besitzen sie ein Plus- und ein Minusende. Innerhalb der Zelle orientieren sie sich mit ihrem Plusende zur Außenmembran, mit ihrem Minusende zum Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC). Vom MTOC aus können wieder neue Mikrotubuli entstehen.

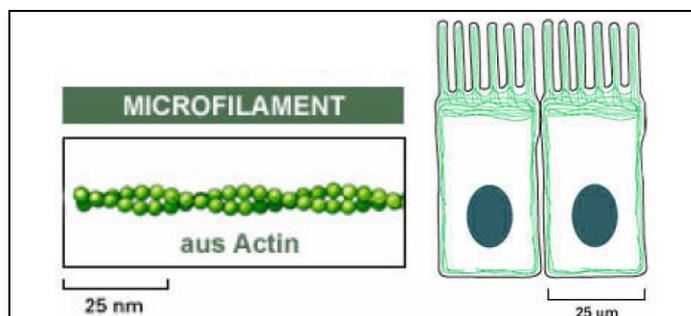
Ihre Funktion besteht in eukaryoten Zellen vornehmlich in der Bildung der Mitosespindel. Weiterhin dienen sie der Bewegung und dem Transport von Organellen, da sie Leitstrukturen für den Vesikeltransport darstellen. Zusätzlich sind Mikrotubuli an der Bewegung von Zilien und Flagellen beteiligt. Um sie vor ihrem Zerfall zu schützen existieren Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), die an Mikrotubuli binden und sie

dadurch stabilisieren. Diese stabilisierten Mikrotubuli erhalten gemeinsam mit den Mikro- und Intermediärfilamenten die Feinstruktur und Organisation der Zelle [Welsch, 2006].



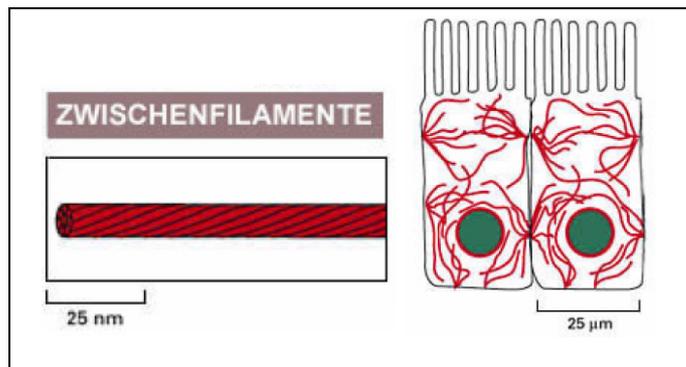
**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der molekularen Struktur und der Anordnung der Mikrotubuli in der eukaryoten Zelle [modifiziert aus Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, De Gruyter, 2005]

**Mikrofilamente (Aktinfilamente)** bestehen aus zwei Aktinfäden, die jeweils 5-7 nm dick und in einer Helix umeinander gewunden sind. Jede Windung hat einen Durchmesser von 36 nm und ist ca. 1  $\mu\text{m}$  lang. Aufgebaut sind die Aktinfäden aus monomerem, globulären G-Aktin (42 kDa). Damit ist es das kleinste der drei Hauptbestandteile des Cytoskeletts. Die Lage der Mikrofilamente zueinander wird durch aktinbindende Proteine bestimmt. Sie können im Zytoplasma ringförmig angeordnet sein oder in Netzwerken vorliegen. Insgesamt besteht jedoch eine hohe Anreicherung der Mikrofilamente in der Peripherie, nahe der Plasmamembran. Durch die Bindung der Mikrofilamente an der Plasmamembran über Aktin-bindende Proteine oder direkt an integrale Membranproteine, stabilisieren diese die Zellmembran und können bei der Mitose mitwirken [Welsch, 2006].



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der molekularen Struktur und Anordnung der Mikrofilamente in der eukaryoten Zelle [modifiziert aus Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, De Gruyter, 2005]

**Intermediärfilamente** wurden als letzte identifiziert. Ihr Durchmesser beträgt 8-10 nm, ihre Länge mehrere  $\mu\text{m}$ . Sie haben eine alpha-Helices Struktur, aus drei umeinander gewundenen Polypeptidketten, die sich zu einem Faden zusammenlagern. Das Intermediärfilament besteht aus drei bis vier dieser Fäden. Dies macht sie besonders stabil. Um den Zellkern herum besteht ein Netzwerk, das bis zu den Desmosomen und der Zellmembran reicht. Sie bilden damit ein interzelluläres Netzwerk, das zur Stabilisierung der Zelle beiträgt. Im Nukleoplasma liegt dieses Geflecht der inneren Membran der Kernhülle an.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der molekularen Struktur und der Anordnung der Intermediärfilamente in der eukaryoten Zelle [modifiziert aus Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, De Gruyter, 2005]

Die Aminosäuresequenz der Intermediärfilamente besteht aus ca. 310 Aminosäuren, mit ca. 40 Wiederholungen, von sieben hydrophilen Aminosäuren. Laminin bildet eine Ausnahme, da hierbei die Wiederholungen 13 Aminosäuren umfassen. Charakteristisch für die einzelnen Proteine ist ihre Kopf- und Schwanzdomäne, da sich diese Sequenzen stark unterscheiden. Aufgrund dessen, lassen sich mindestens fünf Klassen von Intermediärfilamenten differenzieren [Welsch, 2006; Moll, 1998].

**Tabelle 10:** Intermediärfilamentklassen

<b>Klasse I:</b>	saure Cytokeratine: CK10-20 (Molekulargewicht: 40-68 kDa)
<b>Klasse II:</b>	basische Cytokeratine: CK1-9 (Molekulargewicht: 40-68 kDa)
<b>Klasse III:</b>	Vimentin (Molekulargewicht: 57 kDa) Desmin (Molekulargewicht: 53 kDa) Glial fibrillary acidic protein (Molekulargewicht: 45 kDa)
<b>Klasse IV:</b>	Neurofilamentäres Tripletprotein (Molekulargewicht: 68; 160; 210 kDa)
<b>Klasse V:</b>	Nukleäres Laminin (Molekulargewicht: 65-75 kDa)

Jede dieser Intermediärfilamenttypen ist bestimmten Gewebestrukturen zugeordnet. So kommen Cytokeratine hauptsächlich in Epithelien vor, Vimentin im Bindegewebe, Neurofilamente in Nervenfasern, Gliafaserproteine in den Gliazellen und Desmin in der Muskulatur [Moll et al., 1982].

**Tabelle 11:** Proteine der Intermediärfilamente

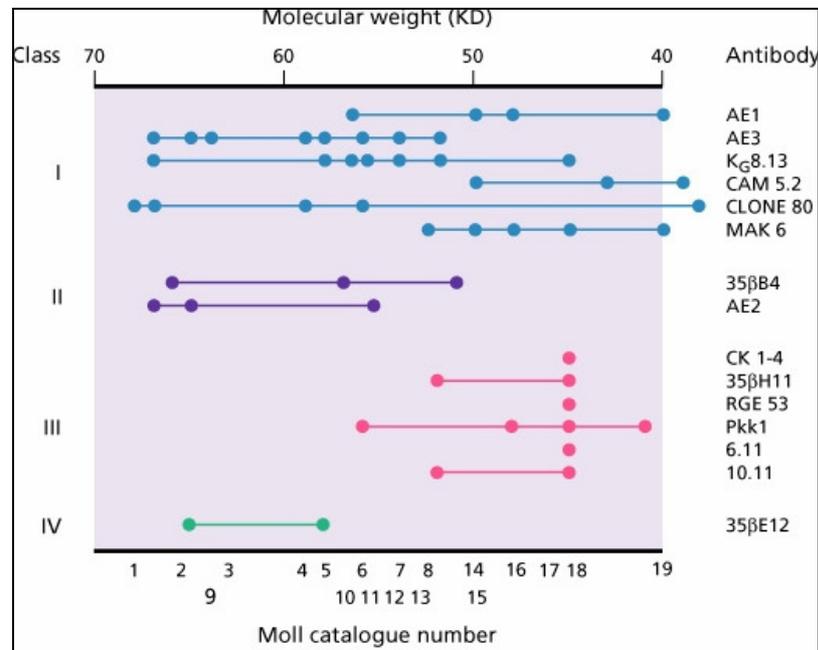
Proteine der Intermediärfilamente	Größe	Vorkommen	Funktion
<b>Cytokeratine</b>	40-68 kDa	Epithelzellen	Mechanischer Schutz der Epithelien Schutz vor Hitze & Wasserverlust
<b>Vimentinfilamente</b>	57 kDa	Mesenchymale Zellen Embryonale Zellen Gefäßendothel Weiße Blutzellen	Strukturerhalt
<b>Desmin</b>	53 kDa	Z-Scheiben Skelettmuskel Herzmuskel	Mechanische Unterstützung von Sarkomeren
<b>Glial fibrillary acidic protein (GFAP)</b>	45 kDa	Gliazellen Astrozyten	Bildung der Gliafilamente
<b>Neurofilamentäres Tripletprotein</b>	68 kDa 160 kDa 210 kDa	Cytoskelett Axon Dendrit	Vernetzung von Zellbestandteilen Axonale Wachstum
<b>Nukleäres Laminin</b>	65-75 kDa	Kernlamina	Anpassung an Kernbewegungen

## 1.2.2. Cytokeratine

### 1.2.2.1. Einteilung der Cytokeratine

Die Klassifikation und Einteilung der Cytokeratine geht auf Moll aus dem Jahre 1982 zurück. Insgesamt wurden 20 Cytokeratine differenziert, von denen Cytokeratin 20 das letzte war, das charakterisiert wurde [Chu, Weiss, 2002]. Die Aufgabe der Cytokeratine besteht im mechanischen Schutz der Epithelien, Aufrechterhaltung der Zellstruktur sowie dem Schutz vor Wasserverlust, Strahleneinwirkung und Hitze [Welsch, 2006]. Sie kommen in Epithelzellen und deren Derivaten vor und werden von je einer Gengruppe kodiert. Dabei liegt die Lokalisation für Klasse I Cytokeratine (CK9-20) auf Chromosom 17q, für Klasse II Cytokeratine (CK1-8) auf Chromosom 12q. Weiterhin haben sie ein spezifisches Expressionsmuster je nach Epithelart. Darüber hinaus können sie nach ihrem Molekulargewicht in „low weight“ und „high weight“ Cytokeratine eingeteilt werden sowie in basische und saure, je nach ihrem isoelektrischen Punkt [Chu, Weiss, 2002]. DeLellis und Kwan haben 1988 die Cytokeratine zusätzlich nach ihrer Reaktion auf verschiedene Antikörperklassen eingeteilt (Abbildung 9). Klasse eins beinhaltet Cytokeratine mit hohem und niedrigem Molekulargewicht, die in squamösem, duktalem

und einfachem Epithel exprimiert sind. Klasse zwei zeigt Cytokeratine mit höherem Molekulargewicht, die in squamösem Epithel exprimiert sind, Klasse drei niedermolekulare Cytokeratine die in einfachem und duktalem Epithel vorkommen. Die vierte Klasse beinhaltet Cytokeratine mit hohem Molekulargewicht, exprimiert in squamösem und duktalem Epithel.



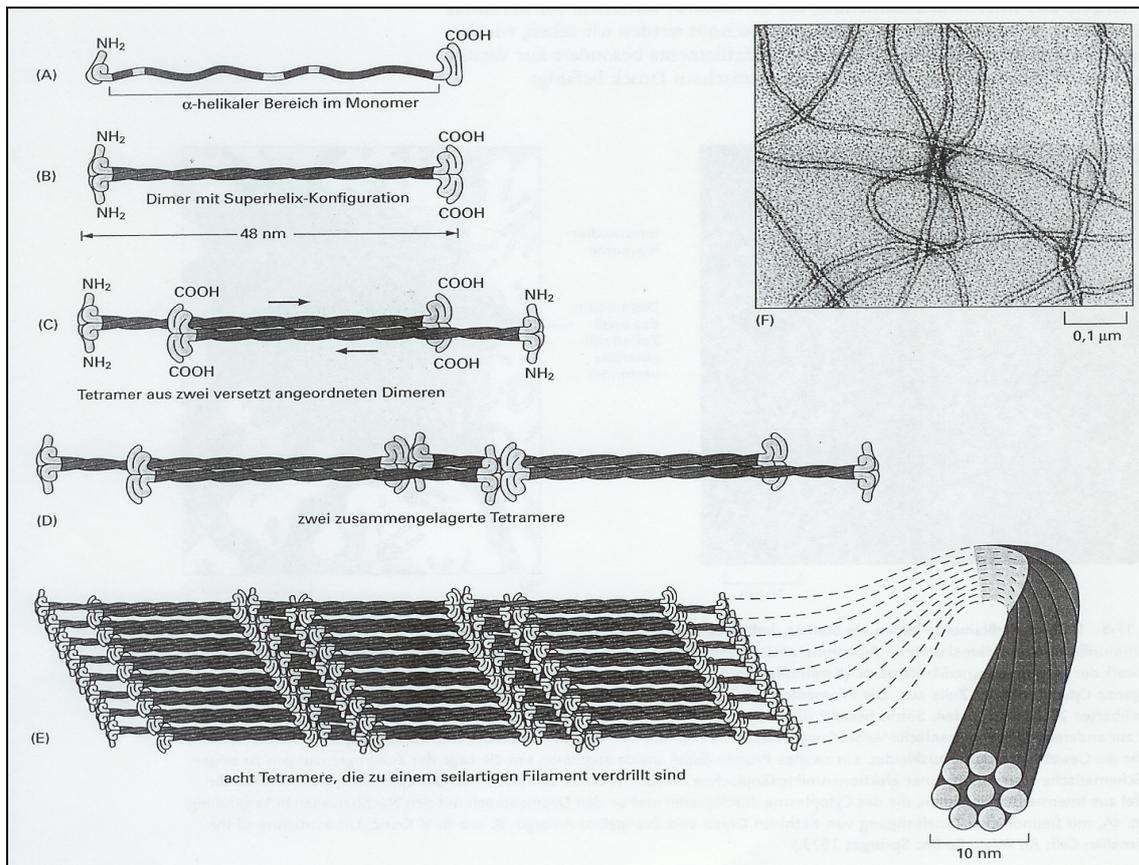
**Abbildung 9:** Einteilung der Cytokeratine [aus Rosai & Ackermann's, Surgical Pathology, Elsevier, 2004]

### 1.2.2.2. Molekularer Aufbau

Alle Cytokeratine besitzen einen einheitlichen Aufbau. Die Untereinheiten bestehen aus fibrillären Proteinen. Diese Proteine besitzen eine globuläre aminotermineale Kopfdomäne sowie eine globuläre carboxyterminale Schwanzdomäne. In der Kopfdomäne befindet sich eine alpha Helix, die 310-360 Aminosäuren umfasst. Sie stellt die zentrale Struktur dar, an der sich zwei Proteinstränge zu Dimeren zusammenlagern können und eine Superhelix umeinander bilden (coiled-coil-formation). Eine stabilere Form entsteht durch Zusammenlagerung von zwei Dimeren zu einem Tetramer über nichtkovalente Bindungen. Endgültig lagern sich Tetramere hintereinander an und bilden damit eine seilartige Struktur (Abbildung 10) [Alberts et al., 2005].

Innerhalb der Zelle ziehen die Cytokeratine von der Kernhülle zur Plasmamembran und gewährleisten somit eine hohe Reißfestigkeit. Sie sind jedoch auch dynamische Strukturen. So können sie während der Mitose und in der post-mitotischen Phase ihre

Länge ändern und sich so den verschiedenen Stadien des Zellzykluses anpassen [Steinert, Liem, 1990]. Zusätzlich stehen die Cytokeratine über ihre Enden mit den Desmosomen in Kontakt, so dass Zell zu Zell Verbindung entsteht. Diese Verknüpfung erstreckt sich durch das ganze Epithel. Dadurch kann mittels eines Spannungsaufbaus die Dehnung des Epithels begrenzt werden und somit das Reißen der Membran verhindert werden [Alberts et al., 2005].



**Abbildung 10:** Molekularer Aufbau von Intermediär bzw. Cytokeratinfilamenten [aus Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle, De Gruyter, 2005]

### 1.2.2.3. Verteilungsmuster

Ein weiteres Verteilungsmuster besteht hinsichtlich der Epithelart: Cytokeratin 1-6 und 9-17 kommen vorwiegend in Plattenepithelien vor, Cytokeratin 7, 8, 18-20 hingegen in Zylinderepithelien [Moll, 1982]. Hierbei sind in jeder Epithelzelle mindestens ein saures und ein korrespondierendes basisches Cytokeratin einander zugeordnet. Dadurch kommt es zu einer charakteristischen Koexpression, die in den einzelnen Epithelien nachweisbar sind. So findet man das Cytokeratinpaar 8/18 bevorzugt in einfachen Epithelien, wohingegen das Cytokeratinpaar 5/14 in Plattenepithelien zu finden ist. Anhand dieses Verteilungsmusters lassen sich bestimmte Krankheiten nachvollziehen,

bei denen eine Cytokeratin Genmutation vorliegt. Beispielsweise beruht die Epidermolysis bullosa simplex auf einer Genmutation der Cytokeratine 5 und 14. Alle Genmutationen der Cytokeratine werden autosomal dominant vererbt [Chu, Weiss, 2002].

#### **1.2.2.4. Cytokeratinexpression in normalen Gewebe**

Cytokeratin 1 und 2 befinden sich hauptsächlich in der Epidermis sowie im Epithel des Analkanals und der Ektocervix. In der Epidermis kommen sie zusammen mit CK9-11 vor, wobei CK9 in der Epidermis der Fußsohle am deutlichsten ausgeprägt ist. CK3 ist zusammen mit CK12 nur in der Kornea exprimiert. In mehrschichtig unverhornten Plattenepithel kommen CK4-6, CK13 und CK14-17 vor. Dabei spielen CK5 und 14 eine entscheidende Rolle beim Zellzusammenhalt der Basalzellen. Zusätzlich machen sie über 10% der zellulären Proteine in vivo aus. In einfachen Epithelien und respiratorischem Epithel kommen gehäuft CK7 und CK8 gepaart mit CK18 und CK19 vor. CK20 wird im einschichtig hochprismatischen Epithel des Magens, der Lamina epithelialis des Dün- und Dickdarms, in Merkelzellen sowie in Übergangsepithel exprimiert. Hingegen ist CK20 in der Haut, Brust, im respiratorischen Epithel, der Speicheldrüse und der Leber nicht nachweisbar [Chu, Weiss, 2002].

#### **1.2.2.5. Cytokeratinexpression in Tumorgewebe**

Anhand von Cytokeratine ist es möglich, Tumore nach ihrer Herkunft zu differenzieren. Grundsätzlich exprimieren Tumore, deren Ursprung einfaches Epithel ist, die Cytokeratine CK20 und/oder CK7 und sind negativ für die Cytokeratine 14, 5 und 6. Hingegen zeigen Plattenepitheltumore ein CK 14, 5 und 6 positives bzw. CK20 und 7 negatives Expressionsmuster [Chu, Weiss, 2002].

In Bezug auf das kolorektale Karzinom zeigt sich eine konstante CK20 Expression bei Adenokarzinomen, ungeachtet ihres Tumorstadiums [Moll, 1998]. Neunzig Prozent aller Adenokarzinome des Kolons weisen ein CK7 negatives, CK20 positives Expressionsmuster auf [Moll et al., 1992].

Bei Adenokarzinomen der Brust zeigt sich ein genau konträres Bild, nämlich eine CK7 positive, CK20 negative Expression. Anhand dieses Beispielen lässt sich die Möglichkeit der Tumordifferenzierung anhand ihres Cytokeratinmusters, z.B. bei der Primärtumorsuche bei Metastasen unbekannter Herkunft, sehr gut demonstrieren.

Jedoch gibt es auch Einschränkungen, da 10% der kolorektalen Karzinome ein CK7 positives Expressionsmuster aufweisen können, was die eindeutige Lokalisation des Primärtumors erschwert.

#### **1.2.2.6. Nachweis von Cytokeratinen**

Zurzeit gibt es zwei Hauptnachweismöglichkeiten für Cytokeratine. Die am häufigsten angewendeten Methoden sind zum einen die Quantifizierung der Cytokeratine mittels biochemischen Verfahren, indem sie extrahiert und isoliert werden. Dies ermöglicht die Quantifizierung des Cytokeratins in der jeweiligen Zellpopulation. Zum anderen kann man sie mittels eines immunhistochemischen Nachweises am histologischen Feinschnittpräparat bestimmen. Dazu sind monoklonale Antikörper notwendig, die durch einen speziellen Farbstoffes zur Anfärbung des jeweiligen Cytokeratins in der Zelle führen. Dieser Test erlaubt keine Mengenbestimmung, jedoch zeigt er die Verteilung des Cytokeratins in der Zelle an.

### **1.3. Herleitung der Aufgabenstellung und Ziele**

In dieser Arbeit wurde an einem Kollektiv aus 475 Gewebeproben von 203 Patienten die prognostische Aussagekraft von verschiedenen Cytokeratinen als molekulare Marker untersucht. Die Auswertung dieser Gewebeproben zeigte charakteristische Expressionsprofile von Cytokeratinen bei kolorektalen Karzinomen. Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Sind Cytokeratine bei kolorektalen Karzinomen auf Proteinebene unterschiedlich exprimiert?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen klinikopathologischen Parametern und Cytokeratinexpression auf Proteinebene?
3. Gibt es spezifische Immunprofile, die möglicherweise von diagnostischer oder prognostischer Relevanz sind und die Tumore in einzelne Subgruppen einteilen können?

## **2. Material**

### **2.1. Tumorkollektiv**

#### **2.1.1. Patientendaten**

Die TMAs dieser Arbeit beinhalteten 475 Gewebeproben von 203 Patienten. Die Proben entstammen dem Universitätsklinikum Charité Berlin, der Abteilung für Chirurgie, und beinhalten Tumorgewebe des Kolons und des Rektums, Metastasen sowie sechs Proben normale Kolonmukosa. Von den 203 Patienten waren 120 (59,1%) Patienten männlich und 77 (37,9%) weiblich. Die Altersverteilung lag zwischen dem 28. und 93. Lebensjahr, wobei das mittlere Lebensalter 69 Jahre betrug. Die prozentuale Verteilung auf vier Altersgruppen betrug für Gruppe 1 (0-30. Lebensjahr): 0,4%, Gruppe 2 (31.-50. Lebensjahr): 3,8%, Gruppe 3 (51.-70. Lebensjahr): 52% und Gruppe 4 (>70 Jahre): 43,8%. Für jede Gewebeprobe, die zu unterschiedlichen Operationszeitpunkten gewonnen wurde, war die Überlebenszeit in Wochen vorhanden, so dass anhand dieser Daten für jede Probe das individuelle Überleben berechnet werden konnte. Im Beobachtungszeitraum von 706 Wochen verstarben 81 von 203 Patienten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 189 Wochen.

#### **2.1.2. Tumordaten**

Von 203 Patienten wurden zu unterschiedlichen Operationszeitpunkten 475 Gewebeproben entnommen, die sowohl Primärtumore, als auch Metastasengewebe beinhalteten. Darin enthalten waren 6 Proben der Normalmukosa des Kolons, die als Kontrollen hinzugenommen wurden.

## 2.2. Materialien für die Gewebeaufbereitung und Datenauswertung

### 2.2.1. Antikörper

**Tabelle 12:** Eingesetzte Cytokeratinantikörper, Herstellernachweis und Verdünnung

Antigen	Produkt-Nr.	Hersteller	Verdünnung	Vorbereitung
CK20	M 7019	DAKO	1:200	Microwave
CK19	MU 246 UC	BioGenex	1:100	Microwave
CK18	MU 143 UC	BioGenex	1:1000	Microwave
CK17	M 7046	DAKO	1:20	Microwave
CK16	NCL-CK16	Loxo/Novocastra	1:20	Microwave
CK14	MU 146 UC	Biogenex	1:50	Microwave
CK13	M 7003	DAKO	1:50	Microwave
CK8	MU 142 UC	Biogenex	1:500	Microwave
CK7	M 7018	DAKO	1:500	Microwave
CK5	NCL-CK5	Loxo/Novocastra	1:50	Microwave

### 2.2.2. TMA-Herstellung

**Tabelle 13:** Materialien und Hersteller für die TMA-Herstellung

Material	Hersteller/Firma
<ul style="list-style-type: none"> <li>Gewebeproben</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Klinikum Charité, Buch</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Paraffin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Medite</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Kapsel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Medite</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Rotationsmikrotom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microm</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Gewebe-Array-Stanzgerät</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Beecher Instruments; Micro-Array Technology</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Objektträger</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Super Frost Plus; R. Langenbrinck</li> </ul>

### 2.2.3. Immunhistochemie

**Tabelle 14:** Materialien und Hersteller für die immunhistochemische Färbung

Material	Hersteller / Firma
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antikörper</li> <li>• Objektträger</li> <li>• Xylol</li> <li>• Alkohol 100%, 96%, 80%, 70%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Siehe Tabelle 18</li> <li>• Super Frost Plus; R. Langenbrinck</li> <li>• J.T. Baker, Holland</li> <li>• Herbeta Arzneimittel, denaturiert mit Ethylenmethylketon</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kochplatte</li> <li>• Schnellkochtopf</li> <li>• Citratpuffer; pH 6,0: Citronensäure 3,78 g Tri-natriumcitrat-Dihydrat 24,21 g Aqua Bidest 100 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rommelsbacher, Deutschland</li> <li>• Tefal</li> <li>• Eigenherstellung</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TBS (Tris-buffered saline);pH 7,4: Tris-Base 9 g Tris-HCL 68,5 g NaCl 87,8 g Aqua Bidest 1000 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eigenherstellung</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachsstift</li> <li>• Cytomation Protein Block, Serum free, ready to use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pap Pen, The Binding site, Birmingham</li> <li>• DAKO (#X0909)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibody diluent solution</li> <li>• Feuchte Kunststoffkammer</li> <li>• TBS/Tween 20 (0,1%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zytomed (#1162756)</li> <li>• Eigenherstellung</li> <li>• Eigenherstellung s.o./Roth Karlsruhe</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Super Sensitive Ready to use Detection Kit</li> <li>• Super Sensitive Alkaline Phosphatase</li> <li>• Super Sensitive Multi Link</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio Genex (#QA900-9L)</li> <li>• Bio Genex</li> <li>• Bio Genex</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aqua dest.</li> <li>• Fast Red</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eigenherstellung</li> <li>• Sigma; Sigma Fast Fast red, Tr/Naphthol As-Mx Tablet Sets, 1 ml/Tablette</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spritze 5ml</li> <li>• Kanüle</li> <li>• Filter 0,2 µm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BD Discardit II</li> <li>• Sterican, Braun</li> <li>• Bezug: Neo Lab; Hersteller: Schleicher &amp; Schnell Micro Science</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Färbeküvette</li> <li>• Häkalaun</li> <li>• Aquatex</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -</li> <li>• Dr. K. Hollbron und Söhne (#H02-1000)</li> <li>• Merck (#1.08562)</li> </ul>

### 2.2.4. Software und Datenbank

**Tabelle 15:** Software und Hersteller für die Datenauswertung

Gerät / Software	Hersteller / Firma
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clusteranalyse-Software</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SPSS 14.0/15.0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SPSS Inc., Chicago, Illinois</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Windows XP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsoft</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DC Pathos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DC Systeme, Heiligenhaus</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laptop</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fujitsu Siemens</li> </ul>

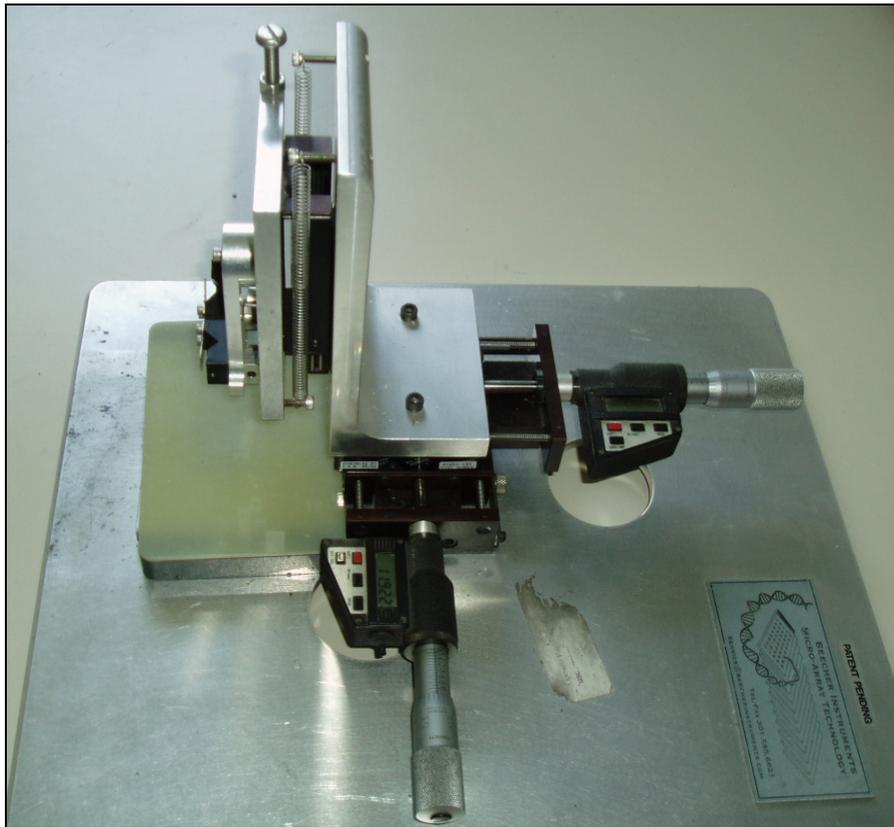
### 3. Methoden

#### 3.1. Gewebe-Array-Verfahren

Die Entwicklung von Gewebe-Micro-Arrays (tissue-micro-array, TMA) stellt eine Verbesserung und Erleichterung der Datengewinnung bei Gewebeschnitten dar. Es gibt verschiedene Typen von TMAs, die in der Tumorforschung angewandt werden können. Multi Tumor Array, die verschiedene Tumortypen beinhalten, Tumor Progression Array, die Tumore unterschiedlicher Stadien beinhalten und prognostische Arrays, die Tumorgewebe mit klinischen Endpunkten beinhalten [Makretsov et al., 2004]. Die TMAs in dieser Arbeit waren vom Typ des prognostischen Array, da sie Proben mit klinischen Endpunkten beinhalteten.

Bei der Erstellung des TMA wurden Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet und aus diesen mittels eines Hohlzylinders, dessen innerer Durchmesser 0,6 mm beträgt, ein repräsentatives Tumorareal entnommen. Diese Gewebeprobe wurde anschließend in vorgefertigte Stanzlöcher eines Empfängerblocks eingebracht. Der Empfängerblock misst 20 x 40 mm und besteht ebenfalls aus Paraffin. Ein verstellbarer Eindringstopper gewährleistete die konstante Länge der Stanzzylinder und der Stanzlöcher. Von dem TMA-Paraffinblock konnten Serienschnitte angefertigt werden, die eine auf den Tumor fokussierte und schnellere Auswertung ermöglichten.

Vorteil der TMA-Herstellung gegenüber Großschnitten ist, dass bis zu tausend Gewebszylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm in einen Paraffinblock eingebettet werden können. Technisch wurde dies durch ein Gewebe-Array-Stanzgerät (Abbildung 11) gelöst. Vom Paraffinblock konnte mittels eines Rotationsmikrotom ca. 3 µm dünne Serienschnitte angefertigt werden. Diese Gewebsschnitte wurden auf einen Objektträger aufgetragen, der anschließend gefärbt wurden (Abbildung 12). Es konnte gezeigt werden, dass eine Tumorstanze von 0,6 mm Durchmesser ausreicht, um einen Zusammenhang zwischen Molekülexpression und klinischem Verlauf zu bestätigen, der sich auch in der Großschnittanalyse ergeben hatte [Torhorst et al., 2001].



**Abbildung 11:** Beecher Instruments Micro-Array Stanzgerät



**Abbildung 12:** TMA-Objekträger nach der Färbung mit dem CK8-Antikörper

Die TMAs können für alle in situ Methoden angewendet werden, dass heißt bei der Untersuchung auf Proteinebene (IHC), auf DNA-Ebene (FISH) sowie auch für RNA-in-situ-Hybridisierung [Makretsov, 2004; van de Rijn, 2004; Simon, 2005].

Ein weiterer Vorteil ist, dass sie zusätzlich einen hohen Grad an Standardisierung gewährleisten, da alle Proben gleichzeitig bearbeitet werden und es somit, im Gegensatz zu Großschnitten, zu keinen Unterschieden in der Färbequalität, den Einwirkzeiten oder der Antikörperkonzentration kommen kann [Simon R., 2005]. Zusätzlich verkürzt sich damit die Bearbeitungszeit und erspart den Laboratorien enorme Kosten [Simon, 2005; Nocito, 2001; van Rijn, 2004; Hsu, 2002].

Um diese Fülle an Daten auswerten zu können, wurde eigens dafür eine Software entwickelt, die im Internet erhältlich ist (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Die Software nutzt das Prinzip des unabhängigen hierarchischen Clustern, wobei die Tumore in Bezug auf ihre Ähnlichkeiten, wie beispielsweise in dieser Arbeit, der Antikörperexpression gruppiert werden.

Eine Weiterentwicklung der TMAs wurde vollzogen, indem man die Auswertung mehrdimensional gestaltete. Durch die Anwendung von Serienschnitten konnte die Auswertung, nicht nur wie zuvor in einer Ebene (2-D), sondern auch in der Tiefe (3-D) erfolgen [Knösel et al., 2005]. Durch diese Technik konnten 2919 Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen einschließlich normaler Kolonmukosa ausgewertet werden.

### 3.2. Immunhistochemie

Für die Immunhistologie wurden kommerziell hergestellte Antikörper gegen Cytokeratinantigene verwendet. Die Immunhistologie benötigte manuell jeweils zwei Tage.

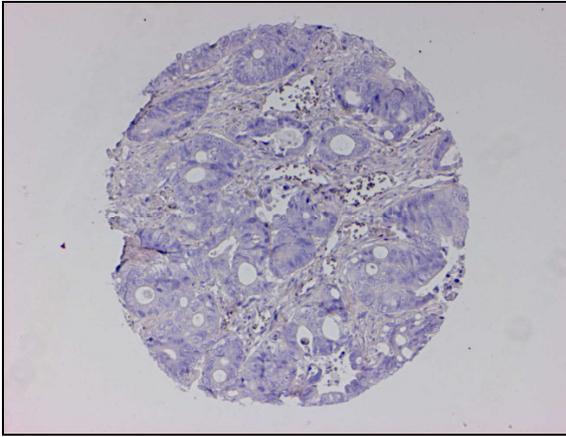
Der erste Tag beinhaltete die Vorbehandlung der Schnitte und das Einwirken des Antikörpers. Am zweiten Tag erfolgten die Färbung und das Eindecken. Pro Küvette konnten maximal 20 Objektträger verwendet werden. Der erste Schritt beinhaltete die Entfettung der Schnitte dreimal in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe – zweimal 100%, zweimal 96%, 80%, 70% - für jeweils drei Minuten. Die Vorbehandlung erfolgte anschließend im Schnellkochtopf mit einem Liter Citratpuffer. Das Erhitzen der Schnitte ist nötig, um Zielantigene zu demaskieren und die Bindung mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper zu ermöglichen. Die Schnitte wurden fünf Minuten gekocht und weitere 25 Minuten im Citratpuffer belassen. Der Waschpuffer war DAKO TBS. Die Umrandung der Gewebsschnitte mit einem Wachsstift diente der Eingrenzung auf dem Objektträger. Geblockt wurden sie danach mit dem Cytomation Protein Block (Serum free, ready to use). Die Blockung ist erforderlich, um endogene Peroxidasen bzw. unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu verhindern.

Die jeweiligen Lösungen für den primären Antikörper wurden pro Schnitt mit 200 µl des Verdünnungspuffers (Antibody diluent solution) angesetzt. Die Verdünnung, die Produktnummer und der Hersteller lassen sich aus der Tabelle 20 entnehmen. Nach Aufbringen des Antikörpers wurden die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank belassen.

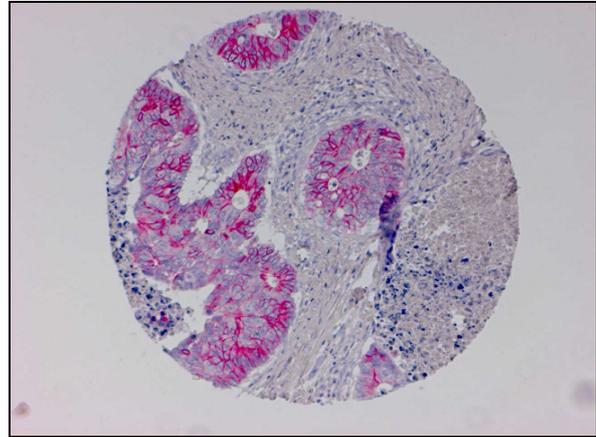
Am folgenden Tag mussten die Schnitte eine Stunde aufgetaut werden. Anschließend erfolgte die Waschung einmal mit TBS/Tween 20 (0,1%) und zweimal mit TBS. Als Nachweissystem wurde der Super sensitive Ready-to-use Detection-Kit verwendet. Mit 2-3 Tropfen pro Schnitt wurde der Multi Link® aufgetropft, der den zweiten biotinylierten Antikörper beinhaltete. Dieser wirkte 20 Minuten ein, bevor man ihn wiederum 1x mit TBS/Tween 20 (0,1%) und 2x mit TBS abwusch und mit einem Streptavidin-Enzym-Komplex für 20 Minuten inkubierte. Das Streptavidin weist eine hohe Affinität zu den Biotin-Resten des Multi Link Antikörpers auf. Das Enzym alkalische Phosphatase dient zur Vermittlung der Farbreaktion, die letztlich die erfolgreiche Bindung der Antikörper sichtbar macht. Abgewaschen wurde dieser 1x mit TBS/Tween 20 (0,1%) und 2x mit

TBS. Als Farbstoff für den Antikörper-Enzym-Komplex diente eine Lösung, die aus Aqua Bidest, einem Puffer und Fast Red bestand. Es wurde jeweils 200 µl dieser Lösung pro Schnitt aufgebracht. Die Farblösung wurde mittels einer Spritze durch einen Filter hindurch auf die Schnitte gegeben. Fast Red ist ein Substrat für die Alkalische Phosphatase und gewährleistet eine hohe Empfindlichkeit für die mikroskopische Auswertung histologischer Schnitte. Durch Aqua dest. konnte die Farbreaktion nach fünf Minuten abgestoppt werden. Die Kerngegenfärbung erfolgte für zehn Sekunden mit Hämalaun nach Mayer. Unter fließendem Wasser wurden die Objektträger gewaschen und mit Aquatex eingedeckt. Als letztes wurden sie mit Datum, Verdünnung und Antikörper versehen.

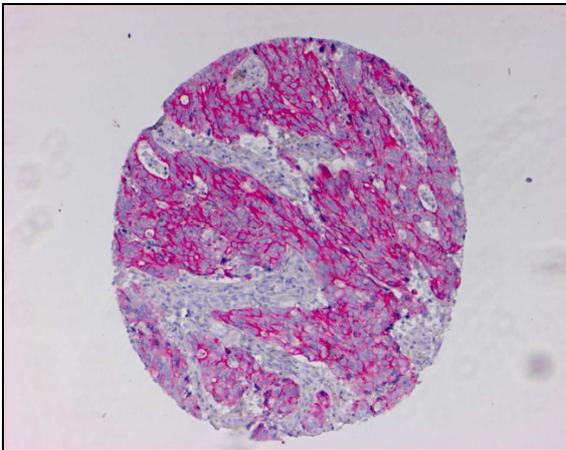
Zur Beurteilung der Färbeergebnisse wurde ein Vierer-Score (0-3) entwickelt, der mit der Stärke der Anfärbung korreliert: 0–negativ bzw. keine Anfärbung erfolgt, 1–schwach, 2–mäßig, 3–stark positiv. Score 9 bezeichnet Tumorproben, die kein Tumorgewebe enthielten, die ungenügend angefärbt wurden oder es aufgrund des Färbevorganges zu Gewebeerstörungen gekommen war. Durch diese „fehlenden“ Daten der Tumorproben kommt es bei der Auswertung zu unterschiedlichen Gesamtzahlen der angefärbten Cytokeratine. Bei Grenzfällen zwischen Score 0/1, 1/2, 2/3 wurde zusätzlich die quantitative Anfärbbarkeit bewertet. Score 1: bis 25% angefärbt, Score 2: 25-75% und Score 3: >75%. Abbildungen 13-16 zeigen ein Färbebeispiel durch den Cytokeratinantikörper zur Darstellung von CK8. Die Ergebnisse des Scores wurden für die Cluster Analyse verwendet.



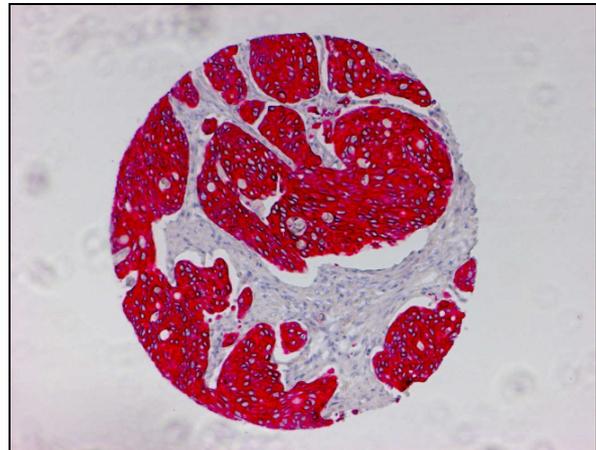
**Abbildung 13:** CK8 Anfärbung negativ=0



**Abbildung 14:** CK8 Anfärbung schwach=1



**Abbildung 15:** CK8 Anfärbung mäßig=2



**Abbildung 16:** CK8 Anfärbung stark=3

### 3.3. Cluster Analyse

Die Cluster Analyse der TMAs wurde mittels der Cluster und der TreeView Software durchgeführt, die ursprünglich für die Analyse von cDNA Mikroarray Daten (Gene Cluster 3.0 von Michel de Hoon) entwickelt wurde. Cluster und TreeView Software sind kostenlose Programme, die unter <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> zu beziehen sind. Eine Excel Macro Tabelle wurde erstellt, um die TMA-Daten aus einer Arbeitstabelle in eine Excel Tabelle mit tabellarischem Format zu überführen, die kompatibel mit Gen-Cluster Analysen ist. Das hierarchische Clustern beruht auf dem Prinzip, Daten aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu Gruppen zusammenzufassen. Bei den Variablen kann es sich um quantitative, binäre oder Häufigkeitsdaten handeln. In dieser Untersuchung handelte es sich um Färbungen von zehn verschiedenen immunhistochemischen Markern, die semiquantitativ ausgewertet wurden.

Das Ziel dieses Verfahrens ist es, anhand von multivariaten Daten, heterogene Mengen in möglichst homogene Subgruppen zu klassifizieren. Dabei wird ein Algorithmus eingesetzt, der für jeden Fall ein separates Cluster bildet. Als Filterkriterium wurde eine Grenze festgelegt, die mindestens 80% interpretierbare Daten für jedes Probenkollektiv (n=475) der zehn immunhistochemischen Evaluierungsmethoden (4750 Datensätze) beinhaltet.

Die Probanden wurden in zwei Kategorien, Proben und Cytokeratinprofil, geclustert. Die Ergebnisse dieser Cluster-Analyse wurden mit Hilfe von der TreeView Software als Dendogramme und Pfeile dargestellt. Dabei entsprechen die Spalten und Zeilen den Ursprungsdaten, welche in ihrer Abfolge dem Clusterergebnis angepasst sind.

Auf der Oberseite des Dendogramms erscheint die Subgruppenbildung der Cytokeratinantikörper. Je enger die horizontalen Linien zueinander stehen, desto ähnlicher sind sich die Cytokeratinantikörper in ihrem Färbeverhalten des Tumorgewebes. Die linke Dendogrammseite zeigt die Subgruppenbildung des Tumorgewebes basierend auf dem Grad der Ähnlichkeit ihrer immunhistochemischen Anfärbung bzw. ihrer Genexpression. Für jeden Antikörper ist die farbliche Darstellung des Scores identisch: stark positiv – 3 rot, mäßig – 2 dunkelbraun, schwach – 1 hellbraun, negativ bzw. keine Anfärbung – 0 schwarz und keine vorhandenen Daten grau.

### 3.4. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte am PC mittels SPSS 14.0 für Windows. Um die Stärke der Korrelation der Daten untereinander zu testen, wurde zur Darstellung von Häufigkeiten und deren Zusammenhang die Auswertung anhand von Kreuztabellen und dem Fisher's Exact Test vorgenommen.

Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Der Vierer-Score wurde für die unabhängige statistische Analyse von einzelnen Antikörpern und ihrer Korrelation zu den klinikopathologischen Parametern inklusive des Überlebens auf einen Zweier-Score reduziert (0/1 – negativ, 2/3 – positiv) Für die Vereinfachung der Patientendaten bezüglich des Alters wurden sie in vier Altersstufen eingeteilt: Gruppe 1: 0-30. Lebensjahr, Gruppe 2: 31.-50. Lebensjahr, Gruppe 3: 51.-70. Lebensjahr; Gruppe 4: 71.-100. Lebensjahr. Die klinischen Daten und der Verlauf waren für alle Fälle mit einem Zeitrahmen von 108 Wochen vorhanden. Von jeder Tumorprobe wurde das Datum der Operation, der letzte Kontakt und der Zustand beim Kontakt (lebend/tot) eingetragen sowie das krankheitsspezifische Überleben berechnet.

Die Darstellung der Überlebenskurven erfolgte nach dem Kaplan-Meier-Test. Dies hatte den Vorteil, die Überlebenszeitanalyse auch beim Vorliegen von zensierten Daten durchzuführen, wie es in dieser Studie der Fall war. Die Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rang-Test ermittelt, da sich die Kurven in ihren Einflussgrößen unterscheiden haben. Zusätzlich wurde ein 95% Konfidenz-Intervall berechnet. Durch den Einbau eines Filters konnte der Tatsache Rechnung getragen werden, dass quantitativ mehr Gewebeschnitte mit spezifischem Überleben als Patienten vorhanden waren.

Multivariate bzw. multiple Analysen wurden mit dem Proportionalen Hazard Modell (Cox-Regression) durchgeführt. Die Cox-Regression ermöglicht im Gegensatz zu der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse sowohl die Einbeziehung von Kovariablen, als auch die Überprüfung deren Einflusses. Die Zahl der Variablen im Cox-Modell wurde mittels einer schrittweisen Modellselektion der SPSS Software reduziert. Um die Cox-Modelle vergleichen zu können wurde anschließend der Wald Test durchgeführt, bei dem ebenfalls ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Pathologisch-anatomische Befunde

#### 4.1.1. Probenkollektiv

Das Probenkollektiv beinhaltete insgesamt 475 Gewebeproben. Davon stammten 154 von Primärtumoren, 314 von Metastasen, sechs Proben von Normal- bzw. Kontrollgewebe sowie eine Tumorprobe, für die jedoch keinerlei Daten bezüglich der Tumorlokalisierung, TNM-Status, Grading oder Überleben vorlagen.

#### 4.1.2. Patientenkollektiv

Die Gewebeproben stammten von 203 Patienten, von denen 120 (59,1%) Patienten männlich und 77 (37,9%) weiblich waren. Sechs Proben beinhalteten normale Kolonmukosa. Die Altersverteilung lag zwischen dem 28. und 93. Lebensjahr, wobei das mittlere Lebensalter 69 Jahre betrug (Abbildung 17). Die prozentuale Verteilung auf vier Altersgruppen betrug für Gruppe eins (0-30. Lebensjahr): 0,4%, Gruppe zwei (31.-50. Lebensjahr): 3,8%, Gruppe drei (51.-70. Lebensjahr): 52% und Gruppe vier (>70 Jahre): 43,8%. Im Beobachtungszeitraum von 706 Wochen verstarben 81 der 203 Patienten.

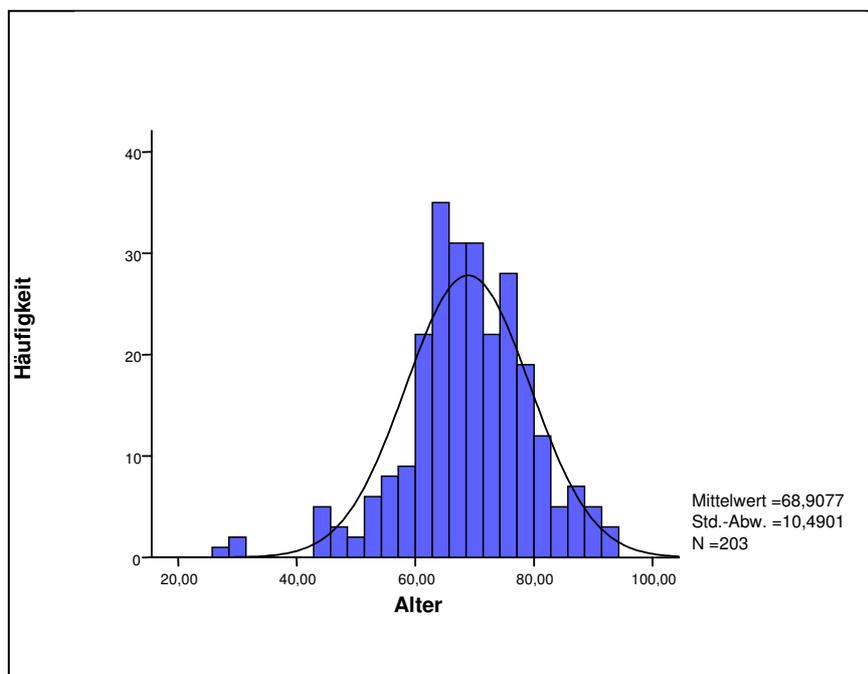
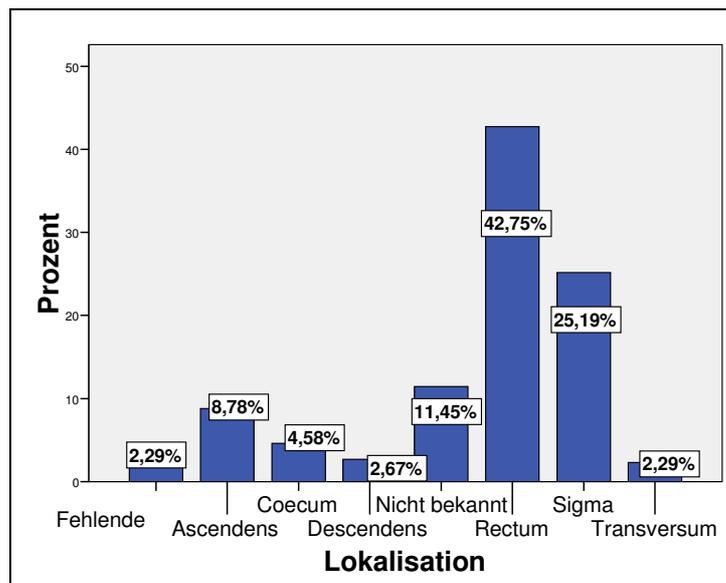


Abbildung 17: Altersverteilung der Patienten

Bei Gruppe eins befand sich der Tumor zu 100% im Coecum, bei Gruppe zwei zu 75% im Rectum und 25% im Sigma. Bei den Altersgruppen drei und vier überwog die Lokalisation des Tumors im Rectum mit 52,5% und 46,5%.

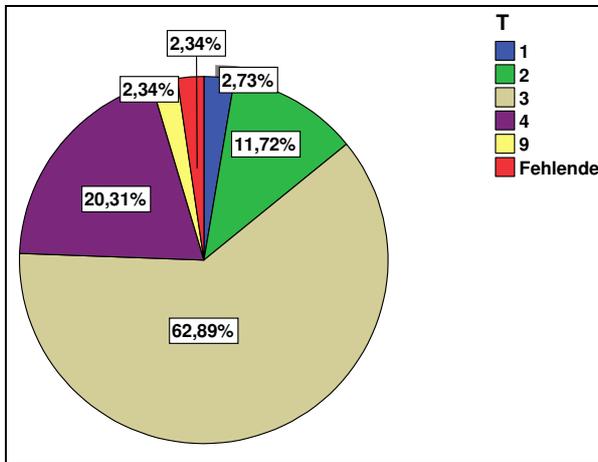
Insgesamt war die Tumorlokalisierung hauptsächlich auf Rectum und Sigma verteilt. Das Kolon transversum war dabei am seltensten betroffen. Die prozentuale Verteilung ist aus Abbildung 18 ersichtlich.



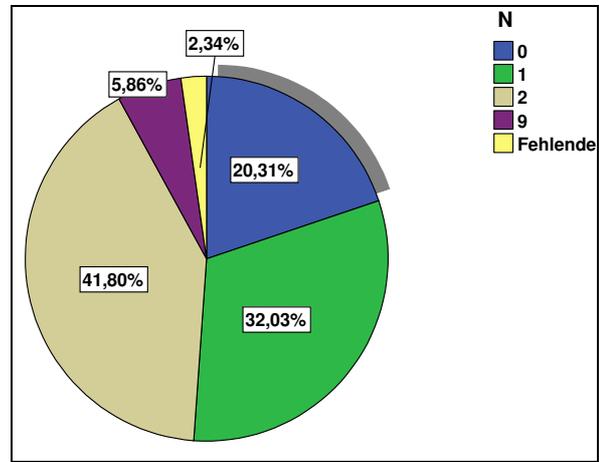
**Abbildung 18:** Verteilung der Tumorlokalisierung und Häufigkeit (n=203)

Auffallend bei der Verteilung der Lokalisation der Tumore und der Metastasen waren die hohe Zahl von Lymphknoten- (37,4%) und Lebermetastasen (15,0%) beim Rectumkarzinom. Die Rectumkarzinome hatten den größten Anteil an den Primärtumoren (46,1%) sowie das höchste lokale Rezidiv (54,5%). Bei Sigmatumoren wurden gegenüber anderen Lokalisationen überdurchschnittlich häufig (30,5%) abdominelle Metastasen gefunden.

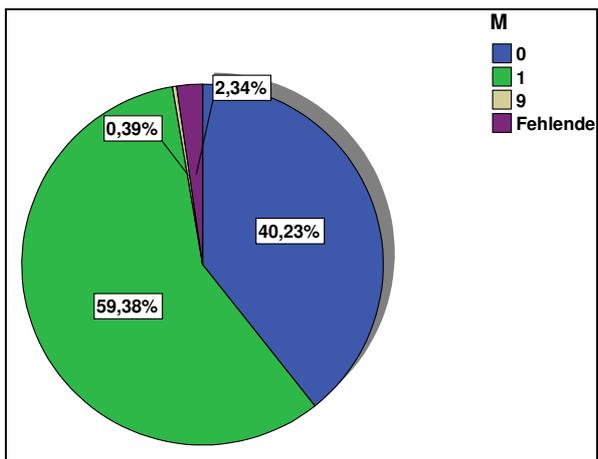
Die Abbildungen 19-22 zeigen das prozentuale Verhältnis des Tumorstadiums, Nodalstatus, Metastasen und Grading.



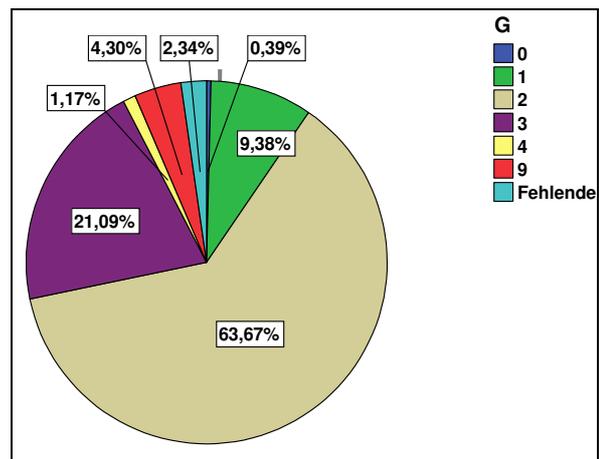
**Abbildung 19:** Verteilung Primärtumorstadium (n=203)



**Abbildung 20:** Verteilung Nodalstatus (n=203)

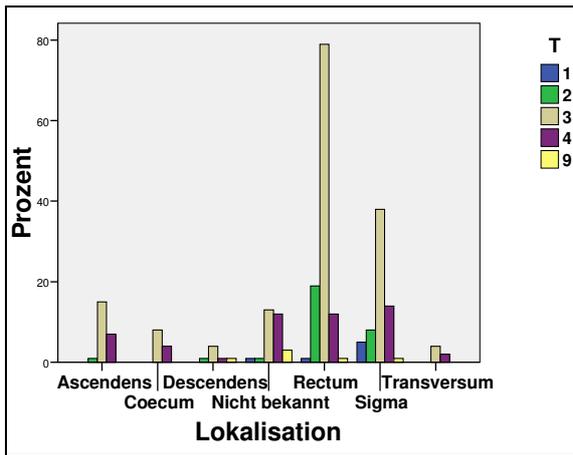


**Abbildung 21:** Verteilung Metastasierung (n=203)

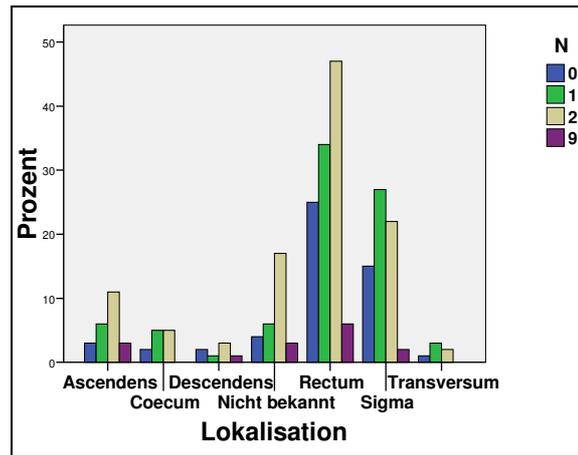


**Abbildung 22:** Verteilung Grading (n=203)

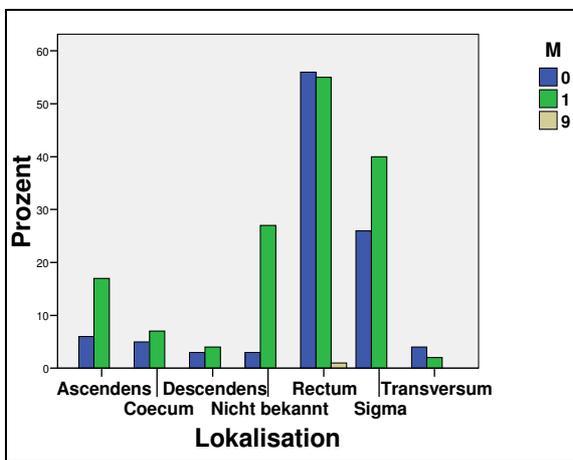
Hinsichtlich der Verteilung des Tumorlokalisationen in Bezug auf ihr TNM-Status und Grading zeigen Abbildungen 23-26, dass Tumore des Sigma und des Rectum ein höheres Tumorstadium hatten (Rectum pT3, N2, M0, G2; Sigma pT3, N1, M1, G2), was dem klinischen Stadium IIIC bzw. IV entspricht.



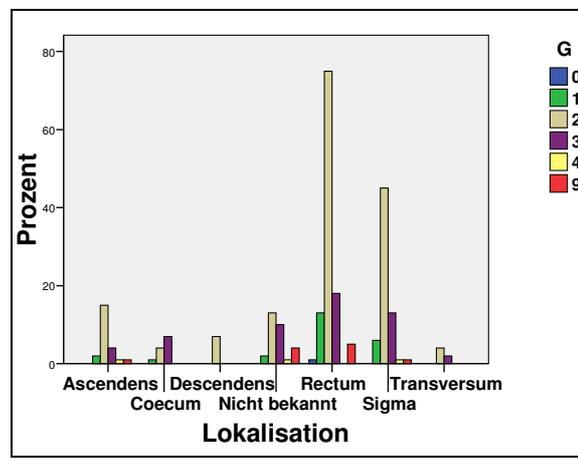
**Abbildung 23:** Tumorlokalisierung und Tumorausdehnung (n=203)



**Abbildung 24:** Tumorlokalisierung und Lymphknotenstatus (n=203)



**Abbildung 25:** Tumorlokalisierung und hämatogene Metastasierung (n=203)



**Abbildung 26:** Tumorlokalisierung und Grading (n=203)

Tabelle 16 zeigt die Verteilung und Häufigkeit der Metastasen, Primärtumore und Normalmukosa, bezogen auf die Gesamtzahl aller untersuchten Gewebeproben.

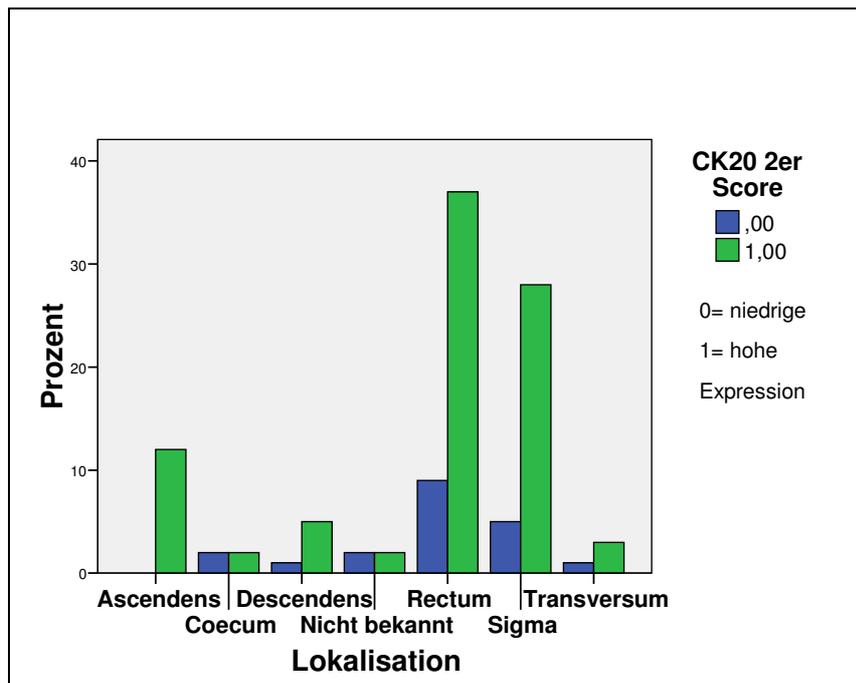
**Tabelle 16:** Verteilung der Metastasenlokalisierung und deren Häufigkeit inklusive Normalmukosa

Lokalisation	Häufigkeit	Prozente
Normalmukosa	6	1,3
Knochen	1	0,2
Haut	1	0,2
Leber	74	15,6
Lymphknoten	150	31,6
Lunge	18	3,8
Abdomen	59	12,4
Primärtumor	154	32,4
Rectum	11	2,3
Nicht bekannt	1	0,2
<b>Gesamt</b>	<b>475</b>	<b>100,0</b>

## 4.2. Immunhistochemie (IHC)

Es wurden 475 Gewebestanden von 203 Patienten des Klinikums Charité Campus Mitte und Campus Berlin Buch untersucht. Insgesamt wurden 2919 kolorektale Gewebeprobe mit Hilfe von „Micro-Arrays“ (TMA-Verfahren) immunhistochemisch ausgewertet. Die Gewebeprobe wurden mit 10 verschiedenen Cytokeratinantikörpern CK20-16, 14, 13, 8, 7 und 5 angefärbt, wobei ein Vierer-Score nach der Stärke ihrer Anfärbbarkeit festgelegt wurde (0-negativ, 1-schwach, 2-mäßig, 3-stark positiv). Aufgrund von Gewebeerstörung, Artefakten oder schlechter Anfärbung konnten Gewebeprobe nicht ausgewertet werden (Score 9), wodurch die Anzahl der Proben für die einzelnen Cytokeratine unterschiedlich waren. Insgesamt wurden 2919 Gewebeprobe angefärbt, wovon 1681 gering, 1238 mäßig bis stark angefärbt wurden.

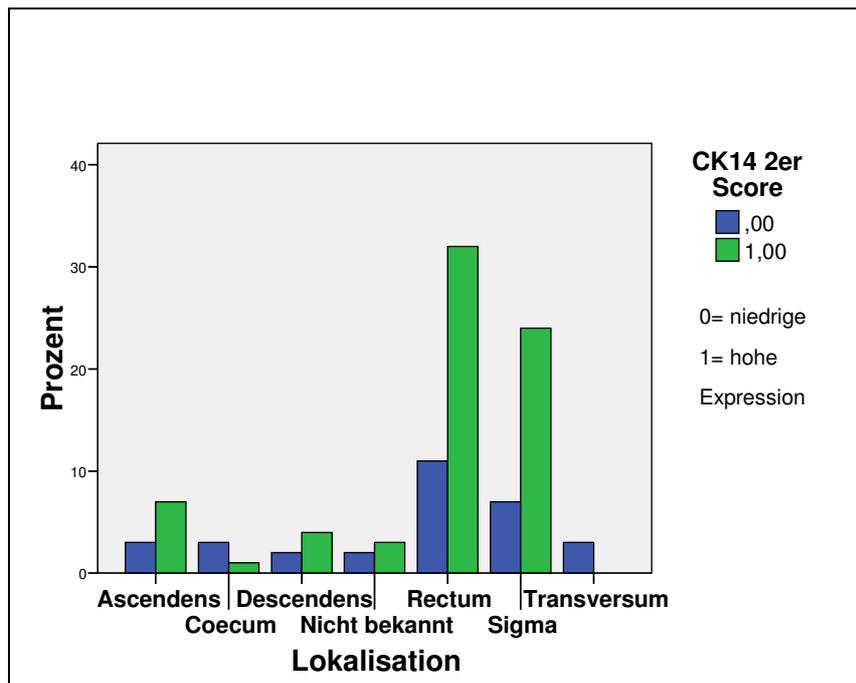
CK20 wurde mit 91,7% angefärbt (Score 1, 2, 3), davon 68,8% stark positiv (Score 3). CK19 war zu 86,1% positiv (Score 2 und 3), 71,7% davon stark positiv (Score 3). CK18 bot mit 98,2% die höchste prozentuale Anfärbbarkeit, davon 87,9% Score 3. CK8 färbte zu 87,5% an, davon mit 79,5% Score 3. Hingegen boten die Marker CK17, CK16, CK13, CK7 und CK5 ein konträres Bild. Diese Marker waren jeweils bis zu 80% negativ (Score 0). Ein gemischtes Ergebnis zeigte CK14. Dieser Marker war zu 18,6% negativ, zu 11,8% schwach anfärbbar (Score 1), zu 16,7% mäßig anfärbbar (Score 2) und zu 52,9% stark positiv (Score 3). Abbildungen 27-29 zeigen die Anfärbbarkeit der Marker CK20, CK14 und CK8 in verschiedenen Lokalisationen. In den Tabellen 17-19 werden zu der prozentualen Angabe der Expressionsstärke auch die Anzahl der Proben in der jeweiligen Tumorlokalisierung genannt. Hinsichtlich der Cytokeratinexpression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug zur Tumorlokalisierung



**Abbildung 27:** Stärke der CK20 Anfärbung bei verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore (n=154)

**Tabelle 17:** Verteilung und Stärke der Anfärbung in verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore bei CK20

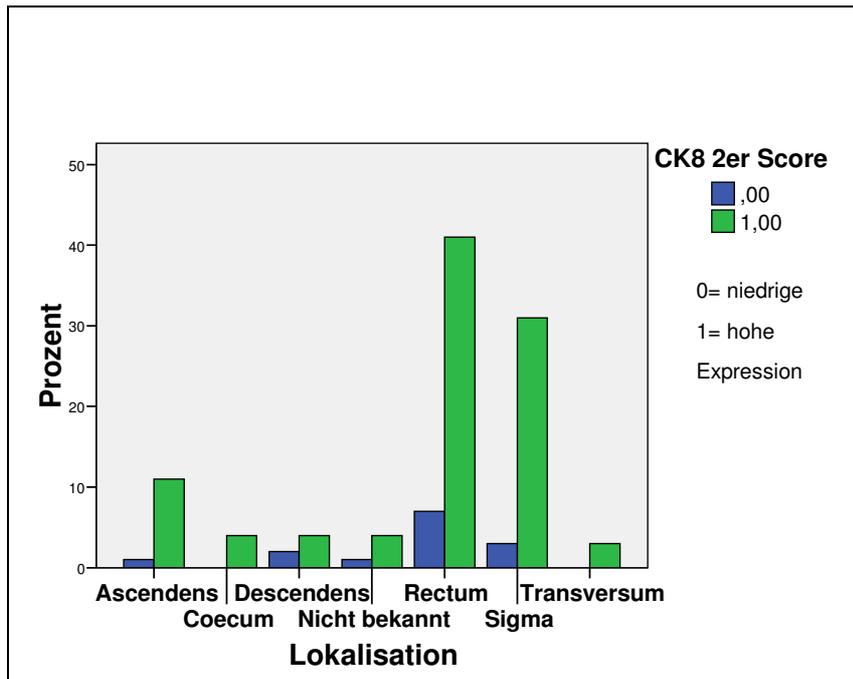
Lokalisation	CK20 2er Score Expressionsstärke				Gesamt	
	0 niedrig		1 hoch		n	%
Ascendens	0	0,0	12	11,0	23	11,0
Coecum	2	1,8	2	1,8	4	3,7
Transversum	1	0,9	3	2,8	4	3,7
Descendes	1	0,9	5	4,6	6	5,5
Sigma	5	4,6	28	25,7	33	30,3
Rectum	9	8,3	33	33,9	46	42,2
Nicht bekannt	2	1,8	2	1,8	4	3,7
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>	<b>18,3</b>	<b>89</b>	<b>81,7</b>	<b>109</b>	<b>100</b>



**Abbildung 28:** Stärke der CK14 Anfärbung bei verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore (n=154)

**Tabelle 18:** Verteilung und Stärke der Anfärbung in verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore bei CK14

Lokalisation	CK14 2er Score Expressionsstärke				Gesamt	
	0 niedrig		1 hoch			
	n	%	n	%	n	%
Ascendens	3	2,9	7	6,9	10	9,8
Coecum	3	2,9	1	1,0	4	3,9
Transversum	3	2,9	0	0	3	2,9
Descendes	2	2,0	4	3,9	6	5,9
Sigma	7	6,9	24	23,6	31	30,4
Rectum	11	10,8	32	31,4	43	42,2
Nicht bekannt	2	2,0	3	2,9	5	4,9
<b>Gesamt</b>	<b>31</b>	<b>30,4</b>	<b>71</b>	<b>69,9</b>	<b>102</b>	<b>100</b>



**Abbildung 29:** Stärke der CK8 Anfärbung bei verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore (n=154)

**Tabelle 19:** Verteilung und Stärke der Anfärbung in verschiedenen Lokalisationen der Primärtumore bei CK8

Lokalisation	CK8 2er Score Expressionsstärke				Gesamt	
	0 niedrig		1 hoch			
	n	%	n	%	n	%
Ascendens	1	0,9	11	9,8	12	10,7
Coecum	0	0,0	4	3,6	4	3,6
Transversum	0	0,0	3	2,7	3	2,7
Descendes	2	1,8	4	3,6	6	5,4
Sigma	3	8,8	31	91,2	34	30,4
Rectum	7	6,3	41	36,6	48	42,2
Nicht bekannt	1	0,9	4	3,6	5	4,5
Gesamt	14	12,5	98	87,5	112	100

Tabellen 20, 21 und 22 zeigen die Antikörper 20, 19, 18, 17, 16, 14, 13, 8, 7 und 5 in ihrer Expressionsstärke in Korrelation zum pTNM-Status und Grading.

Bei der Analyse der Antikörper im Vergleich zum pTNM-Status stellte sich heraus, dass lediglich eine schwache oder fehlende Expression von CK16 mit höherem Lymphknotenstatus korrelierte ( $p=0,037$ ; Tabelle 21). Bezüglich der anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Assoziationen.

**Tabelle 20:** CK20, 14, 8 Expressionsstärken in Korrelation zum pTNM-Status und Grading

	CK20 N=109		CK14 N=102		CK8 N=112	
	Score		Score		Score	
	0	1	0	1	0	1
<b>Tumorinfiltration</b>	n=109		n=102		n=112	
pT1/2	5	15	4	15	0	20
pT3/4	15	74	27	56	14	78
<b>Tumordifferenzierung</b>	n=104		n=97		n=107	
G1/G2	13	71	21	56	13	74
G3	4	16	8	12	1	19
<b>Lymphknotenstatus</b>	n=109		n=102		n=112	
pN0/N1	8	56	20	39	10	57
pN2	12	33	11	32	4	51
<b>Metastasen</b>	n=108		n=101		n=111	
M0	11	58	22	39	5	63
M1	9	30	8	32	9	34

**Tabelle 21:** CK19, 18, 17, 16 Expressionsstärken in Korrelation zum pTNM-Status und Grading

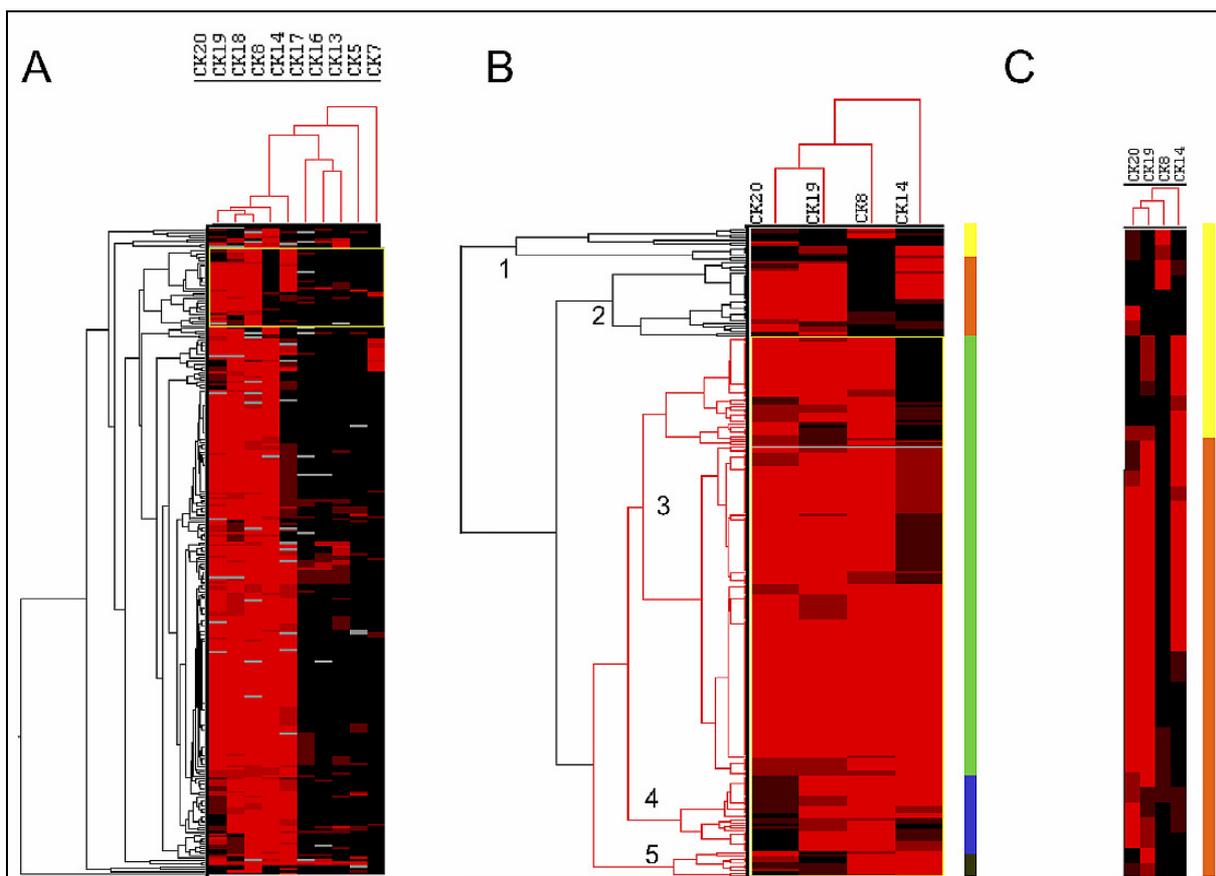
	CK19 N=119		CK18 N=107		CK17 N=105		CK16 N=108	
	Score		Score		Score		Score	
	0	1	0	1	0	1	0	1
<b>Tumorinfiltration</b>	n=113		n=107		n=105		n=108	
pT1/2	5	15	1	18	18	0	17	0
pT3/4	10	83	1	87	86	1	85	6
<b>Tumordifferenzierung</b>	n=106		n=101		n=100		n=104	
G1/G2	7	78	1	80	79	1	79	5
G3	4	17	1	19	20	0	19	1
<b>Lymphknotenstatus</b>	n=113		n=107		n=105		n=108 <b>p=0,037</b>	
pN0/N1	5	59	0	62	59	1	56	6
pN2	10	39	2	43	45	0	46	0
<b>Metastasen</b>	n=112		n=106		n=104		n=107	
M0	14	56	2	63	63	1	61	5
M1	1	41	0	41	40	0	40	1

**Tabelle 22:** CK13, 7, 5 Expressionsstärken in Korrelation zum pTNM-Status und Grading

	<b>CK13 N=110</b>		<b>CK7 N=112</b>		<b>CK5 N=112</b>	
	Score		Score		Score	
	0	1	0	1	0	1
<b>Tumorinfiltration</b>	n=110		n=112		n=112	
pT1/2	19	1	21	0	21	0
pT3/4	82	8	86	5	90	1
<b>Tumordifferenzierung</b>	n=105		n=107		n=107	
G1/G2	77	8	83	3	85	1
G3	19	1	19	2	21	0
<b>Lymphknotenstatus</b>	n=110		n=112		n=112	
pN0/N1	57	7	63	3	64	1
pN2	44	2	43	2	47	0
<b>Metastasen</b>	n=109		n=111		n=111	
M0	60	7	65	4	68	1
M1	40	2	41	1	42	0

### 4.3. Hierarchische Clusteranalyse der IHC-Daten

Mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse konnten die einzelnen Tumore aufgrund ihres Färbeverhaltens in einzelne Subgruppen unterteilt werden. Verbundene vertikale Linien kennzeichnen dabei verbundene Fälle. Die farbliche Darstellung des Scores ist für jeden Antikörper identisch. Rot kennzeichnet eine starke Anfärbung (Score 3), eine moderat positive Anfärbung (Score 2) wird durch eine dunkelbraune Farbe und eine schwach positive Anfärbung (Score 1) durch eine hellbraune Farbe symbolisiert. Schwarz kennzeichnet eine fehlende Anfärbarkeit (Score 0), grau solche Fälle, bei denen keine Daten vorlagen bzw. Der Fall nicht auswertbar war (Score 9). Das Dendrogramm an der linken Seite fasst die Tumorproben in Gruppen zusammen, die ein ähnliches Färbeverhalten in Bezug auf die Cytokeratine aufwies. An der Oberseite ist das Dendrogramm dargestellt, dass die Gruppen der Cytokeratine in dem untersuchten Tumorkollektiv aufzeigt, die sich in ihrer Anfärbarkeit in Bezug auf das Tumorkollektiv ähneln.



**Abbildung 30:** Die Dendrogramme A-C zeigen die Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse

Zuerst wurde eine statistische Analyse für alle zehn Antikörper durchgeführt. Einschlusskriterium für die Auswertung war, dass mindestens 80% interpretierbare Daten vorhanden sein mussten. Das Dendogramm A in Abbildung 30 zeigt, dass es zu einer Anordnung der Cytokeratine entsprechend ihrer Expressionsstärke (links: mäßig bis stark positive Anfärbung in der Mehrzahl der Fälle; rechts: schwache bzw. negative Anfärbung) gekommen ist. Da es jedoch noch zu keiner eindeutigen Subgruppen- bzw. Clusterbildung bei den Tumorproben kam, wurden als nächstes fünf Cytokeratine mit schwacher Expression (CK5, CK7, CK13, CK16, CK17) sowie CK18, welches eine starke ubiquitäre Expression in fast allen Proben zeigte, aus der Analyse herausgenommen. Diese Cytokeratine differenzierten unter 5% der Tumoren und waren deswegen für die Subgruppenbildung ungeeignet.

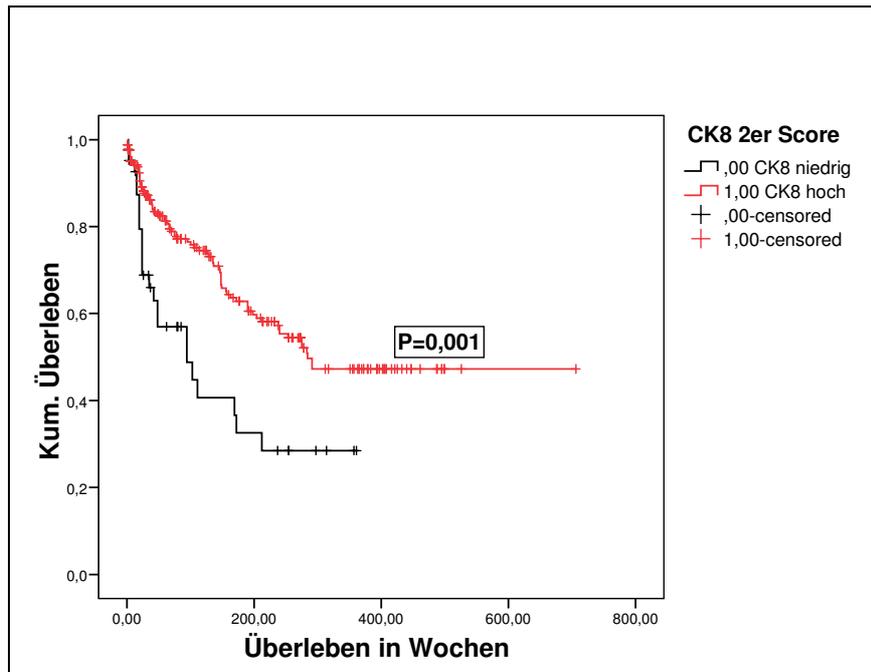
Mit den verbliebenen vier Antikörpern CK20, CK19, CK14 und CK8 konnten unter einer weiteren Clusteranalyse fünf größere Tumorgruppen differenziert werden. Diese verbliebenen Subgruppen zeichneten sich durch eine spezifische Antikörperexpression aus (Abbildung 30, B). Clustergruppe eins (gelb) wies eine negative Expression von CK20, CK19 und CK8 auf. Clustergruppe zwei (orange) hingegen hatte eine alleinige negative Ausprägung von CK8 (Abbildung 30, B). Clustergruppe drei (grün) fiel durch eine alleinige starke Expression von CK8 auf. Gruppe vier (blau) hatte eine zusätzliche Expression von CK20, Gruppe fünf (schwarz) eine zusätzliche Ausprägung von CK19. Das Dendogramm in Abbildung 30 C stellt einen vergrößerten Ausschnitt der gelben und orangen Clustergruppe dar. Das gelbe Cluster war durch ein extrem kurzes Überleben gekennzeichnet. Hier sind CK8 und CK20 stark vermindert exprimiert.

#### 4.4. Überlebensanalyse

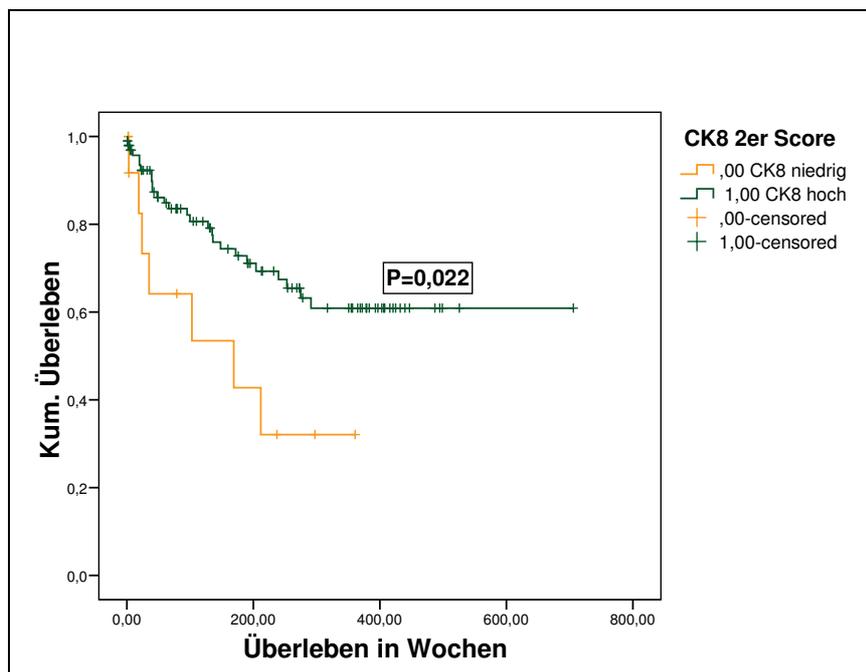
Mit der Kaplan-Meier-Analyse wurde das kumulative Überleben während der 706 Wochen berücksichtigt und mit den immunhistochemischen Ergebnissen verglichen. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten betrug 189 Wochen. Das krankheitsspezifische Überleben wurde zunächst für alle Gewebeproben (Metastasen und Primärtumore) analysiert, da für die einzelnen Tumorproben individuelle Überlebenszeiten existierten (siehe Material, 2.1.1).

Die statistische Analyse, dargestellt in Abbildung 31 zeigte, dass Proben mit einer Überexpression von CK8 eine signifikant längere Überlebenszeit der Patienten aufwiesen, als Proben mit schwacher CK8 Expression ( $p=0,001$ ). Zusätzlich wurde die Überlebensanalyse nur unter Berücksichtigung der Primärtumore durchgeführt. Zu dieser Auswertung wurde nur eine Tumorprobe pro Patient in die Berechnung eingeschlossen. Auch dabei war eine hohe CK8-Expression signifikant ( $p=0,022$ ) mit einem längeren Überleben assoziiert (Abbildung 32). Entsprechende Untersuchungen zeigten für CK14 lediglich einen Trend zu einem kürzeren Überleben bei starker Expression des Antigens (Abbildung 33 und 34).

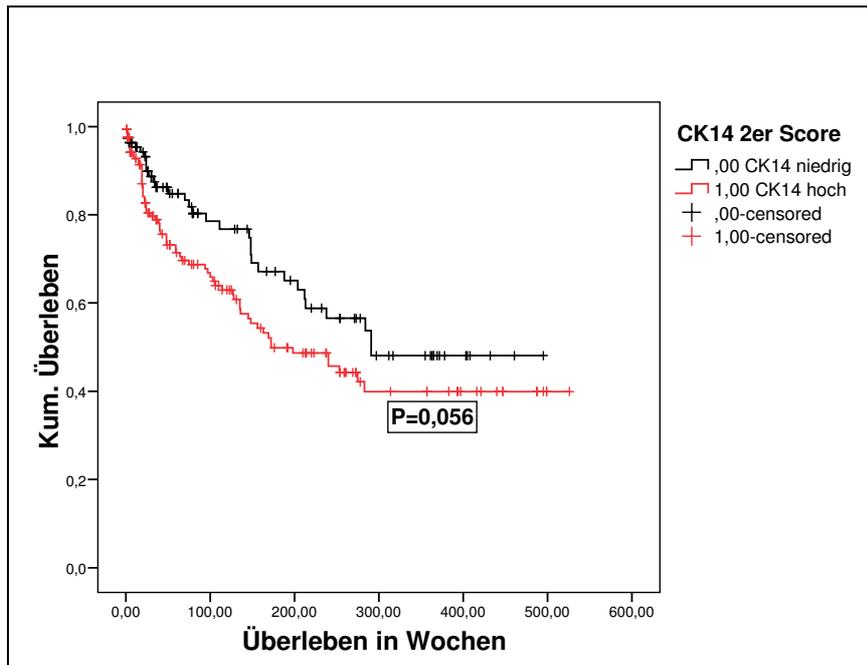
Alle anderen Antikörper zeigten keinerlei Signifikanz in Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben.



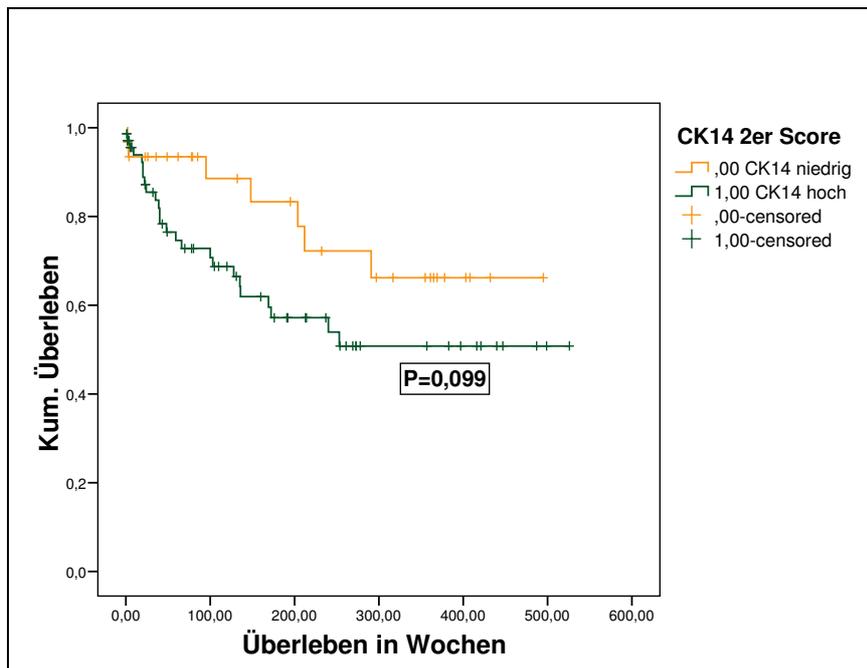
**Abbildung 31:** Langzeitüberleben in Wochen bei Expression von CK8 bezogen auf alle Tumortypen (n=468)



**Abbildung 32:** Langzeitüberleben in Wochen bei Expression von CK8 bei Analyse der Primärtumore (n=154)

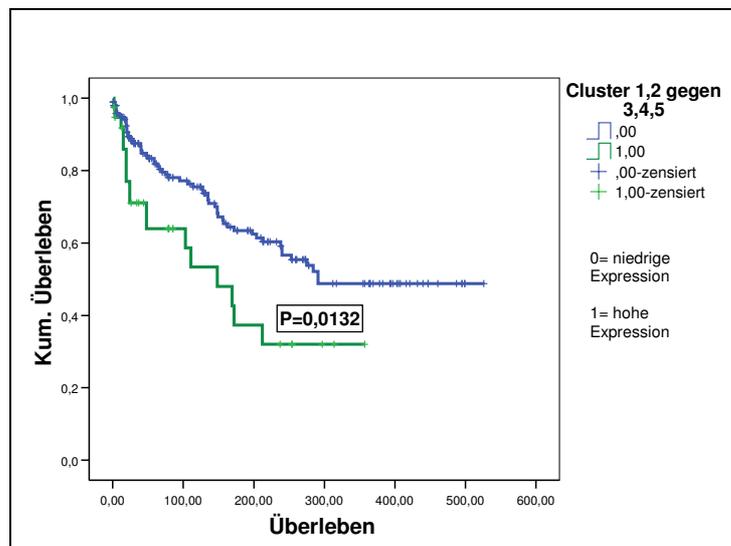


**Abbildung 33:** Langzeitüberleben in Wochen bei Expression von CK14 bezogen auf alle Tumorproben (n=468)

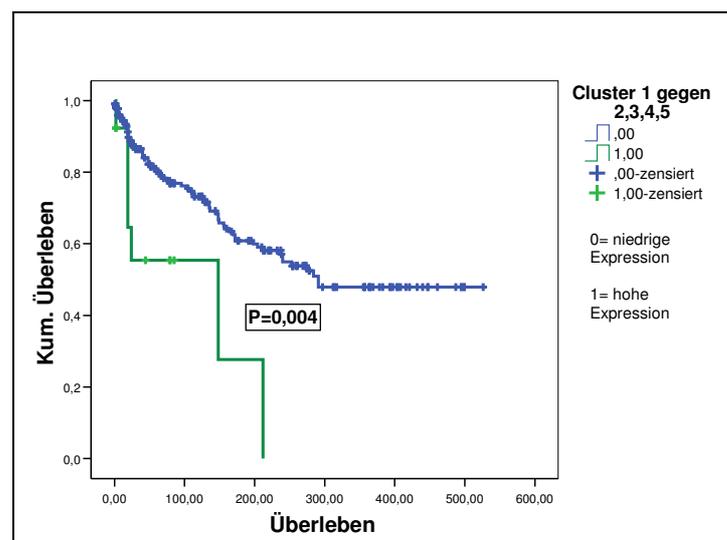


**Abbildung 34:** Langzeitüberleben in Wochen bei Expression von CK14 bei Analyse der Primärtumore (n=154)

Beim Vergleich der Clustergruppen eins und zwei mit den Clustergruppen drei bis fünf in Bezug auf das Überleben stellte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,013$ ) mit kürzerem Überleben in Clustergruppe eins und zwei heraus (Abbildung 35). Abbildung 36 zeigt einen weiteren Vergleich von Clustergruppe eins mit Clustergruppe zwei bis fünf. Hierbei zeigte sich eine noch höhere Signifikanz ( $p=0,004$ ), so dass die Gruppe eins als Cluster mit extrem kurzem Überleben bezeichnet wurde. Charakterisiert wird diese durch eine niedrige Expression von CK8, CK19 und CK20. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis aus der Überlebensanalyse für CK8 (Abbildung 31 und 32), bei dem eine hohe Expression von CK8 mit einem längeren Überleben korrelierte.

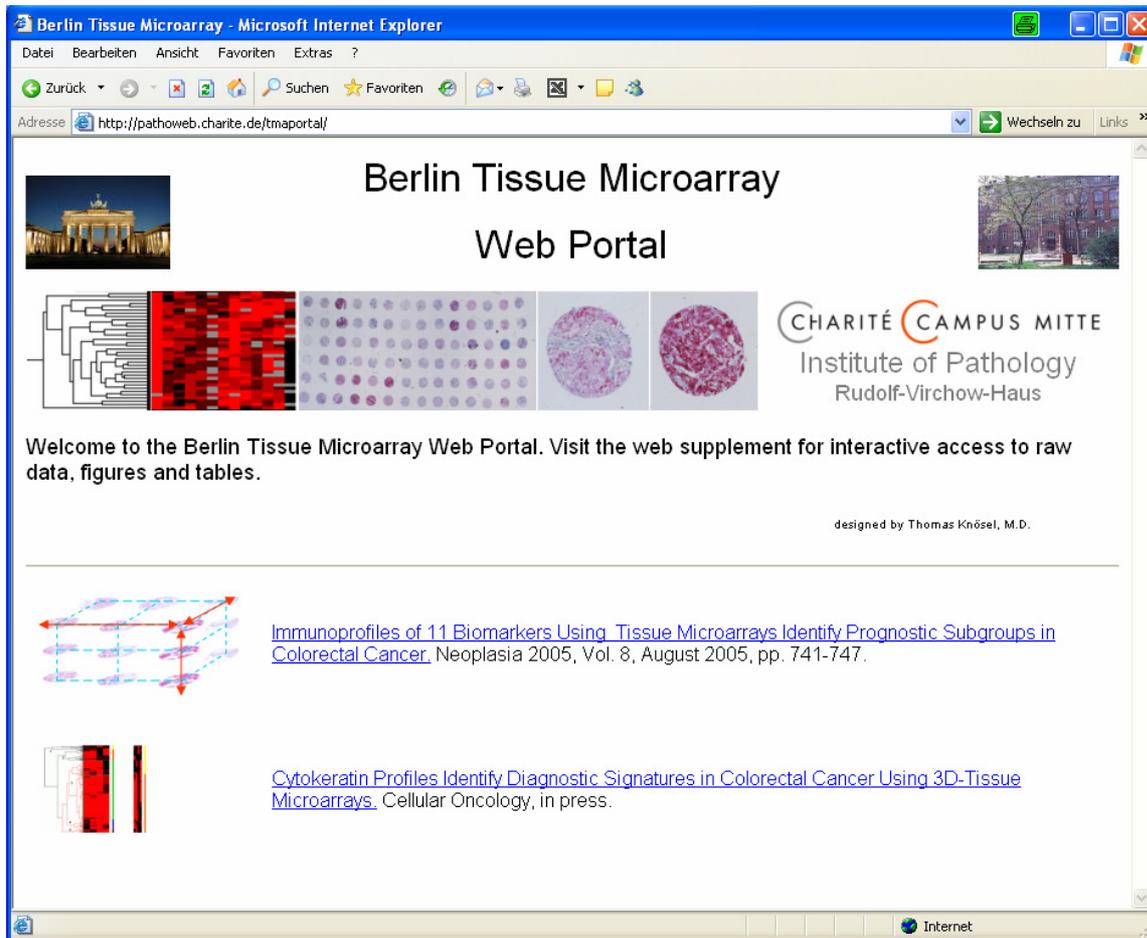


**Abbildung 35:** Vergleich des Überlebens in Wochen bei Clustergruppe 1, 2 gegen Clustergruppe 3, 4 und 5



**Abbildung 36:** Vergleich des Überlebens in Wochen bei Clustergruppe 1 gegen Clustergruppe 2, 3, 4 und 5

Typische Bilder die die Expression der Cytokeratine in kolorektalen Karzinomen darstellen, sind abrufbar auf der Berlin-TMA-Webseite.



**Abbildung 37:** Screenshot des TMA-Webportal <http://pathoweb.charite.de/tmaportal>

## 5. Diskussion

Diese Studie ist die erste zusammenfassende und größte Analyse verschiedener Cytokeratine in einem gut charakterisierten Tumorkollektiv kolorektaler Karzinome. Die immunhistochemischen Daten von insgesamt 2919 Gewebeproben wurden mit den klinikopathologischen Parametern verglichen. Ziel dieser Arbeit war 1) die Expression verschiedener Cytokeratine auf Proteinebene zu evaluieren 2) eine Korrelation zwischen klinikopathologischen Parametern und der Cytokeratinexpression zu erstellen und 3) die immunhistochemischen Daten anhand des hierarchischen Clusterings in mögliche Subgruppen mit spezifischen Signaturen zu unterteilen, die eine diagnostische oder prognostische Relevanz haben.

Methodisch wurden Tumor-Micro-Arrays (TMA) erstellt, die immunhistochemisch angefärbt wurden. Anhand eines Vierer-Scores (Score 0-keine Anfärbung, Score-1 schwache Anfärbbarkeit, Score 3-mäßige Anfärbbarkeit, Score 4-starke Anfärbbarkeit) wurden sie lichtmikroskopisch nach der Stärke ihrer Anfärbbarkeit beurteilt. Anschließend wurden die Daten statistisch ausgewertet und mittels der Cluster Analyse Subgruppen gebildet.

Es konnten Signaturen von Cytokeratinen gefunden werden, die als Biomarker möglicherweise diagnostische und prognostische Relevanz erlangen. Der Verlust von spezifischen Cytokeratinen ist dabei ein Hinweis auf eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) in der Tumorprogression kolorektaler Karzinome.

### 5.1. Methodik der Untersuchung

In dieser Studie wurden verschiedene Cytokeratine in einer Vielzahl kolorektaler Karzinomproben mittels der TMA-Technik und der IHC getestet. TMAs sind eine sehr gute und effektive Methode, um eine Vielzahl von Tumorproben aus einem gut charakterisierten Kollektiv zu untersuchen [Knösel et al., 2005]. Das Verfahren bietet die Möglichkeit alle Proben in gleicher Weise zu behandeln und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine Studie von Hsu et al. aus dem Jahre 2002 zeigte, dass sowohl für die Beurteilung der Sensitivität, als auch für die Spezifität der Anfärbung von diagnostisch eingesetzten Antikörpern, der TMA eine sehr effektive Methode ist. Dies konnte an einem gut charakterisiertes Tumorkollektiv gezeigt werden, welches anhand der TMA-Technik mit 22 verschiedenen Antikörpern ausgewertet wurde und die entsprechenden immunhistochemischen Ergebnisse mit schon publizierten Daten verglichen wurden.

Ein zusätzlicher Vorteil, der heutzutage eine zunehmende Bedeutung erlangt, ist die Tatsache, dass die Technik Zeit und Kosten spart [Simon et al., 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass die Gewebheterogenität keinen fundamentalen Einfluss auf die TMA-Ergebnisse hat, wenn eine genügend hohe Probenzahl analysiert wird [Nocito et al., 2001; Torhorst et al., 2001]. Die Verwendung von Serienschnitte reduziert vielmehr den Einfluss der Gewebheterogenität bei dem Vergleich unterschiedlicher Marker im gleichen Tumor, da davon ausgegangen werden kann, dass unmittelbar benachbarte Tumorabschnitte analysiert werden. Somit lässt sich ein Qualitätsstandard erreichen, der der konventionellen Immunhistologie am großflächigen Tumoreinzelschnitt zumindest gleichwertig, wenn nicht sogar überlegen ist.

Unsupervisiertes hierarchisches Clustern ermöglichte es, die kolorektalen Karzinomgewebeproben in verschiedene Subgruppen zu unterteilen. Dies erfolgte auf der Basis ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression. Die Studie von Makretsov et al., 2004 bestätigt die Wahl dieser Methode zur Detektion prognostischer Signaturen und zur Einteilung der Tumore in klinische relevante Subgruppen beim Mammakarzinom. Hinsichtlich der Kombination von TMA, Immunhistochemie und hierarchischen Clustern gibt es erst wenige Studien.

Die Auswertung der Daten erfolgte in verschiedenen Studien entweder anhand eines Dreier- oder Viererschemas, wobei es zur Zeit weder Für- noch Gegenargumente für

die jeweilige Einteilung gibt. In dieser Studie wurden die Proben in ein Viererschema eingeteilt. Die Daten wurden mittels der Cluster Analyse ausgewertet, wobei es zu einem signifikanten Ergebnis hinsichtlich eines kürzeren Überlebens bei CK8 Abnahme kam. Für die Einzelanalyse der vier Biomarker wurden die Daten von einem Viererscore in einen Zweierscore überführt: 0 beschreibt Proben mit fehlender bzw. sehr geringer Expression („low expression“ Gruppe), 1 Proben mit mäßiger bzw. starker Expression („high expression“ Gruppe). Hierbei wies CK8 ebenfalls ein signifikant kürzeres Überleben ( $p=0,022$ ) bei verminderter Expression auf.

## 5.2. Cytokeratinstruktur und epithelial-mesenchymale Transformation

Die Mechanismen, die zur Entstehung eines Karzinoms führen, sind derzeit Gegenstand vieler Forschungsgruppen. Bei der Karzinogenese ist die Veränderung der histologischen Struktur die Folge von molekularpathologischen Ereignissen. Diese bedingen bei der Tumorprogression einen kompletten Gewebsumbau, der in der Literatur mit der Morphogenese in der embryonalen Entwicklung verglichen wird [Brabletz et al., 2005]. Ein Kennzeichen der embryonalen Entwicklung ist, dass Zellpopulationen aktiv Cytoskelettproteine herauf- bzw. herunterregulieren können, so dass in verschiedenen Phasen dieser Entwicklung ein verändertes Cytokeratinmuster gefunden werden kann [Fouquet et al., 1988]. Weiterhin sind sie in der Lage ihre normale Umgebung zu verlassen und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren

Diese Vorgänge der Embryogenese sollen bei der Tumorprogression auch wieder vollzogen werden [Savagner, 2001]. Brabletz et al. zeigten in ihrer Studie 2002, dass auch Signalwege, wie zum Beispiel der Wnt-Signalweg, der an der frühen embryonalen Entwicklung beteiligt ist, bei der Karzinomentstehung mit betroffen bzw. pathologisch verändert sind [Brabletz et al., 2002].

Diese molekularpathologischen Ereignisse bedingen einen Gewebsumbau, der zu einem Verlust des epithelialen Phänotyps hin zu einem mesenchymalen führt und als epithelial-mesenchymale Transformation (EMT) bezeichnet wird. Dabei werden  $\beta$ -Catenin [Brabletz et al., 2005] und E-Cadherin [Bates, Mercurio, 2005] eine entscheidende Funktion in der Initialisierung zugesprochen. Brabletz et al. zeigten 2005 in ihrer Studie, dass die Dedifferenzierung zu einem mesenchymalen Phänotyp besonders an der Invasionsfront der Primärtumoren und auch der Metastase zu beobachten ist. Diese Dedifferenzierung steht dabei in Zusammenhang mit einer höheren Aggressivität des Tumors.

In dieser Studie zeigte sich bei Abnahme von Cytokeratin 8 ein signifikant kürzeres Überleben aufgrund einer Tumorprogression. Diese Herunterregulierung von CK8 und das damit verbundene verkürzte Überleben ist möglicherweise Ausdruck einer EMT beim kolorektalen Karzinom.

Chu und Weiss hingegen gehen in ihrer Studie von 2002 davon aus, dass verschiedene Epithelien bestimmte Cytokeratinmuster aufweisen und diese charakteristischen Merkmale meist auch bei einer malignen Transformation beibehalten. Dabei

beschreiben sie bei kolorektalen Karzinomen ein CK7 negatives, CK20 positives Muster sowie eine Ausprägung des Cytokeratinpaares CK8/18. Die These wird durch die Ergebnisse der Studie von Fujisaki und Shimoda von 1993 inhaltlich gestützt, die das Vorkommen gleicher Cytokeratine jeweils in normaler Mukosa, in Adenomen und Karzinomen nachweisen konnte. Diese beiden Studien zeigen damit eine Konstanz der Cytokeratinexpression in normaler Mukosa bis hin zur malignen Transformation.

Insofern wäre es sehr interessant zu klären, ob der CK8 Verlust ab initio vorlag oder erst im Rahmen der Tumorprogression entstanden ist. Nur wenn letzteres der Fall wäre, könnte der CK8 Verlust als Marker für eine EMT gewertet werden.

Als vorläufiges Fazit kann festgehalten werden, dass zwar eine völlige Umstrukturierung des Gewebes bei der Karzinogenese erfolgt, jedoch die Veränderung des spezifischen Cytokeratinmusters in den einzelnen Phasen der Dedifferenzierung und dessen Rolle hinsichtlich der Tumoraggressivität noch nicht eindeutig geklärt ist und somit weitere Studien erfordern.

### **5.3. Cytokeratine als Markerproteine**

#### **5.3.1. CK20**

CK20 ist ein wichtiges Markerprotein der Kolonkarzinome, dass bei der Identifizierung von Metastasen unbekannter Primärtumore eingesetzt wird [Ye X et al., 2002]. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Daten erwies sich CK20 in 90,3% der Kolonkarzinomproben als positiv (66,3% stark positiv Score 3, 13% positiv Score 2 und 11% schwach positiv Score 1). Nur die CK20 negative Subgruppe war assoziiert mit einem extrem kurzen Überleben. Diese Subgruppe repräsentiert einen Zellklon mit einem sehr hohen aggressiven Potential. Diese Beobachtung einer CK20 negativen Subgruppe entspricht einer Minderheit.

Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Arbeit von Park et al. 2002 und Moll et al. 1992. In der Studie von Moll et al. waren die große Mehrheit der Adenokarzinome des Kolons CK20 positiv, hingegen Adenokarzinome aus Brust, Lunge, Endometrium und nichtmuzinöse Tumore des Ovar hingegen fast oder komplett negativ. Als Fazit dieser Studie propagiert er den Einsatz von CK20 als Markerprotein für Metastasen unbekannter Primärtumore, wie es derzeit in der Primärtumorsuche angewandt wird.

Kummar et al. beschrieben 2002 in ihrer Studie die Cytokeratinausprägung bei Adenokarzinomen der Lunge im Vergleich zu denen des Kolons. Das Ergebnis dieser Studie war ein CK20 negativ/CK7 positiv Muster bei Metastasen und Primärtumoren von Adenokarzinomen der Lunge im Gegensatz zu dem CK20 positiv/CK7 negativ Muster von Adenokarzinomen des Kolons.

In Hinsicht auf CK20 als Identifikations-Markerprotein für Metastasen unbekannter Primärtumore ist es sehr wichtig zu wissen, dass aggressive Tumorzellklone vom Kolon ihre CK20 Expression verlieren können und damit mit diesem Marker der Erkennung nicht mehr zugänglich sind.

#### **5.3.2. CK8/CK18**

Dies ist die erste Studie die zeigt, dass eine verminderte Expression von CK8 signifikant ( $p=0,022$ ) mit einem kürzeren Überleben bei kolorektalen Karzinomen assoziiert ist. Interessanterweise stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der Studie von Takei et al. von 1995. Dieser zeigte anhand von invasiven Brustkrebstumoren, dass CK8 negative Tumore ein schlechteres Ergebnis im rückfallfreien Intervall haben. Hierbei wurde CK8

die Bedeutung eines prognostischen Markers bei invasiven Brustkarzinomen zugeschrieben, was anhand der in dieser Doktorarbeit erhobenen Ergebnisse auch für Kolonkarzinome gelten kann.

Buhler et al. zeigte 2005, dass ein erhöhtes CK18 mit einem besseren Langzeitüberleben bei Brustkrebs korreliert sowie bei dessen Abnahme die Aggressivität des Tumors zunimmt. CK18 forciert in menschlichen Brustkrebszellen eine Induktion von Adhäsionsproteinen, eine Dimerisation mit CK8 und eine Abnahme der Malignität in vitro und in vivo.

Auch Schaller et al. zeigten in ihrer Studie 1996, anhand von Brustkrebszelllinien und Patientinnen mit Brustkrebs, dass eine Abnahme von Cytokeratin 18 mit einem signifikant kürzerem Überleben assoziiert ist. Dabei war CK18 ein unabhängiger und signifikanter Marker für das Gesamtüberleben. Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass CK18 häufig mit CK8 koexprimiert wird. Dies belegt auch die Studie von Woelfle et al. (2004) bei der eine Korrelation zwischen Verminderung von CK18, höherem Tumorstadium und Tumorprogression gezeigt werden konnte.

Es ist anzunehmen, dass die Anwesenheit bestimmter Cytokeratine, speziell von CK8 bei CRC, in der Lage ist das Cytoskelett zu stabilisieren und dadurch der Progression und der Metastasierung entgegenwirken.

### **5.3.3. CK14**

CK14 wird gewöhnlich im Basalzellepithel und squamösem Epithel exprimiert. Hingegen ist er in Adenokarzinomen generell negativ [Chu, Weiss, 2002] Harnden postulierte 1997 in seiner Studie CK14 als Marker für einen Phänotypwechsel beim Transitionalzellkarzinom einzusetzen, da er sensitiver als eine alleinige morphologische Auswertung ist. Interessanterweise zeigte CK14 in dieser Studie einen Trend zum kürzeren Überleben ( $p=0,056$ ), was durch weitere Studien an einem noch größeren Kollektiv abgesichert werden sollte.

Zusammenfassend zeigte die Arbeit, dass Cytokeratine in kolorektalen Karzinomen differentiell exprimiert werden und potentiell in der eine Rolle spielen. Die Progenitor- und Stammzellmarker sind derzeit Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Weitere Studien werden zeigen, inwieweit Cytokeratine als Prognosemarker des kolorektalen Karzinoms geeignet sind.

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war 1) Kolonkarzinomgewebe auf die Expression verschiedener Cytokeratinstrukturen auf Proteinebene zu untersuchen, 2) eine Korrelation zwischen klinikopathologischen Parametern und der Cytokeratinexpression zu erstellen und 3) das unsupervisierte hierarchische Clustering in Kombination mit dem TMA-Verfahren als neue Methode zur Bestimmung von Immunprofilen zu testen. Hierbei diente das hierarchische Clustering dazu, Subgruppen mit spezifischen Signaturen herauszuarbeiten, die möglicherweise eine diagnostische und prognostische Relevanz für das Langzeitüberleben haben.

Das Kollektiv umfasste 203 Patienten, von denen 475 Gewebeproben analysiert wurden, die Primärtumore, Metastasen und Normalgewebe repräsentierten. Die Gewebeproben wurden immunhistochemisch mit 10 Antikörpern gegen die Cytokeratine 20, 19, 18, 17, 16, 14, 13, 8, 7 und 5 gefärbt und mittels eines Vierer-Scores (0, 1, 2, 3) anhand ihrer Expressionsstärke von negativ (Score 0) bis stark positiv (Score 3) ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit Kreuztabellen, dem Fisher's Exact Test und dem Kaplan-Meyer-Test. Eine unsupervisierte hierarchische Clusteranalyse wurde zur Auswertung von 2919 immunhistochemischen Daten herangezogen. Sie diente der Unterteilung der Daten in Subgruppen mit spezifischen Signaturen.

Beim unsupervisierten hierarchischen Clustering kristallisierten sich fünf Subgruppen mit charakteristischer Expression von vier Biomarkern (CK20, CK19, CK14 und CK8) heraus. Clustergruppe eins und zwei waren hierbei durch eine negative Expression von CK8 repräsentiert, wobei Clustergruppe eins eine zusätzlich negative Expression von CK20 aufwies. Beide Clustergruppen zeigten eine signifikante Korrelation zu einem kürzeren Überleben. Clustergruppe eins wies sogar einen noch höheren Signifikanzwert ( $p=0,004$ ) auf und war mit einem besonders schlechten Überleben assoziiert.

In der Einzelanalyse der vier Biomarker zeigte sich ein signifikant kürzeres Überleben bei Patienten mit einem Verlust der CK8 Expression ( $p=0,001$ ). Bei multivariater Analyse, nach Herausnahme von Tumorstadium und Grading, zeigte CK8 eine höhere Signifikanz ( $p=0,004$ ) als der Lymphknotenstatus. In der Gesamtauswertung hingegen war er kein unabhängiger Marker. CK14 hingegen zeigte einen Trend ( $p=0,056$ ) zum kürzeren Überleben bei Überexpression.

Der Verlust der Expression bestimmter Cytokeratine, insbesondere CK8, ist Hinweis auf eine mögliche epithelial-mesenchymale Transformation im Rahmen der Tumorprogression von kolorektalen Karzinomen.

Insgesamt erwies sich das TMA-Verfahren als geeignete Methode zur Untersuchung von immunhistochemischen Daten sowie die Clusteranalyse als geeignetes Verfahren zur Erstellung von prognostischen und diagnostischen Signaturen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Rahman WM, Peltomaki P. *Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers*. Ann Med. 2004;36(5): p. 379-88. Review
2. Alberts, Bruce. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Wiley-VCH, 2005. p.607-633
3. AWMF Leitlinien, Kolorektales Karzinom, 2004; <http://leitlinien.net/>
4. Bates RC, Mercurio AM. *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression*. Cancer Biol Ther 2005. 4(4): p. 365-70.
5. Bockelmann D, Drüner HU, Schulz U. Klinik und Prognose der Kolon- und Rektumkarzinome. Dtsch Med Wochenschr, 1972. 97: p.1590
6. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. *Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs 2005. 179(1-2): p. 56-65.
7. Brabletz T, Jung A, Kirchner T. *Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer*. Virchows Arch. 2002. 441(1): p.1-11. Review.
8. Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. *Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis*. Gastroenterology 1996. 110(2): p. 331-8.
9. Buhler H, Schaller G. *Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo*. Mol Cancer Res 2005. 3(7): p. 365-71.

10. Caldes T, Godino J, Sanchez A, et al. *Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer*. *Oncol Rep*. 2004;12(3): p.621-9.
11. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, et al. *CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer*. *Tumour Biol*. 2004;25(5-6): p.228-34.
12. Chung DC, Rustgi AK. *The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications*. *Ann Intern Med*. 2003;138(7): p.560-70. Review.
13. Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. *The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer*. *Am J Surg* 1998. 175(3): p. 198-202.
14. Charames GS, Bapat B. *Genomic instability and cancer*. *Curr Mol Med*. 2003; 3(7): p.589-96. Review.
15. Chu PG, Weiss LM. *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. *Histopathology* 2002. 40(5): p. 403-39.
16. Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. *Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up*. *Cancer* 2004. 100(2): p. 288-93.
17. Colbert LH, Hartman TJ, Malila N, et al. *Physical activity in relation to cancer of the colon and rectum in a cohort of male smokers*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001. 10(3): p. 265-8.
18. Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL. *Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention*. *Cancer Causes Control* 1997. 8(4): p. 649-67.

**19.** Deutsche Krebshilfe:

<http://www.krebshilfe.de/neu/infoangebot/geschaeftsbericht/geschaeftsbericht-2005.pdf> p. 55.

**20.** DeLellis RA, Kwan P. *Technical considerations in the immunohistochemical demonstration of intermediate filaments*. Am J Surg Pathol. 1988;12 Suppl 1: p. 17-23.

**21.** Douillard JY; V-303 Study Group. *Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer*. Oncology (Williston Park). 2000 Dec;14(12 Suppl 14): p. 51-5. Review.

**22.** Dregoes D, Rybak AP, Rainbow AJ. *Increased expression of p53 enhances transcription-coupled repair and global genomic repair of a UVC-damaged reporter gene in human cells*. DNA Repair. (Amst), [Epub ahead of print] 2006

**23.** Eckardt VF, Bernhard G. *Nachsorge beim kolorektalen Karzinom. Eine Analyse von Effektivität und Kosten*. Deutsches Ärzteblatt 1997; 94: p. A456-462.

**24.** Edwards BK, Brown ML, Wingo PA. *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment*. J Natl Cancer Inst 2005. 97(19): p. 1407-27.

**25.** Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 1990. 61(5): p. 759-67.

**26.** Fouquet B, Herrmann H, Franz JK, Franke WW. *Expression of intermediate filament proteins during development of Xenopus laevis. III. Identification of mRNAs encoding cytokeratins typical of complex epithelia* Development. 1988;104(4): p.533-48.

**27.** Fujisaki J, Shimoda T. *Expression of cytokeratin subtypes in colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma*. Gastroenterol Jpn 1993. 28(5): p. 647-56.

28. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. *Aspirin and the risk of colorectal cancer in women*. N Engl J Med 1995. 333(10): p. 609-14.
29. Grady WM. *Genomic instability and colon cancer*. Cancer Metastasis Rev. 2004;23(1-2): p.11-27. Review.
30. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. *Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis*. Am J Med 1999. 106(5): p. 574-82.
31. Hamilton SR, Altonen LA. *Tumors of the digestive system. Pathology and genetics. World Health Organisation Classification of Tumors 2000*. IARC press Lyon, France
32. Harnden P, Southgate J. *Cytokeratin 14 as a marker of squamous differentiation in transitional cell carcinomas*. J Clin Pathol 1997. 50(12): p. 1032-3.
33. Heath CW Jr, Thun MJ, Greenberg ER, Levin B, Marnett LJ. *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and human cancer. Report of an interdisciplinary research workshop*. Cancer 1994. 74(10): p. 2885-8.
34. Hermanek P, Hermanek PJ. *Role of the surgeon as a variable in the treatment of rectal cancer*. Semin Surg Oncol 2000. 19(4): p. 329-35.
35. Hsu FD, Nielson TO, Alkushi A, et al. *Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry*. Mod Pathol 2002. 15(12): p. 1374-80.
36. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. *Genetic pathways in colorectal and other cancers*. Eur J Cancer. 1999;35(14): p.1986-2002. Review.

37. Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliövaara M. *Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study*. Br J Cancer 2001. 85(3): p. 357-61.
38. Jass JR. *Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype*. Nat Clin Pract Oncol. 2005. 2(8): p. 398-405.
39. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J Clin. 2006. 56(2): p. 106-30.
40. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, et al. *Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers*. Science, 1991. 251: p.1366-70
41. Knoesel T, Emde A, Schluns K, et al. *Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer*. Neoplasia, 2005. 7(8): p. 741-7.
42. Knoesel T, Schluens K, Stein U, et al. *Alterations during Lymphatic and Liver Metastasis Formation of Colorectal Cancer*. Neoplasia, 2004. 6.(1): p.. 23-28
43. Knoesel T, Schluns K, Stein U, et al. *Genetic imbalances with impact on survival in colorectal cancer patients*. Histopathology. 2003 Oct;43(4): p. 323-31.
44. Krebsregister Saarland:  
[http://www.krebsregister.saarland.de/publikationen/PDF/Krebs\\_im\\_Saarland.pdf](http://www.krebsregister.saarland.de/publikationen/PDF/Krebs_im_Saarland.pdf):  
[p. 76-79](#); 92-95
45. Kummar S, Fogarasi M, Canova A, Mota A, Ciesielski T. *Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma*. Br J Cancer 2002. 86(12): p. 1884-7.

46. La Vecchia C, Negri E, Decarli A, Franceschi S. *Diabetes mellitus and colorectal cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997. 6(12): p. 1007-10.
47. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, et al. *Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC*. *Nat Genet* 1997. 17(1): p. 79-83.
48. Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, et al. *Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene MLH3: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers*. *Hum Mutat.* 2001;17(5): p.389-96.
49. Longnecker MP. *A case-control study of alcoholic beverage consumption in relation to risk of cancer of the right colon and rectum in men*. *Cancer Causes Control* 1990. 1(1): p. 5-14.
50. Louhimo J, Carpelan-Holmstrom M, Alfthan H, et al. *Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer*. *Int J Cancer.* 2002; 101(6): p.545-8.
51. Makretsov NA, Huntsman DG, Nielsen TO, et al. *Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma*. *Clin Cancer Res* 2004. 10(18 Pt 1): p. 6143-51.
52. Moll R. *Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors*. *Subcell Biochem.* 1998;31: p. 205-62. Review.
53. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. *Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies*. *Am J Pathol* 1992. 140(2): p. 427-47.
54. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. *The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia, tumor and culture cells*. *Cell* 1982; 31; p. 11-24

- 
55. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research*. Int J Cancer 2001. 94(1): p. 1-5.
56. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. J Natl Cancer Inst 2004. 96(19): p. 1420-5.
57. Park JG, Kim IJ. *Hereditary colorectal cancer*. Korean J Gastroenterol. 2005. 45(2): p.78-87. Review. Korean.
58. Park SY, Kim HS, Hong EK, Kim WH. *Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary*. Hum Pathol 2002. 33(11): p. 1078-85.
59. Robert-Koch-Institut: [www.rki.de](http://www.rki.de)
60. Rosai, Ackermann. *Rosai & Ackermann's surgical Pathology 9<sup>th</sup> Edition, Volume 1*. Elsevier, Morby, 2004. p. 56
61. Ruf G, Hopt U, Otto F, et al., *Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Kolorektales Karzinom. Tumorzentrum Freiburg am Universitätsklinikum*. 4. Auflage 2005. p. 6
62. Sauer R. *Adjuvant versus neoadjuvant combined modality treatment for locally advanced rectal cancer: first results of the German rectal cancer study (CAO/ARO/AIO-94)*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 57: p. 124-125.
63. Savagner P. *Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition*. Bioessays 2001. 23(10): p. 912-23.

64. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, et al. *Elevated keratin 18 protein expression indicates a favourable prognosis in patients with breast cancer*. Clin Cancer Res 1996. 2(11): p. 1879-85.
65. Schlag M, Kretschmar A, Koswig ST, et al. Projektgruppe Gastrointestinale Tumoren: *Kolorektale Karzinome, Empfehlung zur Diagnostik und Therapie*; 3. überarbeitete Auflage 2006. p. 5-26.
66. Schmiegel W, Pox C, Adler G, et al. *S3-guideline conference "Colorectal Cancer" 2004*. Dtsch Med Wochenschr. 2005;130 Suppl 1: p. 5-53. Review.
67. Schmoll, Höffken, Possinger. *Kompendium internistischer Onkologie Band 1-3. Standards in Diagnostik und Therapie*. 4. überarbeitete Auflage, Springer, 2006. p. 3786-3937
68. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. *Tissue microarrays*. Methods Mol Med 2005. 114: p. 257-68.
69. Slattery ML, Berry TD, Potter J, Caan B. *Diet diversity, diet composition, and risk of colon cancer (United States)*. Cancer Causes Control, 1997. 8(6): p. 872-82.
70. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. *Eating patterns and risk of colon cancer*. Am J Epidemiol 1998. 148(1): p. 4-16.
71. Slentz K, Senagore A, Hibbert J, Mazier WP, Talbott TM. *Can preoperative and postoperative CEA predict survival after colon cancer resection?* Am Surg 1994. 60(7): p. 528-31; 531-2.
72. Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, et al. *Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations*. South Med J. 1991; 84(5): p.575-8.

73. Statistisches Bundesamt Deutschland: [www.destatis.de](http://www.destatis.de)  
<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php>
74. Steinert PM, Liem RK. *Intermediate filament dynamics*. Cell 1990; 60; p. 521-523
75. Sternfeld T, Foss HD, Kruschewski M, Runkel N. *The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer*. Int J Colorectal Dis 1999. 14(6): p. 272-6.
76. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. *Dove WF Multiple intestinal neoplasia caused by mutation in the murine homolog of the APC gene*. Science 1992. 256: p.668-70
77. Takei H, Iino Y, Horiguchi J, et al. *Immunohistochemical analysis of cytokeratin 8 as a prognostic factor in invasive breast carcinoma*. Anticancer Res 1995. 15(3): p. 1101-5.
78. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. Am J Pathol 2001. 159(6): p. 2249-56.
79. Ueda E, Watanabe T, Ishigami H, et al. *Microsatellite instability of colorectal cancer and adenoma in synchronous multiple colorectal cancer patients with associated extracolonic malignancies*. Surg Today 2001.31(5): p. 405-9.
80. van de Rijn M, Gilks CB. *Applications of microarrays to histopathology*. Histopathology 2004. 44(2): p. 97-108.
81. Wang JY, Wang YH, Jao SW, et al. *Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene*. Oncol Rep. 2006. 16(6): p.1245-52.

- 
- 82.**Welsch, Ulrich. *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* Welsch/Sobotta, 2., völlig überarbeitete Auflage, Urban & Fischer, 2006. p.63-70
- 83.**Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. *Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer.* Clin Cancer Res 2004. 10(8): p. 2670-4.
- 84.**Wittekind, Meyer, Bootz, *TNM 6. Auflage*, Springer Verlag, 2002. p.66-71.
- 85.**Ye X, Li Y, Hou G, Liu Z, Chen T. *Significance of cytokeratin gene (CK-20 mRNA) expression in metastatic lymph nodes in colon carcinoma patients.* Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2002. 24(3): p. 261-3.

## **8. Anhang**

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Lebenslauf

Danksagung

Erklärung

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous polyposis coli Gen
APR	Abdominoperineale Rektumexstirpation
Aqua des.	Destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	Annähernd, etwa
CEA	Carcino-Embryonal-Antigen
CGH	Vergleichende (comparative) genomische Hybridisierung
CK	Cytokeratin
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
2D/3D	2/3-dimensional
DNA	Dinukleotidacid
EGFR	epidermal growth receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transformation
Et al.	und andere
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FDG	Fluorodesoxyglucose
5-FU	5-Fluorouracil
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HNPCC	Hereditäre nonpolypöse kolorektale Karzinome
IHC	Immunhistochemie
mRNA	messenger RNA
MTOC	Mikrotubulusorganisationszentrum
Nn.	Nervi (Nerven)
Nr.	Nummer
PET	Positronenemissionstomographie
RIS	Radioimmunszintigraphie
RNA	Ribonukleinsäure
TBS	Tris-buffered saline
Tcf	T-Zell-Transkriptionsfaktor
TMA	Tumormikroarray
TME	Totale Mesorektumexzision
pTNM,G	postoperative histologische Erweiterung der Tumordifferenzierung, Nodalstatus, Metastasierung, Grading Klassifizierung
UICC	Union international Contre le Cancer
UV	ultraviolett
VEGF	vascular epithel growth factor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

## Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b>	GESCHÄTZTE ZAHL DER JÄHRLICHEN NEUERKRANKTEN NACH KREBSARTEN UND GESCHLECHT (GESCHÄFTSBERICHT DEUTSCHE KREBSHILFE, 2005) .....	1
<b>ABBILDUNG 2:</b>	VERLAUF DER TUMORPROGRESSION DES KOLONKARZINOMS MODIFIZIERT NACH FEARON UND VOGELSTEIN 1990 .....	4
<b>ABBILDUNG 3:</b>	GENETISCHES MODELL ZUR ENTSTEHUNG DES CRC [ILYAS ET AL., 1999; AUS SCHMOLL, HÖFFKEN, POSSINGER, 2006] .....	5
<b>ABBILDUNG 4:</b>	CHROMOSOMALES PROGRESSIONSMODELL DES KOLOREKTALEN KARZINOMS [KNÖSEL ET AL., 2004].....	6
<b>ABBILDUNG 5:</b>	ZEITLICHER VERLAUF DER KLASSIFIKATION DES CRC UND DEREN UNTERSCHIEDE [SCHMOLL, HÖFFKEN, POSSINGER, 2006] .....	9
<b>ABBILDUNG 6:</b>	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MOLEKULAREN STRUKTUR UND DER ANORDNUNG DER MIKROTUBULI IN DER EUKARYOTEN ZELLE [MODIFIZIERT AUS ALBERTS ET AL., MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE, DE GRUYTER, 2005].....	17
<b>ABBILDUNG 7:</b>	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MOLEKULAREN STRUKTUR UND ANORDNUNG DER MIKROFILAMENTE IN DER EUKARYOTEN ZELLE [MODIFIZIERT AUS ALBERTS ET AL., MOLEKULAR- BIOLOGIE DER ZELLE, DE GRUYTER, 2005].....	17
<b>ABBILDUNG 8:</b>	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MOLEKULAREN STRUKTUR UND DER ANORDNUNG DER INTERMEDIÄRFILAMENTE IN DER EUKARYOTEN ZELLE [MODIFIZIERT AUS ALBERTS ET AL., MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE, DE GRUYTER, 2005].....	18
<b>ABBILDUNG 9:</b>	EINTEILUNG DER CYTOKERATINE [AUS ROSAI & ACKERMANN`S, SURGICAL PATHOLOGY, ELSEVIER, 2004].....	20
<b>ABBILDUNG 10:</b>	MOLEKULARER AUFBAU VON INTERMEDIÄR BZW. CYTOKERATINFILAMENTEN [AUS ALBERTS ET AL., MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE, DE GRUYTER, 2005] .....	21
<b>ABBILDUNG 11:</b>	BEECHER INSTRUMENTS MICRO-ARRAY STANZGERÄT .....	29
<b>ABBILDUNG 12:</b>	TMA-OBJEKTTRÄGER NACH DER FÄRBUNG MIT DEM CK8-ANTIKÖRPER.....	29
<b>ABBILDUNG 13:</b>	CK8 ANFÄRBUNG NEGATIV=0 .....	33
<b>ABBILDUNG 14:</b>	CK8 ANFÄRBUNG SCHWACH=1 .....	33
<b>ABBILDUNG 15:</b>	CK8 ANFÄRBUNG MÄßIG=2.....	33
<b>ABBILDUNG 16:</b>	CK8 ANFÄRBUNG STARK=3 .....	33
<b>ABBILDUNG 17:</b>	ALTERSVERTEILUNG DER PATIENTEN .....	36
<b>ABBILDUNG 18:</b>	VERTEILUNG DER TUMORLOKALISATION UND HÄUFIGKEIT (N=203) .....	37
<b>ABBILDUNG 19:</b>	VERTEILUNG PRIMÄRTUMORSTADIUM (N=203) .....	38
<b>ABBILDUNG 20:</b>	VERTEILUNG NODALSTATUS (N=203) .....	38
<b>ABBILDUNG 21:</b>	VERTEILUNG METASTASIERUNG (N=203) .....	38
<b>ABBILDUNG 22:</b>	VERTEILUNG GRADING (N=203).....	38
<b>ABBILDUNG 23:</b>	TUMORLOKALISATION UND TUMORAUSSDEHNUNG (N=203) .....	39
<b>ABBILDUNG 24:</b>	TUMORLOKALISATION UND LYMPHKNOTENSTATUS (N=203) .....	39
<b>ABBILDUNG 25:</b>	TUMORLOKALISATION UND HÄMATOGENE METASTASIERUNG (N=203) .....	39
<b>ABBILDUNG 26:</b>	TUMORLOKALISATION UND GRADING (N=203).....	39

---

<b>ABBILDUNG 27:</b>	STÄRKE DER CK20 ANFÄRBUNG BEI VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE (N=154).....	41
<b>ABBILDUNG 28:</b>	STÄRKE DER CK14 ANFÄRBUNG BEI VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE (N=154).....	42
<b>ABBILDUNG 29:</b>	STÄRKE DER CK8 ANFÄRBUNG BEI VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE (N=154).....	43
<b>ABBILDUNG 30:</b>	DIE DENDOGRAMME A-C ZEIGEN DIE ERGEBNISSE DER HIERARCHISCHEN CLUSTERANALYSE .....	46
<b>ABBILDUNG 31:</b>	LANGZEITÜBERLEBEN IN WOCHEN BEI EXPRESSION VON CK8 BEZOGEN AUF ALLE TUMORPROBEN (N=468) .....	49
<b>ABBILDUNG 32:</b>	LANGZEITÜBERLEBEN IN WOCHEN BEI EXPRESSION VON CK8 BEI ANALYSE DER PRIMÄRTUMORE (N=154) .....	49
<b>ABBILDUNG 33:</b>	LANGZEITÜBERLEBEN IN WOCHEN BEI EXPRESSION VON CK14 BEZOGEN AUF ALLE TUMORPROBEN (N=468) .....	50
<b>ABBILDUNG 34:</b>	LANGZEITÜBERLEBEN IN WOCHEN BEI EXPRESSION VON CK14 BEI ANALYSE DER PRIMÄRTUMORE (N=154) .....	50
<b>ABBILDUNG 35:</b>	VERGLEICH DES ÜBERLEBENS IN WOCHEN BEI CLUSTERGRUPPE 1, 2 GEGEN CLUSTERGRUPPE 3, 4 UND 5 .....	51
<b>ABBILDUNG 36:</b>	VERGLEICH DES ÜBERLEBENS IN WOCHEN BEI CLUSTERGRUPPE 1 GEGEN CLUSTERGRUPPE 2, 3, 4 UND 5.....	51
<b>ABBILDUNG 37:</b>	SCREENSHOT DES TMA-WEBPORTAL <a href="http://pathoweb.charite.de/tmaportal">HTTP://PATHOWEB.CHARITE.DE/TMAPORTAL</a> .....	52

## Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b>	ZEHN HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN IN DEUTSCHLAND, 2005 .....	2
<b>TABELLE 2:</b>	TNM-KLASSIFIKATION DES KOLONKARZINOMS [NACH WITTEKIND, MEYER, BOOTZ, TNM 6. AUFLAGE; SPRINGER VERLAG, 2002] .....	8
<b>TABELLE 3:</b>	GEGENÜBERSTELLUNG UICC/AJCC, TNM UND DUKES KLASSIFIKATION .....	9
<b>TABELLE 4:</b>	UICC/AJCC STAGING, TNM-STATUS DES REKTUMKARZINOMS UND 5-JAHRES ÜBERLEBENSRATE .....	10
<b>TABELLE 5:</b>	UICC/AJCC STAGING, TNM-STATUS UND 5-JAHRES ÜBERLEBENSRATE DES KOLONKARZINOMS .....	10
<b>TABELLE 6:</b>	DERZEITIGE FIRST-LINE THERAPIESCHEMATA BEI MULTIPLLEN, DIFFUSEN, INOPERABLEN METASTASEN BEIM REKTUMKARZINOM [AWMF LEITLINIEN, 2004] .....	13
<b>TABELLE 7:</b>	NACHSORGEEMPFEHLUNG BEI PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM UICC-STADIUM II UND III [MODIFIZIERT NACH AWMF LEITLINIEN KOLOREKTALES KARZINOM, 2004]. .....	14
<b>TABELLE 8:</b>	NACHSORGEEMPFEHLUNG BEI PATIENTEN MIT REKTUMKARZINOM* [HERMANEK ET AL., 1999] .....	14
<b>TABELLE 9:</b>	BESTANDTEILE DES CYTOSKELETTS DER EUKARYOTEN ZELLEN .....	16
<b>TABELLE 10:</b>	INTERMEDIÄRFILAMENTKLASSEN .....	18
<b>TABELLE 11:</b>	PROTEINE DER INTERMEDIÄRFILAMENTE .....	19
<b>TABELLE 12:</b>	EINGESetzte CYTOKERATINANTIKÖRPER, HERSTELLERNACHWEIS UND VERDÜNNUNG.....	26
<b>TABELLE 13:</b>	MATERIALIEN UND HERSTELLER FÜR DIE TMA-HERSTELLUNG .....	26
<b>TABELLE 14:</b>	MATERIALIEN UND HERSTELLER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG .....	27
<b>TABELLE 15:</b>	SOFTWARE UND HERSTELLER FÜR DIE DATENAUSWERTUNG .....	27
<b>TABELLE 16:</b>	VERTEILUNG DER METASTASENLOKALISATION UND DEREN HÄUFIGKEIT INKLUSIVE NORMALMUKOSA.....	39
<b>TABELLE 17:</b>	VERTEILUNG UND STÄRKE DER ANFÄRBUNG IN VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE BEI CK20.....	41
<b>TABELLE 18:</b>	VERTEILUNG UND STÄRKE DER ANFÄRBUNG IN VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE BEI CK14.....	42
<b>TABELLE 19:</b>	VERTEILUNG UND STÄRKE DER ANFÄRBUNG IN VERSCHIEDENEN LOKALISATIONEN DER PRIMÄRTUMORE BEI CK8.....	43
<b>TABELLE 20:</b>	CK20, 14, 8 EXPRESSIONSSTÄRKEN IN KORRELATION ZUM PTNM-STATUS UND GRADING	44
<b>TABELLE 21:</b>	CK19, 18, 17, 16 EXPRESSIONSSTÄRKEN IN KORRELATION ZUM PTNM-STATUS UND GRADING .....	44
<b>TABELLE 22:</b>	CK13, 7, 5 EXPRESSIONSSTÄRKEN IN KORRELATION ZUM PTNM-STATUS UND GRADING ..	45

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **Danksagung**

Mein Dank für diese Doktorarbeit gilt besonders Dr. Thomas Knösel und Prof. Dr. Iver Petersen für die geduldige, freundliche und unterstützende Betreuung dieser Doktorarbeit.

Insbesondere möchte ich auch Prof. Dr. Manfred Dietel, dem Institut für Pathologie und der Charité danken, die diese Promotion erst ermöglicht haben. Dr. Karsten Schlüns, die MTA´s des Instituts für Pathologie, Herr Noco und das Institut für Epidemiologie und Sozialmedizin standen mir stets beratend in statistischen und technischen Fragen zur Seite.

Abschließend gilt dieser Dank meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, für die Unterstützung, die Motivation und die Kraft, die sie mir gegeben haben.

**Erklärung**

„Ich, Valeska Christina Emde, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchung von Cytokeratinprofilen und ihrer prognostischen Relevanz bei kolorektalen Karzinomen. Eine TMA Untersuchung an 2919 Gewebeproben“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 08.01.2007