

Universität Hamburg  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med.Prof. h.c. J. R. Izbicki

DISSERTATION

**Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L 1 als  
prognostischer Marker beim Kolonkarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Sabine Timmermann

geboren am 28.12.1966 in Herford

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg am: **10.07.2009**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. T. Strate**

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: **Prof. Dr. W. Fiedler**

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: **Prof. Dr. M. Schachner**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom	3
1.1.1	Inzidenz	3
1.1.2	Mortalität	4
1.1.3	Therapeutische Herausforderungen	4
1.2	L1 Adhäsionsmolekül	4
1.3	Fragestellung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Patienten und Proben	8
2.2	Herstellung eines Gewebemicroarray	8
2.3	Immunhistochemisches Anfärben von L1 und Evaluation der Expression	11
2.4	Detektion von Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten	11
2.5	Überlebensdaten	13
2.6	Statistische Analyse	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>15</b>
3.1	Charakteristik von Patienten und L1 Expression in kolorektalen Tumoren	15
3.2	L1 Expression und Überleben	17
3.3	L1 als ein unabhängiger prognostischer Faktor	18
3.4	L1 Expression und Lymphknoten sowie Knochenmarksmikrometastasen	20

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>22</b>
4.1	L1 Expression bei Tumoren unterschiedlicher Genese	22
4.2	L1 Expression und Metastasierung von Tumoren	23
4.3	L1 Expression und Überleben	24
4.4	L1, die mögliche Rolle in der Immuntherapie und Onkologie	25
4.5	L1 als differentialdiagnostischer Marker	27
4.6	L1 als prognostischer Marker	27
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>44</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist ein Adenokarzinom des Dickdarms. 60% der Karzinome sind im Rektum lokalisiert, 20% sind Sigmakarzinome und weitere 10% befinden sich im Zökum und Kolon ascendens [4,5].

### 1.1.1 Inzidenz

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten malignen Tumoren des Menschen. Nach der Inzidenz liegt es weltweit bei den Männern an dritter und bei den Frauen an zweiter Stelle. In den Industriestaaten ist die Inzidenz höher als in den Entwicklungsländern. Jenseits des 50. Lebensjahres steigt sie stark an und verdoppelt sich dann mit jeder Lebensdekade. In Deutschland sind pro Jahr etwa 52.000 Neuerkrankungen zu verzeichnen. Bei den Männern erkranken ca. 60/ 100.000 Einwohner/ Jahr bei den Frauen sind es ca. 45/ 100.000 Einwohner/ Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei den Männern bei 68 bzw. bei den Frauen bei 73 Jahren.

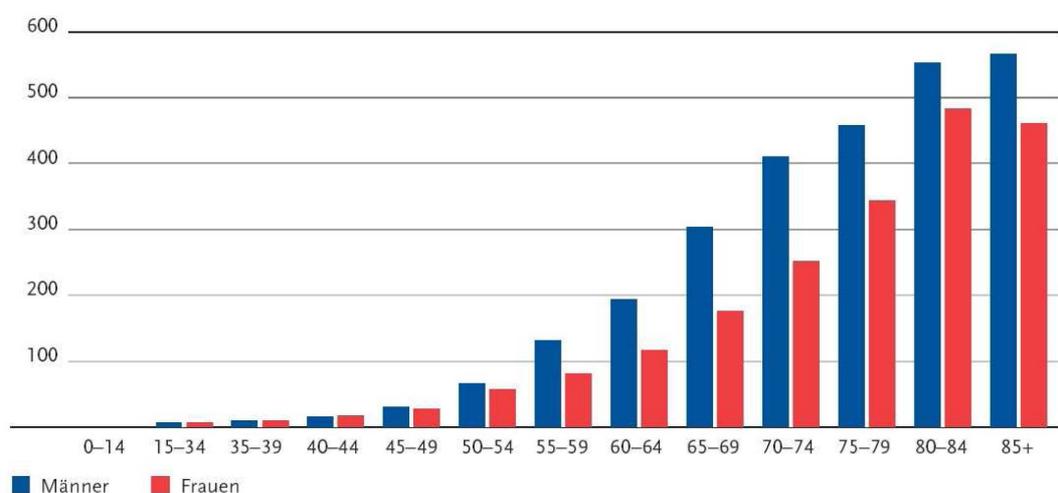


Abbildung 1.1 Schätzung der altersspezifischen Inzidenz von Männern und Frauen für das kolorektale Karzinom in Deutschland 2000, Erkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen [4,5].

### **1.1.2 Mortalität**

Die Mortalitätsrate des kolorektalen Karzinoms ist in Deutschland derzeit bei den Männern ca. 30/ 100.000 Einwohner/ Jahr, bei den Frauen ca. 20/ 100.000 Einwohner/ Jahr. Fast 30.000 Menschen versterben jährlich an den Folgen dieses Tumors. Damit ist das kolorektale Karzinom für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebstodesursache.

### **1.1.3 Therapeutische Herausforderung**

Das individuelle Risiko im Laufe des Lebens an einem Kolonkarzinom zu erkranken beträgt etwa 6%. Eine definitive Heilung ist nur durch eine chirurgische Therapie in frühen Tumorstadien möglich. Bei kurativer Resektion beträgt die 5-Jahresüberlebensrate derzeit bei den Männern 48% und bei den Frauen 51% [4,5]. Die Lebenserwartung wird entscheidend von lokalen Tumorzidiven und dem Auftreten von Fernmetastasen bestimmt. Diese sind auf eine bereits vor der Operation vorliegende Mikrometastasierung zurückzuführen, die mit den augenblicklich zur Verfügung stehenden Diagnostika nicht erkennbar sind. Bei bis zu 2/3 der Patienten werden nach einer R0-Resektion eines Kolonkarzinoms lokale, regionale oder weiter entfernte Metastasen auftreten. Davon werden 85% innerhalb der ersten 2,5 Jahre nach der Operation diagnostiziert, weiter 15% in den folgenden 2,5 Jahren.

## **1.2 L1 Adhäsionsmolekül**

Das L1 Adhäsionsmolekül vermittelt wichtige migratorische Prozesse bei der Entwicklung des Nervensystems und schützt Neuronen vor Apoptose. Außerdem wird L1 auf vielen Tumoren exprimiert, wo es die Motilität von Tumorzellen erhöht und so vermutlich die Metastasierung begünstigt. Es konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass das Adhäsionsmolekül L1 (CD171) an der invasiven Front von kolorektalen Krebszellen exprimiert und dies von Tumorprogression begleitet wird [7,15]. L1 ist ein 200-220 kD Typ I Glykoprotein der Immunoglobulin – Superfamilie. Es spielt eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems durch die Regulation von Zellinterak-

tionen einschließlich neuronaler Wanderung, Neuritenauswuchs, Faszikulation, neuronalem Überleben und synaptischer Plastizität [9,22,40,45]. L1 kann mit einer Vielfalt von verschiedenen Molekülen einschließlich sich selbst interagieren [10]. Neben homophilen Bindungen geht L1 auch heterophile Interaktionen ein, z.B. mit Integrinen [41]. L1 wurde auf einer Vielfalt von Tumorzellen neuronalen, mesothelialen und epithelialen Ursprungs entdeckt wie z. B. Neuroblastomen, Melanomen, Lymphomen, kleinzelligen Lungen, Kolon- und Mammakarzinomen [14,16,17,19,30,34,38,47]. Nach Spaltung von einer Metalloproteinase (ADAM10) von der Tumorzelloberfläche wird L1 ins Serum z.B. von Krebspatienten freigegeben [20,28,36,39,40]. Seine Anwesenheit in Tumor und Serum hat eine prognostische Signifikanz bei Ovarial, Uterus- und Nierenzellkarzinomen und geht einher mit einer Metastasierung von Melanomen [1,12,47].

L1 wird an der invasiven Front kolorektaler Karzinome exprimiert [16]. Metastasierung schließt mehrere sequentielle Schritte ein und ist ein hoch organisierter Prozess. Ein frühes metastatisches Rezidiv kann nach der vollständigen Resektion eines anscheinend lokalisierten Tumors anzeigen, dass von gegenwärtigen routinemäßigen Methoden unentdeckte, verbreitete Tumorzellen oder Mikrometastasen zur Zeit der Operation anwesend waren [42]. Tumorzellen verbreiten sich über regionale Lymphknoten zu sekundären Organen, in denen sie sich als lebensfähige Zellen in einem „schlafenden“ Status befinden können. Einige dieser Zellen können schließlich Vorgänger für Metastasen werden, die viele Jahre nach kurativer Resektion des Primärtumors erwachen [42]. Gegenwärtige Tumorstagingverfahren sind nicht in der Lage einzelne verbreitete Tumorzellen zu entdecken, deshalb sind sensitivere Methoden entwickelt worden, um verbreitete Tumorzellen in Lymphknoten und entfernten Organen zu entdecken, insbesondere im Knochenmark [35,42]. Die Anwesenheit von mikrometastatischen Tumorzellen in histopathologisch tumorfreien Lymphknoten ist ein starker prognostischer Faktor für das Kolonkarzinom [18,32,49]. Die Anwesenheit von Tumorzellen im Knochenmark gilt als Beweis für die allgemeine disseminative Fähigkeit von individuellen Tumoren [33]. Diese Verbreitung im Knochenmark ist ein Prediktor für das

postoperative Auftreten von Fernmetastasierung, obwohl das Skelett kein bevorzugter Standort des erneuten Auftretens von kolorektalen Tumoren ist.

### **1.3 Fragestellung**

Das Ziel dieser Untersuchung war zu beurteilen, ob L1 mit mikrometastatischer Ausdehnung einhergeht und ob es als ein potentieller prognostischer Faktor von kolorektalen Krebspatienten dienen könnte?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und Proben**

Die Genehmigung für diese Untersuchung wurde von der Ethik Kommission der Ärztekammer in Hamburg erteilt. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der Proben und Durchführung der Knochenmarkspunktionen wurde von allen Patienten eingeholt.

Untersucht wurden 576 Gewebeproben von 375 Patienten, die in dem Zeitraum von Januar 1994 bis Februar 2005 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf an kolorektalen Tumoren operiert worden waren. Alle Patienten, von denen Tumorproben vorlagen, die histologisch aufgearbeitet werden konnten, wurden in die Studie miteinbezogen (insgesamt 375 Primärtumore, 128 Lymphknotenmetastasen, 48 Lebermetastasen und 25 Lokalrezidivproben). Aus diesen wurde ein Gewebemicroarray hergestellt. Das Tumorstadium wurde nach der TNM Klassifikation der „Internationalen Vereinigung gegen Krebs“ eingeteilt [48]. Die Patientendaten wie Operationszeitpunkt, Tumorstadium und prä- und postoperativer Verlauf wurden den chirurgischen Patientenakten entnommen. Für die klinischen Verlaufsdaten wurden alle Aufenthalte eines jeden Patienten im Universitätsklinikum Eppendorf berücksichtigt, nicht nur die Aufenthalte in der chirurgischen Klinik.

### **2.2 Herstellung des Gewebemicroarray**

Die Gewebeproben wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert, eingebettet in Paraffin. Die Herstellung des Gewebemicroarray erfolgte nach der von Schraml 1999 publizierten Methode [46]. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte wurden aus Primärtumorblöcken (Spenderblöcke) erstellt, um die repräsentative Tumorregion zu definieren. Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm wurden aus dem Spenderblock mit Hilfe eines Arayer erstellt. Diese Biopsien wurden aus peripheren oder zentralen Arealen

mit einer hohen Zahl von vitalen Tumorzellen und kleinen Nekrosen entnommen. Die Kontrollproben wurden von normaler Ösophagusschleimhaut (n=10), Endometrium (n=2), Haut (n=2), Skelettmuskel (n=2), Herzmuskel (n=2), Kolonschleimhaut (n=2), Lunge (n=2), Lymphknoten (n=2), Prostata (n=2) und Niere (n=2) untersucht.

Eine Übersicht eines vollständigen Gewebemicroarray ist in Abbildung 2.1 A dargestellt. Einzelne Gewebeproben von einem Adenokarzinom und der Lymphknotenmetastase werden in Abbildung 2.1 B und C gezeigt. Drei  $\mu\text{m}$  Schnitte wurden mit Hilfe des „Paraffin Sectioning Aid System“ (Instrumentics, Hackensack NJ) hergestellt.

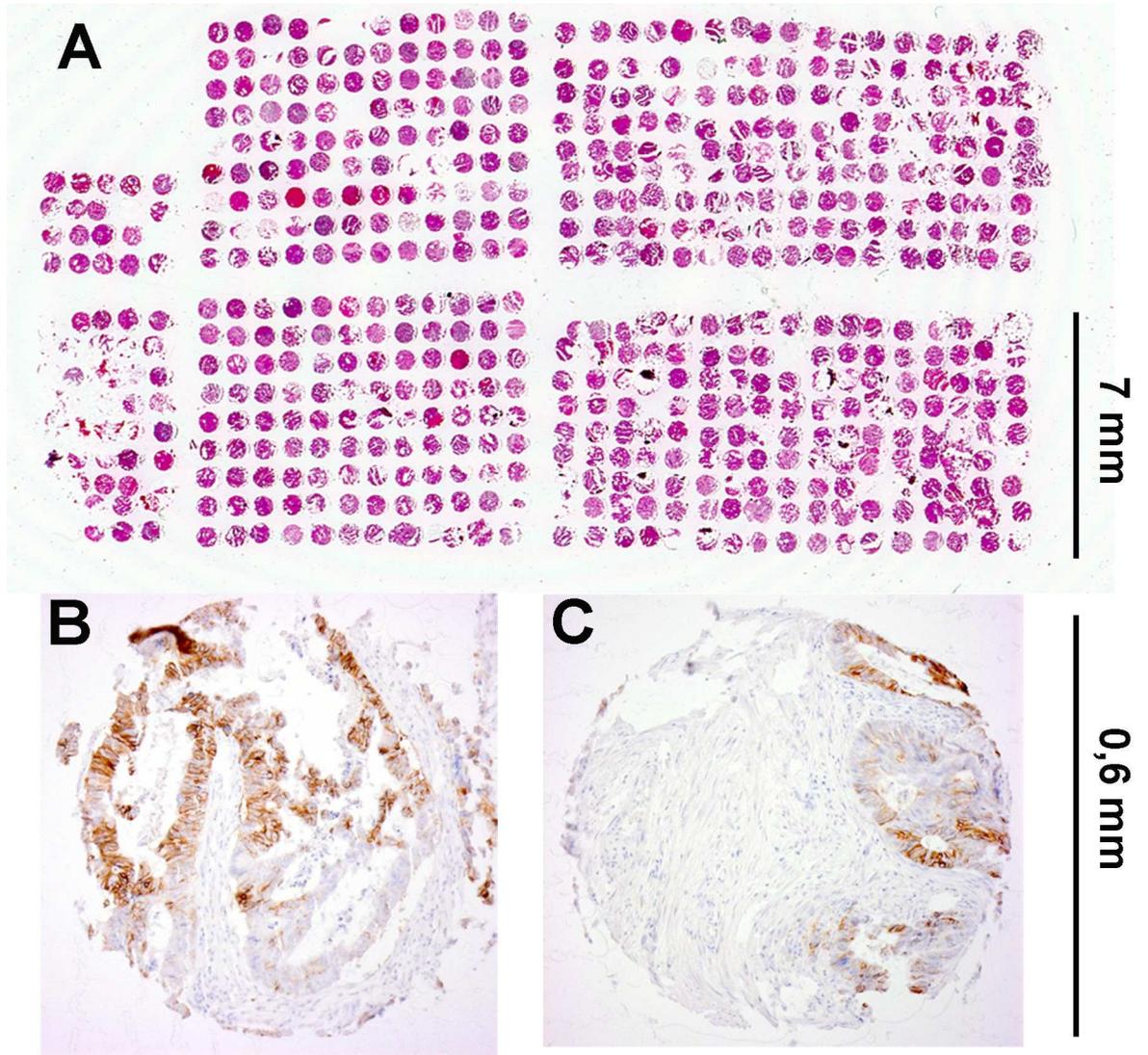
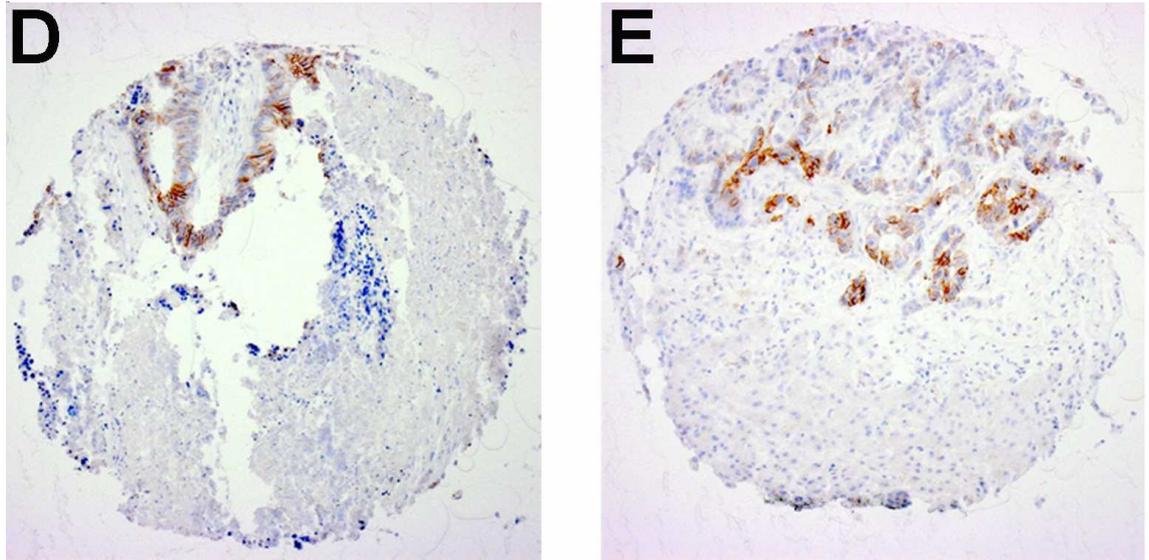


Abbildung 2.1 A-C: Kolorektaler Tumorgewebemicroarray. **Abbildung A:** Kolorektaler Tumorgewebemicroarray, gefärbt mit Hämatoxylin-Eosin, der aus einem Paraffinblock (25x30 mm) besteht. **Abbildung B u. C:** Beispiele für einen einzelnen in einer L1 spezifischen Immunfärbung dargestellten Gewebeproben eines primären Kolon-Adenokarzinoms (Vergrößerung  $\times 100$ ).



**Abbildung D u. E:** Beispiele für einen einzelnen Gewebeflecken einer Kolon-Adenokarzinomlymphknotenmetastase mit L1-positiver Immunfärbung (Vergrößerung  $\times 100$ ). Die immunhistochemische Färbung wurde mit der Peroxidase-methode durchgeführt, dabei wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes L1 benutzt.

### 2.3 Immunhistochemisches Anfärben von L1 und Evaluation der Expression

Zur Antigengewinnung wurden die Schnitte mit hitze-induziertem Autoklavantigen bei 120 °C für fünf Minuten mit TEC (pH 7,8) behandelt. Eine endogene Peroxidaseblockade (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol) wurde für 10 Minuten durchgeführt. Die Inkubation mit dem vorverdünnten Primärantikörper erfolgte für zwei Stunden bei 30°C unter Benutzung eines anti-humanen monoklonalen Mausantikörper ( IgG1; Clone UJ127, NeoMarkers, Fremont,CA, 1:150) Der Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne des transmembranen Protein L1. Das Visualisieren der Immunreaktion wurde mit DAB-chromogen/ EnVision Polymer-HPR (Horseradishperoxidase, Dako K3468 und K4001) erreicht. Eine milde Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin für 30 Sekunden durchgeführt. In den Tumoren wurde die Farbintensität in einer vier Stufen Skala (0, 1+, 2 +, 3+) bestimmt. Zusätzlich wurde der Prozentsatz an positiven Zellen abgeschätzt. Die Ergebnisse für L1 im Gewe-

bemicroarray wurden in drei Kategorien eingeteilt (negativ: keine Anfärbung, schwach: 1 + oder 2 + Färbung in <30% der Tumorzellen und stark positiv: 2 + Färbung in mehr als 30% der Zellen oder 3 + Färbung). Im normalen Gewebe wurden die Färbeergebnisse für jeden zu differenzierenden Zelltyp (0,1+,2+,3+) separat beschrieben.

#### **2.4 Detektion von Tumorzellen in Knochenmark und Lymphknoten**

Knochenmarksaspirat von 4-8 ml wurde aus dem Beckenkamm der Patienten am Tag der Operation gewonnen und wie beschrieben zügig bearbeitet [8,23,26].

Aus dem in heparinisierten Röhrchen befindlichem Aspirat wurden monoklonale Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation (400 x g für 30 min) durch Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg) isoliert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur einer Zellzentrifugation (150 x g für 3min) unterworfen, sodass die Zellen an einem Objektträger haften blieben. Zum Visualisieren der Tumorzellen im Knochenmark wurden monoklonale Antikörper A45-B/B3(IgG1, Micromet München) gerichtet gegen ein Epitop von verschiedenen Zytokeratinen (8,18,19) verwendet. Nicht immunogenes IgG1 wurde als Kontrollantikörper benutzt. Visualisierung wurde durch APAAP Technik wie oben beschreiben erreicht. Gegenfärbung wurde mit Mayer`s Hämatoxylin durchgeführt. Wir benutzten das Automatische Cellular Imaging System (ACIS, ChromaVision, Medical Systems Inc., CA) zum Screenen der immungefärbten Knochenmarkschnitte für verteilte Tumorzellen [43].

Die Lymphknoten wurden während der Lymphadenektomie systematisch gesammelt [23]. Jeder Lymphknoten der während der Operation entnommen wurde, wurde in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde eingebettet in Paraffin für das Routine histopathologische Staging und gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin. Der andere Teil wurde Schock gefroren in flüssigem Nitrogen. Lymphknoten von Patienten ohne Nachweis einer Lymphknotenmetastase wurden auf die Anwesenheit von epithelialen Tumorzellen mit Ber-EP4 monoklonalen Antikörpern (IgG1; Dako) wie bereits beschrieben untersucht

[23]. Dieser Antikörper ist gegen Epithelzellen gerichtet und reagiert weder mit mesenchymalen Gewebe noch Lymphknotengewebe [31].

Zwei Gefrierschnitte (5-6 µm Dicke) wurden aus drei unterschiedlichen Bereichen eines jeden Lymphknoten geschnitten. Abschnitte werden mit A-PAAP Technik gefärbt. Normale Ösophagasmukosa diente als positive Färbekontrolle. Die mit Hämatoxylin und Eosin behandelten Schnitte oder die immungefärbten behandelten Bereiche wurden verblindet ausgewertet. Minimale Tumorzellbeteiligung in einem Lymphknoten, der zuvor in der Routine histopathologischen Untersuchung als tumorfrei bewertet wurde, wurde bei 10 Ber EP4-positiven Zellen im Zentrum eines Lymphknotens festgestellt.

## **2.5 Überlebensdaten**

Klinische Verlaufsdaten wurden aus Krankenakten und dem Krebsregister Hamburg erhoben. Die Überlebensdaten von 247 Patienten mit Primärtumor gingen in diese Untersuchung ein, welche auf L1 untersucht wurden. Die histopathologischen Untersuchungen der chirurgischen Einzelproben zeigten, dass die resezierten Ränder tumorfrei waren (R0). Zum Zeitpunkt der Operation wurden nur Patienten mit fehlendem Nachweis von Fernmetastasierung in die Überlebensanalyse eingeschlossen. Tumorspezifisches Überleben wurde vom Tag der chirurgischen Entfernung des Primärtumors bis hin zum Todestag oder bis zur letzten Verlaufsuntersuchung definiert. Patienten, die aus anderen Gründen als dem kolorektalen Karzinom verstarben, wurden zum Todeszeitpunkt ausgeschlossen. Patienten deren Tod klar dokumentiert durch ein kolorektales Karzinom erfolgte, wurden als an dieser Erkrankung verstorben eingestuft. Andere Todesursachen wurden nicht als durch das Kolonkarzinom verursacht betrachtet.

## **2.6 Statistische Analyse**

Zur statistischen Datenanalyse wurde *SPSS* für Windows (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA) verwendet. Die Ergebnisse der Immunhistochemie (*L1-*

*Positivität*) wurden mit dem Tumorgrad nach der neuen WHO-Klassifikation sowie dem Überleben korreliert. Die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen L1-Expression und Tumorgrad wurde innerhalb einer Vierfeldertafel unter Anwendung des so genannten „*exakten Tests von Fisher*“ durchgeführt. Zur Überlebensanalyse wurde das Kaplan-Meier-Verfahren benutzt und die so entstandenen Überlebenskurven mit dem Log-rank Test verglichen. In einer multivariaten Analyse (*Cox-Regressionsmodell*) wurden verschiedene Variablen auf ihren Wert als unabhängige Einflussgrößen auf das tumorspezifische Überleben untersucht. Ein p-Wert kleiner als 0,05 galt als statistisch signifikant. Die statistischen Tests wurden als zweiseitige Fragestellungen verstanden.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Charakteristik von Patienten und L1 Expression in kolorektalen Tumoren**

576 Gewebeproben von 375 retrospektiv ausgesuchten kolorektalen Tumorpatienten wurden in die Untersuchung eingeschlossen und durch ein Gewebemicroarray immunhistochemisch untersucht. 375 Primärtumore, 128 Lymphknotenmetastasen, 48 Lebermetastasen und 25 Lokalrezidivproben wurden zur Herstellung eines Gewebemicroarray verwendet.

Patientencharakteristik und L1 Expression korreliert mit Alter, Geschlecht, Lokalisation des Primärtumors, histologische Differenzierung, Tumordinvasionstiefe, Lymphknotenstatus und die Anwesenheit von Metastasen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Das mittlere Alter der Patienten war 65 Jahre. Von allen Proben, die in der Untersuchung eingeschlossen wurden, hatten 48 (13%) von 375 Patienten L1 positive Tumorproben. Abbildung 2.1 A zeigt ein Gewebemicroarray und Abbildung 2.1 B zeigt ein repräsentatives Farbmuster von Gewebeproben von L1 vom primären kolorektalen Adenokarzinomen und Lymphknotenmetastasen.

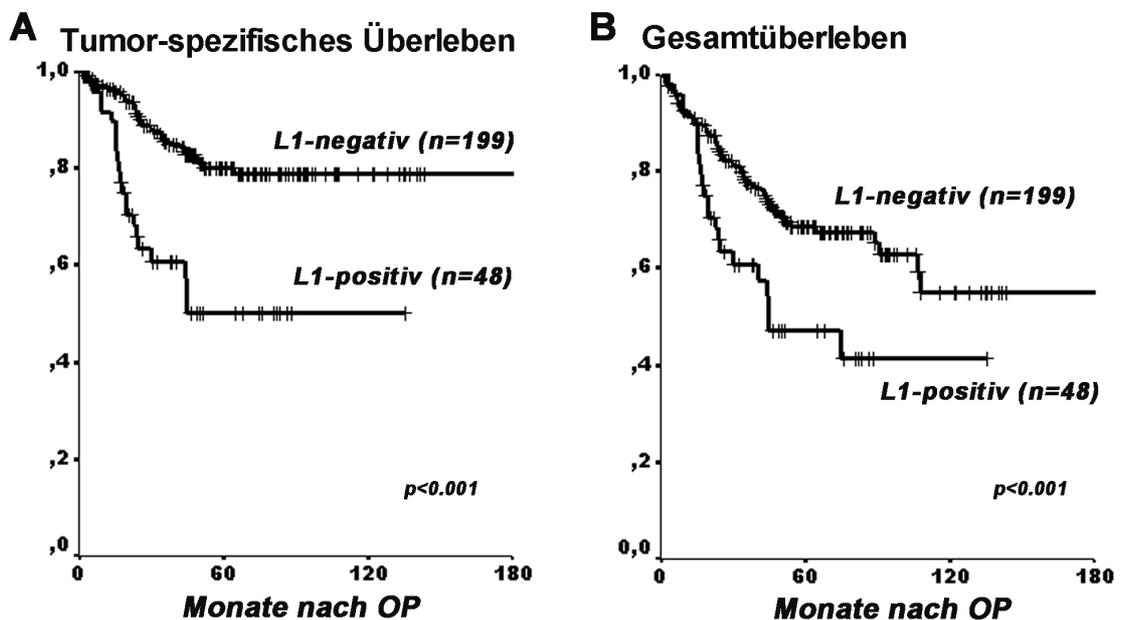
**Tabelle 3.1:** Klinischpathologische Eigenschaften kolorektaler Karzinompatienten und L1 Expression in dieser Untersuchung

	<i>Gesamt</i>	<i>L1 negativ</i>	<i>L1 positiv</i>
<b>Gesamt</b>	375	327 (87%)	48 (13%)
<b>Alter</b>			
<i>&lt;60 Jahre</i>	122 (33%)	102 (27%)	20 (5%)
<i>&gt;60 Jahre</i>	253 (67%)	225 (60%)	28 (8%)
<b>Geschlecht</b>			
<i>Männlich</i>	224 (60%)	191 (51%)	33 (9%)
<i>Weiblich</i>	151 (40%)	136 (36%)	15 (4%)
<b>Lokalisation</b>			
<i>Kolon ascendens</i>	72 (19%)	63 (17%)	9 (3%)
<i>Kolon transversum</i>	23 (6%)	21 (6%)	2 (1%)
<i>Kolon descendens</i>	7 (2%)	5 (1%)	2 (1%)
<i>Sigmoid</i>	85 (23%)	73 (20%)	12 (3%)
<i>Rektum</i>	188 (50%)	165 (44%)	23 (6%)
<b>Histologische Differenzierung</b>			
<i>G1</i>	4 (1%)	4 (1%)	0
<i>G2</i>	307 (82%)	266 (71%)	41 (11%)
<i>G3</i>	64 (17%)	57 (15%)	7 (2%)
<b>Tumortiefe</b>			
<i>pT1</i>	18 (5%)	16 (4%)	2 (1%)
<i>pT2</i>	79 (21%)	71 (19%)	8 (2%)
<i>pT3</i>	235 (63%)	201 (54%)	34 (9%)
<i>pT4</i>	43 (12%)	39 (10%)	4 (1%)
<b>Lymphknoten</b>			
<i>pN0</i>	187 (50%)	168 (45%)	19 (5%)
<i>pN1</i>	89 (24%)	74 (20%)	15 (4%)
<i>pN2</i>	99 (26%)	85 (23%)	14 (4%)
<b>Metastasen</b>			
<i>M0</i>	289 (77%)	241 (64%)	48 (13%)
<i>M1</i>	86 (23%)	86 (23%)	0

### 3.2 L1 Expression und Überleben

Verlaufsdaten von Patienten, deren primäres kolorektales Karzinom vollständig chirurgisch entfernt wurde (R0) und denen nach OP Fernmetastasen fehlten (M0) lagen in 247 Fällen vor. Nur Patienten, deren primäres kolorektales Karzinom auf L1 Expression durch ein Gewebemicroarray analysiert wurde, wurden in die Überlebensanalyse eingeschlossen. Die mittlere Nachuntersuchungszeit von allen 247 Patienten einschließlich der Überlebensanalyse lag bei 46 Monate. Die mittlere Nachuntersuchungszeit der Überlebenden (n=165) war 54 Monate, von L1 positiven Patienten (n=48) 28 Monate und von L1 negativen Patienten (n=199) 48 Monate.

Das Überleben wurde mit der Kaplan-Meier Methode analysiert und der Log-rank Test für die Univarianzanalyse verwendet. Gesamtüberleben und tumor-spezifisches Überleben unter Patienten mit L1 positiven Tumoren verglichen mit Patienten mit L1 negativen Tumoren ist in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1:** Kaplan-Meier Überlebensdarstellung für tumor-spezifisches (A) und Gesamtüberleben (B) sowie L1 Expression in Primärtumoren von komplett resezierten kolorektalen Adenokarzinompatienten. Patienten, die bei initialer Diagnose keine Metastasen aufwiesen (M0) und deren Primärtumor bei initialer Diagnosestellung chirurgisch und histopathologisch vollständig

reseziert wurde (R0), wurden in die Überlebensanalyse eingeschlossen (n=247). *p* Werte wurden mit dem Log-rank Test berechnet.

L1 Expression in Primärtumoren war statistisch signifikant und ging mit einem geringeren Gesamt- und tumorspezifischen Überleben verglichen mit keiner L1 Expression ( $p < 0.001$  im Log-rank Test) einher. Die Fünfjahresgesamtüberlebensrate bezogen auf L1 positive Tumoren lag bei 47% (95% Konfidenzintervall KI = 31 – 63%) und die 5-Jahres Überlebensrate bezogen auf L1 negative Tumoren lag bei 69% (95% CI = 62 – 76%). Die 5-Jahre tumorspezifische Überlebensrate bezogen auf L1 positive Patienten lag bei 50% (95 CI = 34 – 66%) und bei L1 negativen Patienten 80% (95% CI = 68 – 92 %).

### **3.3 L1 als ein unabhängiger prognostischer Faktor**

Das Cox- Regressionsmodell für Multivarianzanalyse wurde angewendet, um zu untersuchen, welche unabhängigen Faktoren Gesamtüberleben und tumorspezifischem Überleben korrelieren (Tab 3.2). Folgenden Faktoren wurden laut Univarianzanalyse und Log-rank Test eingeschlossen in ein Modell für potenzielle Risikofaktoren: Tumorinvasionstiefe (pT 1-4), Lymphknotenstatus (pN0-2), histologische Differenzierung (G1-3), und L1 Expression. Wir fanden, dass das Überleben in der Multivarianzanalyse unabhängig korrelierte mit L1-Expression, Lymphknotenmetastasenstatus, Tumorinvasionstiefe. L1 Expression korrelierte schlechterem Überleben (Gesamtüberleben:  $p = 0.025$ , tumorspezifisches Überleben: 0.001) wie auch die Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen (Gesamtüberleben:  $p = 0.007$ ; tumorspezifisches Überleben:  $p = 0.007$ ) und Tumorinvasionstiefe (Gesamtüberleben:  $p = 0.006$ ; tumorspezifisches Überleben  $p = 0.001$ ) (Tab 3.2).

**Tabelle 3.2** Multivarianz Cox-Regressionsanalyse für gesamt- und tumorspezifisches Überleben

<b>Gesamtüberleben</b>	<b><i>RR<sup>a</sup>/95%CI<sup>b</sup></i></b>	<b><i>p Werte</i></b>
Tumorinvasionstiefe pT1-T4	1.736 (1.174-2.568)	0.006
Lymphknotenstatus pN0-N2	1.424 (1.070-1.895)	0.015
Histolog. Differenzierung G1-G3	0.846 (0.446-1.604)	0.608
L1 positiv vs. L1 negativ	1.771 (1.076-2.917)	0.025
<b>Tumorspezifisches Überleben</b>		
	<b><i>RR<sup>a</sup>/95%CI<sup>b</sup></i></b>	<b><i>p Werte</i></b>
Tumorinvasionstiefe pT1-T4	2.375 (1.398-4.035)	0.001
Lymphknotenstatus pN0-N2	1.630 (1.145-2.320)	0.007
Histolog. Einteilung G1-G3	1.101 (0.539-2.249)	0.791
L1 positiv vs. L1 negativ	2.638 (1.493-4.661)	0.001

<sup>a</sup>RR = Risikorate, <sup>b</sup>CI = Konfidenzintervall

### **3.4 L1 Expression und Lymphknoten sowie Knochenmarksmikrometastasen**

Mononukleare Zellen, isoliert aus Knochenmarkaspiraten, wurden vom Beckenkamm der Patienten am Tag der Operation gewonnen und auf die Anwesenheit von Tumorzellen mit Panzytokeratin A45-B/B3 monoklonalen Antikörpern analysiert. Tumorzellen wurden in 18 (22%) von 82 Knochenmarkaspirationen von kolorektalen Krebspatienten gefunden. Knochenmarksmikrometastasen korrelierten negativ mit dem Gesamt- und tumorspezifischen Überleben in einer Kaplan-Meier-Analyse ( $p < 0.05$ ; Daten wurden nicht gezeigt). Wir verwendeten den Fisher's Test zum Vergleich von Knochenmarksmikrometastasen mit und ohne L1 Expression in Primärtumoren und fanden eine statistisch signifikante positive Beziehung zwischen L1 positiver Expression von kolorektalen Krebszellen im Primärtumor und der Anwesenheit von kolorektalen Tumorzellen im Knochenmark ( $p = 0.021$ ).

10 (56%) von 18 Patienten mit Mikrometastasen in ihrem Knochenmark exprimierten L1 in ihrem Primärtumor (Tabelle 3.3). Unter 64 Patienten ohne mikrometastatische Tumorzellen im Knochenmark hatten 16 (25%) der Patienten L1 positive Tumore.

Die Lymphknoten wurden direkt nach chirurgischer Entfernung untersucht. Histopathologisch tumorfreie Lymphknoten wurden ausgeschnitten und gefärbt mit Ber-EP4 monoklonalem Antikörper gegen epitheliale Zelladhäsionsmoleküle auf der Suche nach disseminierten Tumorzellen.

41 (32%) von 127 Patienten hatten disseminierte Tumorzellen in den Lymphknoten. (Tabelle 3.3). Lymphknotenmikrobeteiligung korrelierte negativ mit Gesamt- und tumorspezifischen Überleben, siehe die Kaplan-Meier Analyse und den Log-rank Test ( $p < 0.05$ ; Daten nicht gezeigt). Wir benutzten einen Fisher's Test zum Vergleich von Lymphknotenmikrobeteiligung mit L1 Expression in den Primärtumoren. (Tabelle 3.3) Wir fanden eine statistische signifikante Beziehung zwischen L1 Expression und Lymphknotenmikrobeteiligung mit L1 Expression ( $p = 0.006$ ). 16 (39%) von 41 Patienten mit Primärtumoren und Lymphknotenbeteiligung exprimierten ebenfalls L1. Von

86 Patienten ohne Lymphknotenmikrobeteiligung waren 13 (15%) der Primärtumorproben L1 positiv.

**Tabelle 3.3** Korrelation zwischen L1 Expression, Lymphknoten und Knochenmarkmikrometastasenstatus bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

<i>VARIABLEN</i>	<i>Total</i>	<i>L1 negative</i>	<i>L1 positive</i>	<i>p Wert</i>
<b>Lymphknotenmikrometastasen(n=127)</b>				
<i>negative</i>	<b>86</b>	<b>73</b>	<b>13</b>	
<i>positive</i>	<b>41</b>	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>0.006</b>
<b>Knochenmarkmikrometastasen (n=82)</b>				
<i>negative</i>	<b>56</b>	<b>48</b>	<b>16</b>	
<i>positive</i>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>0.017</b>

\*Daten werden in einer Kreuztabelle gezeigt. *P* Werte werden unter Verwendung eines zweiseitigen Fisher's Test ermittelt

## **4 Diskussion**

In dem Ansatz ein neues therapeutisches Molekül für kolorektale Tumore zu identifizieren, ermittelten wir L1 Expression in einer Untergruppe von 13% der kolorektalen Primärtumore in einem ausreichend großem Kollektiv von 375 Patienten. L1 war signifikant korreliert mit einem geringeren Überleben der Patienten sowie zusätzlich einer frühen Mikrometastisierung mit Ausbreitung in die Lymphknoten und in das Knochenmark, da hochqualitative Antikörper häufig zur Genidentifikation als potentielle Tumortargetkandidaten fehlen. L1 kann leicht durch immunhistochemische, in Formalin fixierte Gewebe wie z.B. durch ein Microarray analysiert werden. Eine frühere Studie von Gavert und Kollegen zeigte L1 Expression an der invasiven Seite kolorektaler Krebszellen, so dass es deshalb als einen wichtigen Faktor für metastatische Verbreitung und Tumorprogression betrachtet werden kann [15]. Passend zu diesem Konzept legt die jetzige Studie eine Rolle von L1 in früher mikrometastatischer Verbreitung nahe und zeigt das L1 als ein prognostischer Marker dienen kann.

### **4.1 L1 Expression bei Tumoren unterschiedlicher Genese**

Frühere Untersuchungen beschrieben die Expression von L1 in verschiedenen Tumoren mit Herkunft aus der Neuralleiste, wie z.B. Melanome, gastrointestinale Stromatumoren, neuroendokrine Tumoren von Pankreas und Haut [11,25,27,47]. Bei Miyahara et al. sind alle 17 Gewebeprobe von kleinzelligen Bronchialkarzinomen L1-positiv, bei Thies et al. 42 der 100 malignen Melanome (42%) und alle der 14 Metastasen und bei Fogel et al., die meisten der 24 Fälle von malignem Melanom sowie der Großteil der Hautmetastasen [14,38,47].

In einer anderen Studie kann Fogel, bei einer Gesamtzahl von 58, von 46 L1-positiven Ovarialkarzinomen berichten (79.3%) und 20 von 72 Endometriumphkarzinomen (27.8%) exprimieren L1 [12]. Bei Deichmann et al. sind es 18 von 22 Merkelzellkarzinomen (81.8%) und drei der neun Metastasen

(33.3%), bei Allory et al. sind es 32 der 72 klarzelligen Nierenzellkarzinome (44.4%) und 25 der 88 papillären Nierenzellkarzinome (28.4%) [1,11].

Unsere Arbeitsgruppe schließlich fand 53 der 72 gastrointestinalen Stromatumoren (73.6%) sowie vier von sieben Schwannomen (57.1%) L1 positiv [25]. Auf der anderen Seite exprimieren epitheliale Pankreasadenokarzinome selten L1 [24].

#### **4.2 L1 Expression und Metastasierung von Tumoren**

Schon 1993 konnte in einer *in-vitro-Situation* gezeigt werden, dass L1 das Wachstum von Lymphomen und deren Fähigkeit zu metastasieren vorantreibt [30]. Die immer wieder formulierte Annahme ist, dass L1 während der Ontogenese eine Rolle spielt, danach im gesunden Organismus keine wesentliche Aufgabe hat und in der Tumorsituation die Tumorzelle seine Expression hochreguliert. L1 soll dabei für das maligne Verhalten von Tumoren verantwortlich sein, indem es vor allem an der Aussaat der Tumorzellen mitwirkt, die Zellen zur Migration aktiviert und aufgrund seiner Fähigkeit zur Zelladhäsion über homophiles wie auch integrin abhängiges heterophiles Bindungsverhalten einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von Metastasen hat [6,10,36]. Die L1 Expression korrelierte mit einem aggressivem klinischen Verhalten in anderen epithelialen Tumoren wie Uterin, Ovar oder auch Kolonkarzinomen [12,15]. Diese Untersuchung zeigt, dass das Adhäsionsmolekül L1 in kolorektalen Krebsproben hochreguliert ist und dabei nicht nur mit geringeren Überleben der Patienten, sondern auch mit Mikrodissemination von Tumorzellen zu verschiedenen Seiten wie z.B. Knochenmark und Lymphknoten verbunden ist.

Die Arbeitsgruppe um Boo fand in einer kürzlich publizierten Arbeit die gleiche Prävalenz an L1 Positivität beim Kolonkarzinom, was auch mit einem ähnlich niedrigen Überlebensrate einherging [7]. Eine Vielzahl der Studien zu L1 bei anderen Tumorentitäten können ihre Ergebnisse in ähnlichem Licht präsentieren, wie sie sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen ableiten lassen.

### 4.3 L1 Expression und Überleben

Unsere Arbeitsgruppe fand bei GIST-Tumoren einen deutlichen Trend, dass Patienten mit einem L1-positiven Tumor ein kürzeres Überleben haben und diese GIST-Tumoren eher zu Rezidiven neigen und metastasieren [25]. Beim malignen Melanom ließ sich zeigen, dass die L1-Expression im Primärtumor (n= 42) hochsignifikant mit dem Auftreten von Metastasen ( $p < 0.0001$ ) und der Mitoserate korreliert ( $p = 0.0001$ ). Außerdem findet man bei dem malignen Melanom eine positiven Korrelation der L1-Expression mit der Tumordicke, dem Clark-Level und der  $\alpha v$ -Integrin-Expression [14,47]. L1 lässt sich nicht in Melanozyten und Keratinozyten benigner Hautläsionen detektieren. Solches offenbart auch die Studie von Allory et al. [1]. Insgesamt 308 epitheliale Nierentumoren wurden auf das Vorhandensein von L1 untersucht und nur die wirklich malignen Formen, das klarzellige (n=32) und das papilläre (n=25) Nierenzellkarzinom, waren L1-positiv. Die Gruppe der klarzelligen L1-positiven Nierenzellkarzinome ist mit einem höheren Proliferationsindex (Ki-67) und einem erhöhten Risiko zu metastasieren assoziiert ( $p = 0.0121$ ). Am eindrucksvollsten sind die Ergebnisse bei Ovarial- und Uteruskarzinomen [12]. Wieder war L1 vor allem bei denjenigen Ovarial- und Uterustumoren nachzuweisen, die sich als niedrigdifferenziert (G3) präsentierten und mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium korrelierten. L1 erwies sich hier als exzellenter Prädiktor für den Ausgang der Erkrankung: Patientinnen mit einem L1-positiven Karzinom von Ovar oder Uterus hatten ein signifikant kürzeres Überleben (in beiden Fällen  $p < 0.0001$ ). L1 wird von besonders malignen Tumoren einer jeweiligen Tumorentität exprimiert. Sein Nachweis ist mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung assoziiert.

In Anbetracht dessen, dass das von Tumorzellen exprimierte L1 mit multiplen Gefäß- und Thrombozytenintegrinen interagiert, könnte es eine wichtige Rolle in der Extravasation von Tumorzellen während der frühen metastatischen Verbreitung spielen. Wie oben erwähnt, wird L1 an der invasiven Front von Kolonkarzinomtumoren exprimiert [15].

Expression von L1 wurde auch in Tumorgefäßen in Nierenzelltumoren und Tumoren glatter Muskelzellen beschrieben und könnten also die Anlagerung von Tumorzellen durch homophile Bindung steigern [1,25]. Eine Rolle von

L1 in der Metastasierung von kolorektalen Krebszellen zu Lymphknoten und Knochenmark ist zu vermuten, da insbesondere L1 die homophile Bindung unterwandert [30]. Jedoch belegt eine Korrelation noch keine direkte Rolle in diesem Prozess. Doppelfärbung von mikrometastatischen Tumorzellen sollte in zukünftigen Experimenten durchgeführt werden, um die Koexpression von L1 und epithelialen Markern in einer einzigen disseminierten Tumorzelle zu zeigen. Zuletzt sollte diese kausale Beziehung durch funktionelle Experimente in vitro oder in vivo Modellen untersucht werden.

Bei kolorektalem Karzinom ist die Anwesenheit von mikrometastatischen Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark mit geringem Überleben korreliert [32,33,49]. Obwohl die Anwesenheit von mikrometastatischen Zellen in regionalen Lymphknoten nicht überraschend ist, werden kolorektale Krebszellen häufig auch im Knochenmark gefunden, im Gegensatz zu einer seltenen Rate von Skelettmetastasen. Disseminierte Tumorzellen, die im Knochenmark sitzen, könnten an einer erneuten Zirkulation teilnehmen und in andere Organe einwandern wie z.B. Lunge oder Leber, bei denen möglicherweise bessere Wachstumsfaktoren für kolorektale Tumorzellen existieren und daher kolorektale Krebsmetastasen gewöhnlich auftreten [21]. Pierga und Kollegen nahmen an, dass die zirkulierenden Tumorzellen, die im peripheren Blut ihren Weg ins Knochenmark finden und dort überleben, eine erhöhte Fähigkeit zur Fernmetastasierung entwickeln [43]. Unsere Ergebnisse gehen von einer potentiellen Rolle von L1 in der bevorzugten Formation von Mikrometastasen an diesen Stellen in kolorektalen Karzinomen aus.

#### **4.4 L1, die mögliche Rolle in der Immuntherapie und der Onkologie**

Eine neuere Studie zeigte deutlich die Durchführbarkeit von vereinigter L1 gerichteter Wachstumsinhibition und Copper 67 Radioimmunotherapie, und dadurch einen Anstieg der Effizienz der Antikörperbehandlung von metastatischen Ovarialkarzinomen im Mausmodell [29]. Solche Behandlung mag auch eine potentielle biologische Therapieoption für kolorektale Karzinompatienten sein, die L1 im Primärtumor exprimieren. Neben seiner Rolle als Prognose- und Differenzierungsmarker für Tumoren des Kolons, mutmaßte

man, dass L1 auch als Zielmolekül im Rahmen einer onkologischen Therapie fungieren könnte. Mittlerweile wurden für das maligne Melanom sowie das Ovarialkarzinom, die übrigens auch am häufigsten untersuchten Tumorentitäten im Rahmen der L1-Forschung, bestätigende Ergebnisse erbracht. Eine grundlegende Arbeit zu diesem Thema stellt die von Primiano et al. dar [44]. Mittels des Tumorzellwachstum inhibierender cDNA-Fragmente (*GSEs, genetic suppressor elements*) wurden verschiedenste Gene auf ihren Einfluss auf die Zellproliferation untersucht. Das L1-Gen gehörte dabei zu der Gruppe von Genen, die im besonderen Maße mit der Zellproliferation assoziiert waren. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass monoklonale L1-Antikörper (*UJ 127, 5G3*) das Wachstum von vier Tumorzelllinien (Zervixkarzinom, Kolonkarzinom und zweimal Mammakarzinom) signifikant hemmten und keinen oder nur einen verschwindend geringen antiproliferativen Effekt auf vier normale humane Zelllinien (Fibroblasten, Mammaepithel) hatten. L1 eignet sich nach diesen Untersuchungen besonders gut als Angriffsmolekül im Rahmen einer Immuntherapie. Zum einen ist es aufgrund seiner Lokalisation an der Zelloberfläche leicht erreichbar, zum anderen präsentieren sich Antikörper gegen L1 als ein *tumor-spezifisches Agens*. Sie hemmen (*in vitro*) das Wachstum von Tumorzellen, aber nicht das von normalen Zellen.

Für das Ovarialkarzinom (und das maligne Melanom) bedeutete das *in vivo* folgendes. Weibliche athymische Mäuse, denen intraperitoneal eine humane Ovarialkarzinomzelllinie (*SKOV3ip*) appliziert worden war, wurden über 38 Tage zweimal wöchentlich mit dem monoklonalen Antikörper *L1-11A* (1, 5 oder 10 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Die Mäusegruppe, die die höchsten Dosen des Antikörpers verabreicht bekommen hatte, wies gegenüber der Kontrollgruppe signifikant weniger (per PET nachgewiesener) Tumormasse, weniger Aszitesmenge und weniger detektierbares L1 im Aszites auf. Für die Gruppen mit niedrigeren Antikörperdosen zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe ein deutlicher Trend in die oben beschriebene Richtung. Von ähnlichen Beobachtungen berichten Knogler et al. [29]. Sie kombinierten die von Arlt vorgestellte Immuntherapie mit einer Radiotherapie [29].

Für das maligne Melanom ließ sich ebensolches in Rekonstruktionen von menschlicher Haut mit Melanomen zeigen: Die Unterdrückung der L1-Funktion reduziert signifikant die Migration und das invasive Verhalten der Tumorzellen [37]. Es bleibt also in weiteren Studien zu untersuchen, ob eine Therapie mit einem L1-Antikörper die Malignität und Invasivität von L1-positiven kolorektalen Karzinomen reduzieren kann und so einen guten Einfluss auf das Überleben von Patienten hat, die von einem solchen Tumor betroffen sind. Es gilt herauszufinden, ob solche Karzinome generell gut auf eine Bio- oder Chemotherapie ansprechen werden.

#### **4.5 L1 als differentialdiagnostischer Marker**

Seit eine Metalloproteinase ( ADAM10) L1 von der Tumorzelloberfläche spaltet und lösliches L1 im Serum von Tumorpatienten entdeckt wurde, ist ein ergänzendes diagnostisches Hilfsmittel verfügbar [12]. Ein einfaches, in den klinischen Alltag leicht zu integrierendes Verfahren zur Differentialdiagnose des Kolonkarzinoms oder Tumoren anderer Genese wäre ein L1-Nachweis im Serum mittels einer *ELISA-Methode*. Wie oben erwähnt, findet sich bei Ovarial- und Uteruskarzinomen eine positive Korrelation zwischen der Menge an im Serum detektierbaren L1 und dem immunhistochemischen Nachweis im Tumor [12]. Diesen Zusammenhang können auch für L1 im malignen Aszites und der durch PET angezeigten, intraperitonealen Tumormasse bei Ovarialkarzinom belegen [3]. Für Tumoren des Kolons würde dies also bedeuten, dass sich im Serum des Patienten Informationen darüber finden, welchen Ursprungs eine unklare intraperitoneale Raumforderung sein könnte. Das müsste in zukünftigen Studien herausgearbeitet werden.

#### **4.6 L1 als prognostischer Marker**

Welche Konsequenzen für den klinischen Alltag lassen sich daraus ableiten? Fogel et al. bezeichnet L1 als einen *neuen Biomarker* für Ovarial und Uteruskarzinome. [13]. Der Nachweis von gelöstem L1-200 im Serum ist signifikant mit der L1-Expression im Tumor assoziiert (Ovar  $p < 0.0001$ ; Uterus  $p =$

0.0002) und zeigte während der *klinischen Verlaufs*-Periode einen Progress der Erkrankung oder ein Rezidiv an, noch bevor sich klinische Symptome gezeigt hatten [19]. Die L1-Anfärbung von Korpusschleimhaut-Proben, die durch Kürettage gewonnen wurden, erlaubt es präoperativ Patientinnen als „Hoch-Risiko-Fälle“ einzustufen und auch bei den sich noch im Frühstadium befindlichen FIGO-I-Tumoren mit eigentlich guter Prognose diejenigen zu identifizieren, die sich im Verlauf als besonders aggressiv präsentieren sollen. Der L1-Nachweis im Serum und Aszites von Patientinnen mit Ovarial- und Endometriumkarzinomen könnte in einem direkten Zusammenhang mit der vorhandenen Tumormasse stehen und das für gynäkologische Raumforderungen etablierte Arsenal an Tumormarkern sinnvoll ergänzen [2].

Eine Einordnung von Tumoren über den L1-Nachweis in eine „Hoch-Risiko-Patientengruppe“ schlägt auch Allory et al. vor [1]. Solche Tumoren benötigten von vornherein eine andere, aggressivere Therapie. Bei Thies et al. zeigt sich, dass der L1-Nachweis präzisere Angaben über das Risiko von Patienten mit malignem Melanom erlaubt, als die sonst übliche Bestimmung der Tumordicke oder des Grads an Ulzeration [47].

## 5 Zusammenfassung

L1 ist ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, welches an der invasiven Front kolorektaler Karzinome exprimiert wird und eine wichtige Funktion bei der Metastasierung von Tumoren besitzt.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die L1 Proteinexpression in einer großen Kohorte von Kolonkarzinompatienten zu bestimmen und den Einfluss auf die frühe Tumorzell dissemination und das Überleben zu untersuchen.

Es wurden insgesamt 375 chirurgisch resezierte Patienten mit einem kolorektalen Karzinom retrospektiv eingeschlossen. Ein Tissue Microarray wurde mit insgesamt 576 Gewebeproben (einschließlich Lymphknoten- und Lebermetastasen) konstruiert und immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper (Maus IgG; Klon UJ127) gegen das humane L1 untersucht. Die Lymphknoten- und Knochenmarks-Mikrometastasierung wurde jeweils mit den monoklonalen Antikörpern Ber-EP4 und dem anti-Pancytokeratin A45-B/B3 detektiert. Die Korrelation zwischen der L1 Expression und der Tumorzell dissemination in die Lymphknoten, das Knochenmark und dem Überleben wurden mit dem Fisher's, Log-rank Test und der Cox multivariaten Analyse statistisch analysiert. Alle statistischen Tests waren doppelseitig.

L1 wurde in einer Untergruppe von 48 (13%) von 375 Patienten detektiert. Die univariate Analyse der L1 Expression und dem Überleben zeigte eine signifikant schlechtere Prognose der L1-positiven Patienten (Log-rank Test:  $P < 0.05$ ). Die multivariate Cox Regressionsanalyse verifizierte L1 als den stärksten unabhängigen Prognose-Prädiktors ( $P < 0.05$ ) unter Einschluss sämtlicher anderer Faktoren mit prognostischem Wert, wie beispielsweise dem nodalen Status. Der Fisher-Test zeigte eine signifikante Assoziation zwischen der L1-Expression und dem Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten und im Knochenmark ( $P < 0.05$ ).

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein starker Prognosemarker für Patienten mit einem kolorektalen Karzinom, die komplett reseziert wurden.

Die Studie impliziert eine Rolle von L1 bei der frühen Tumorzell dissemination in die Lymphknoten und das Knochenmark. Zukünftige Studien sollten untersuchen und klären, ob L1 als ein Zielmolekül für eine adjuvante, biologische Therapie bei kolorektalen Tumorpatienten dienen könnte.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3):1190-1197.
2. Altevogt P, Fogel M. The role of L1 in the progression of ovarian carcinomas. *Zentralbl Gynakol* 2004; 126(5):323-325.
3. Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grunberg J, Honer M, Schubiger PA, Altevogt P, Kruger A. Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* 2006; 66(2):936-943.
4. Arnold CN, Blum HE. Colon cancer: molecular pathogenesis and clinical relevance. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130(13):809-811.
5. Arnold CN, Sosnowski A, Blum HE. Analysis of molecular pathways in neuroendocrine cancers of the gastroenteropancreatic system. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:218-219.
6. Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 1999; 112:2667-2675.
7. Boo YJ, Park JM, Kim J, Chae YS, Min BW, Um JW et al. L1 Expression as a Marker for Poor Prognosis, Tumor Progression, and Short Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(5):1703-1711.

8. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8):793-802.
9. Brummendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8(1):87-97
10. De Angelis E, MacFarlane J, Du JS, Yeo G, Hicks R, Rathjen FG et al. Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *Embo J* 1999; 18(17):4744-4753.
11. Deichmann M, Kurzen H, Egner U, Altevogt P, Hartschuh W. Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol* 2003; 30(6):363-368.
12. Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 2003; 362(9387):869-875.
13. Fogel M, Huszar M, Altevogt P, Ben-Arie A. L1 (CD171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(4):455-462.

14. Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W et al. L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 2003; 189(2):237-247.
15. Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 2005 168(4):633-642.
16. Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E, Ben-Ze'ev A. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res* 2007; 67(16):7703-7712.
17. Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA et al. Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 2003; 162(4):719-730.
18. Greenson JK, Isenhardt CE, Rice R, Mojzisek C, Houchens D, Martin EW, Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer*. 1994; 73(3):563-569.

19. Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S et al. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J* 2003 ; 17(2):292-294.
20. Gutwein P, Oleszewski M, Mechtersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 2000; 275(20): 5490-5497.
21. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW et al. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* 1995; 1(10):1035-1039.
22. Hortsch M. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 1996; 17(4):587-593.
23. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, Rehders A, Busch C, Niendorf A et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N Engl J Med* 1997; 337(17):1188-1194.
24. Kaifi JT, Heidtmann S, Schurr PG, Reichelt U, Mann O, Yekebas EF et al. Absence of L1 in pancreatic masses distinguishes adenocarcinomas from poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Anti-cancer Res* 2006; 26(2A):1167-1170.

25. Kaifi JT, Strelow A, Schurr PG, Reichelt U, Yekebas EF, Wachowiak R et al. L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol* 2006; 19(3):399-406.
26. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, Obonyo D, Wachowiak R, Busch P et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(24):1840-1847.
27. Kaifi JT, Zinnkann U, Yekebas EF, Schurr PG, Reichelt U, Wachowiak R et al. L1 is a potential marker for poorly-differentiated pancreatic neuroendocrine carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12(1):94-98.
28. Kalus I, Schnegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 2003; 278(12):10381-10388.
29. Knogler K, Grunberg J, Zimmermann K, Cohrs S, Honer M, Ametamey S et al. Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(2 Pt 1):603-611.

30. Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M et al. Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11(5):419-429.
31. Latza U, Niedobitek G, Schwarting R, Nekarda H, Stein H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *J Clin Pathol* 1990; 43(3):213-219.
32. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(4):223-228.
33. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340(8821):685-689.
34. Linnemann D, Raz A, Bock E. Differential expression of cell adhesion molecules in variants of K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. *Int J Cancer* 1989; 43(4):709-712.
35. Lugo TG, Braun S, Cote RJ, Pantel K, Rusch V. Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors. *J Clin Oncol* 2003; 21(13):2609-2615.

36. Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S et al. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 2001; 155(4):661-673.
37. Meier F, Busch S, Gast D, Goppert A, Altevogt P, Maczey E, Riedle S, Garbe C, Schitteck B. The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer* 2006; 119(3):549-555.
38. Miyahara R, Tanaka F, Nakagawa T, Matsuoka K, Isii K, Wada H. Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state. *J Surg Oncol* 2001; 77(1):49-54.
39. Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD et al. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 1996; 132(3):475-485.
40. Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa T. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 1998; 58(14):2935-2940.
41. Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Rauch U et al. Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem* 1999; 274(35):24602-24610.

42. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(6):448-456.
43. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10(4):1392-1400.
44. Primiano T; Baig M, Maliyekkel A; Chang BD, Fellars S; Sadhu J, Axenovich SA; Holzmayer TA, Roninson IB et al. Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell* 2003, 4: 41-53.
45. Schachner M. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(5):627-634.
46. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8):1966-1975.
47. Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G et al. Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2002; 38(13):1708-1716.

48. Wittekind C, Greene FL, Hutter RVP, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM Atlas: Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of Malignant Tumours. Springer New York 5th ed. 2005; 94(9):2511-2516.
49. Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 8[4]. 2001; 8(4):300-304.

## 7 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Prof. h.c. J. R. Izbicki danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, welche diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Tim Strate für seine hervorragende Betreuung und tatkräftige Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Marc Freitag und Dr. med. Jussuf T. Kaifi danke ich für ihre kompetente Einarbeitung und unermüdliche Motivation sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Dr. Uta Reichelt und Prof. Dr. med. G. Sauter aus dem Institut für Pathologie danke ich für die Unterstützung bei der Generierung der Gewebemicroarrays.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Tanten danke ich für die langjährige liebevolle Unterstützung, die mein Studium und diese Arbeit überhaupt erst möglich machten.

Zur Erstellung dieser Promotionsschrift haben mehr Menschen beigetragen, als ich hier namentlich nennen kann. Es ist mir ein besonderes Anliegen, auch diesen Freunden und Kollegen aufrichtig für ihre Mithilfe zu danken.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, August 2008