

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Die tumorspezifische Rolle der AMACR-Expression beim kolorektalen Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Ricarda Marie Seibold, geb. Kisker

Hamburg 2022

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.01.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Die Tissue Microarray (TMA-) Methode	12
2.2 Kolonkarzinom TMA.....	15
2.2.1 Patientenkollektiv	15
2.2.2 Aufbau des Hamburg-Fürth Kolonkarzinom TMAs.....	18
2.3 Immunhistochemie	20
2.4 Statistik.....	21
3. Ergebnisse	21
3.1 Auswertbarkeit der Tissue Microarrays	21
3.2 Immunhistochemische Befunde	21
3.3 Beziehung zu klinischen und molekularen Parametern (Klon HH 8F4)	27
3.4 Beziehung zu klinischen und molekularen Parametern (Klon Dako 13H4).....	34
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung.....	48
6. Literaturverzeichnis	52
7. Danksagung	61
8. Lebenslauf.....	62
9. Eidesstaatliche Erklärung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: UICC Klassifikation des Kolonkarzinoms (Leischner 2020)	2
Abb. 2: Gerät zur Herstellung eines TMA's	13
Abb. 3: Herstellung von sechs Replikaten für einen TMA	13
Abb. 4: Schematische Darstellung eines UKE TMA's	14
Abb. 5: Paraffinblöcke des Kolonkarzinom TMA's (unten COL 10.2 A, oben COL 10.2 B).....	19
Abb. 6: Paraffinblöcke des Kolonkarzinom TMA's (unten COL 11.2 A, oben COL 11.2 B).....	19
Abb. 7: Übersichtsaufnahme HE-Schnitt (COL 10.2 A).....	19
Abb. 8: Übersichtsaufnahme HE-Schnitt (COL 11.2 A).....	19
Abb. 9: Übersichtsaufnahme in der Färbung 1:1350 (COL 10.2 A).....	19
Abb. 10: Übersichtsaufnahme in der Färbung 1:1350 (COL 11.2 A).....	19
Abb. 11: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für den AMACR Antikörper UKE Klon HH 8F4.....	20
Abb. 12: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon Dako 13H4	22
Abb. 13: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon HH 8F4	23
Abb. 14: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon HH 8F4	24
Abb. 15: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 in beiden Kollektiven.....	25
Abb. 16: AMACR HH 8F4 in beiden Kollektiven	25
Abb. 17: AMACR Dako 13H4 in beiden Kollektiven	26
Abb. 18: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 im Fürther Unterkollektiv...	26
Abb. 19: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 im Hamburger Unterkollektiv	27

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Shukla et al. 2017).....	7
Tab. 2: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Jiang et al. 2003a).....	8
Tab. 3: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Lin et al. 2007).....	8
Tab. 4: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Marx et al. 2008).....	9
Tab. 5: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Shi et al. 2007)	9
Tab. 6: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Zhou et al. 2002)	10
Tab. 7: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Chen et al. 2005).....	10
Tab. 8: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Went et al. 2006)	11
Tab. 9: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Emam et al. 2016)	11
Tab. 10: Beispiel für ein Datenfile des Kolonkarzinom TMAs.....	15
Tab. 11: Übersicht des Patientenkollektives des Kolonkarzinom TMAs.....	17
Tab. 12: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter.....	27
Tab. 13: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSS-Tumoren.....	29
Tab. 14: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSI-Tumoren	30
Tab. 15: AMACR (Klon HH 8F4) vs. MSI in unterschiedlichen Tumorlokalisation.....	32
Tab. 16: AMACR (Klon HH 8F4) vs. MSI in links- und rechtsseitigen Kolonkarzinomen.....	33
Tab. 17: AMACR (Klon HH 8F4) vs. CD8 Dichte in mikrostabilen und -instabilen Tumoren	34
Tab. 18: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter.....	35
Tab. 19: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSS-Tumoren.....	36

Tab. 20: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSI-Tumoren.....	38
Tab. 21: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. MSI in unterschiedlichen Tumorlokalisationen.....	39
Tab. 22: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. MSI in links- und rechtsseitigen Kolonkarzinomen.....	40
Tab. 23: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. CD8 Dichte in mikrosatellitenstabilen und -instabilen Tumoren.....	41
Tab. 24: Kriterien für die Unterscheidung von AMACR positiven und negativen Tumoren in den neun immunhistochemischen Studien.....	42

Abkürzungsverzeichnis

AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
BRAF	B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
C.	Colon
COX	Cyclooxygenase
CTLA- 4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dMMR	Deficient-Mismatch-Repair
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER 1	Human Epidermal growth factor Receptor 1
HER 2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HER 3	Human Epidermal growth factor Receptor 3
HER 4	Human Epidermal growth factor Receptor 4
HH	Hansestadt Hamburg
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
MAP	Mitogen-Activated Protein
MMR	DNA-Mismatch-Repair
mRNA	Messenger RNA
MS	Mikrosatelliten
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
Mut.	Mutation
N1-2	Zugehörigkeit zum N-Stadium der TNM Klassifikation
NRAS	Neuroblastoma RAS
pTis	Pathohistologische Einteilung der Stadien der TNM Klassifikation; hier „Tumor in situ“
PD-1	Programmed Death protein-1

PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PDX	Patient Derived Xenografts
P504S	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
RAS	Rat Sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
R0	Entfernung des Tumors im Gesunden
T2	Zugehörigkeit zum T-Stadium der TNM Klassifikation
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen (TNM Klassifikation)
UICC	International Union against Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wt.	Wildtyp
5-FU	5-Fluoruracil

1. Einleitung

Mit einer Inzidenz von ca. 60.000 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2016 gehört das kolorektale Karzinom zu einer der häufigsten malignen Erkrankungen in Deutschland. Bei Frauen ist es nach dem Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung, während es bei Männern die dritthäufigste Tumorentität nach dem Prostata- bzw. Lungenkarzinom darstellt. 90% der Karzinome werden nach dem 55. Lebensjahr diagnostiziert. Fünf Jahre nach Diagnosestellung ist mit einer Mortalitätsrate von ca. 37% der Männer bzw. 38% der Frauen zu rechnen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2019).

Die meisten Adenokarzinome des Kolorektums entstehen aus einer gutartigen Vorläuferläsion, dem Adenom, das eine monoklonale Proliferation dysplastischer und benigner Epithelzellen ist. Die daraus resultierende Adenom-Adenokarzinom-Sequenz stellt den vorherrschenden Weg der Pathogenese beim Kolonkarzinom dar (Hamilton 1992). Als Ursprung kommen dabei tubulöse, villöse, tubulovillöse und serratierte Adenome in Frage (Kalimuthu et al. 2016). In der klinischen Praxis gelten Adenome mit einer Größe von ≥ 10 mm, villöser Komponente und/oder hochgradiger Dysplasie, die als fortgeschrittene Adenome bezeichnet werden, als Hochrisiko-Adenome (Carvalho et al. 2018).

Demnach zählt vor allem die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) als erheblicher Risikofaktor. Die FAP ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch die Entwicklung von hunderten kolorektalen Adenomen bei jungen Erwachsenen charakterisiert ist. Erfolgt keine prophylaktische Kolektomie, erfahren nahezu alle betroffenen Patienten maligne Entartungen spätestens im fünften Lebensjahrzehnt (Offerhaus et al. 1992). Das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom oder auch Lynch Syndrom, welches ca. 2-3% aller kolorektaler Karzinome ausmacht, wird durch eine Mutation auf einem der vier Gene des DNA-Mismatch-Reparatur Systems verursacht und stellt einen beachtlichen Risikofaktor für die Entwicklung verschiedener Krebsarten dar, insbesondere aber des Kolons und Endometriums (Steinke et al. 2013). Ferner gilt eine allgemeine familiäre Prädisposition von Darmkrebserkrankungen als erhöhter Risikofaktor selbst zu erkranken (Johns und Houlston 2001). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn erhöhen das Darmkrebsrisiko um das Fünf- bis Siebenfache (Shacter und Weitzman 2002), wobei das Risiko einer Entartung ansteigt, desto länger die chronische Erkrankung besteht (Okayasu 2012).

Die Karzinogenese wird auch durch einen Diabetes mellitus Typ 2 beeinflusst. So stellt unter anderem die Hyperinsulinämie der Erkrankung einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor dar (Engin et al. 2015). Insulin ist ein wichtiger Wachstumsfaktor von Kolonepithelzellen und stellt in vitro ein Mitogen des Tumorzellwachstums dar (Giovannucci 1995). Auch der Lebensstil trägt zum Risikomanagement bei. Eine fleischhaltige (insbesondere rotes Fleisch) Ernährung, tierische Fette und verarbeitete Lebensmittel erhöhen das Darmkrebsrisiko, ebenso wie größere Mengen an Alkohol und Nikotin sowie

körperliche Inaktivität. Protektiv hingegen wirkt der Konsum von Früchten, Gemüse und Ballaststoffen (Waluga et al. 2018).

Der tägliche Konsum von Acetylsalicylsäure hat glaubhaft gezeigt, dass das kolorektale Karzinomrisiko und das Wiederauftreten von adenomatösen Polypen reduziert wird, allerdings überwiegt diese Feststellung nicht die Nutzen-Risiko-Bewertung des Aspirin-induzierten Blutens (Thun et al. 2012).

Zu den signifikanten primären Symptomen des kolorektalen Karzinoms zählen rektale Blutungen, Müdigkeit, verringerter Appetit, Änderungen der Stuhlgewohnheiten, Bauchschmerzen und Gewichtsverlust, wobei Letzteres ein Indiz für den Fortschritt der Erkrankung darstellt (Smith et al. 2006). Darüber hinaus werden Anämien als eines der allgemeinsten Symptome beschrieben (Hatch et al. 2016). Vor dem Hintergrund der Prävention stellt die koloskopische Polypektomie das Mittel der Wahl dar, mit dem Ziel der Entfernung adenomatöser Polypen, damit maligne Entartungen verhindert werden können (Winawer et al. 1993).

Eine Therapieentscheidung zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms erfolgt immer auf der Grundlage einer histologischen Diagnose (Leitlinienprogramm Onkologie 2019a), wobei die UICC Klassifikation (International Union against Cancer) Auskunft über das Stadium des Tumors gibt (Abbildung 1).

Stadium	Ausbreitung
Ia	Beschränkung der Tumordinfiltration auf die Mukosa und Tela submucosa
Ib	Beschränkung der Tumordinfiltration bis auf die Tunica muscularis propria
II	T3 oder T4 ohne Lymphknotenmetastasierung
III	Lymphknotenmetastasierung
IV	Fernmetastasen

Abb. 1: UICC Klassifikation des Kolonkarzinoms (Leischner 2020).

Kolorektale Karzinome haben das Potenzial lymphogen und hämatogen zu metastasieren (Singh et al. 2011). Der lymphogene Metastasierungsweg ist von besonderer Bedeutung für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms, da zahlreiche Lymphknoten in der Nähe des Dickdarms und des Rektums vorhanden sind und sich zudem zahlreiche Lymphgefäße in Längsrichtung unter der kolorektalen Schleimhaut befinden (Huang und Chen 2017). Über den portalen Kreislauf breiten sich die Tumorzellen in die Leber und von dort aus in die Lunge aus (Riihimaki et al. 2016). Die Leber stellt aufgrund ihrer anatomischen Beziehung zum Pfortaderkreislauf den häufigsten Ort für Metastasen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom dar (Valderrama-Trevino et al. 2017).

Aufgrund der Lage des Rektums innerhalb des knöchernen Beckens und seine Nähe zu lebenswichtigen Strukturen stellen sich für die Therapie besondere Herausforderungen dar. Die neoadjuvante Radiotherapie beim Rektumkarzinom hat sich als wirksam erwiesen, die Tumorlast präoperativ zu reduzieren (Feeney et al. 2019). Wird im Rahmen der Koloskopie ein pT1 Karzinom identifiziert, so richtet sich die Therapie vor allem nach der Beurteilung der lymphogenen Metastasierungstendenz und tumorfreien Resektionsrändern, andernfalls gilt die Empfehlung zur chirurgischen Nachresektion (Leitlinienprogramm Onkologie 2019b).

Ansonsten ist die radikale Operation mit kurativer Absicht die Behandlung der Wahl in der Mehrzahl der Kolonkarzinome. Es gelten die grundlegenden chirurgischen Prinzipien: die Entfernung des Hauptgefäßstiels, der den Tumor zusammen mit seinen Lymphgefäßen versorgt, die Erzielung eines tumorfreien Rands und die En-bloc-Resektion aller Organe oder Strukturen, die mit dem Tumor verbunden sind (Rodriguez-Bigas et. al. 2003). Ab Stadium III der UICC Klassifikation wird additiv eine zytotoxische, medikamentöse Therapie mit Oxaliplatin und 5-FU/ Folinsäure eingeleitet (Leitlinienprogramm Onkologie 2019c). Zyostatika greifen in den Zellzyklus ein und beeinflussen dort die DNA oder RNA. Dementsprechend sind die Nebenwirkungen der Medikamente vielfältig, wobei Übelkeit und Diarrhoe, Erschöpfungszustände und Hautausschläge als die häufigsten gelten (Schirrmacher 2019). Auch beim bereits metastasierten Kolonkarzinom (Stadium IV) können Kombinationen von Chemotherapeutika und sogenannten gezielten Krebstherapien wie Cetuximab initial inoperable Lebermetastasen operativ zugänglich machen. Als Konsequenz steigt die 5-Jahres Überlebensrate auf 50% (Nordlinger et al. 2009).

Als monoklonaler Antikörper blockiert das Medikament den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), welcher als Oberflächenprotein maßgeblich für das Zellwachstum verantwortlich ist. Allerdings gilt diese Therapie nur für Patienten ohne Mutationen im KRAS-Gen, sogenannter Wildtyp-KRAS (Chan et al. 2017). Mutationen im KRAS-Gen finden sich bei ca. 30% bis 40% aller kolorektaler Karzinome (Demory Beckler et al. 2013). Die Tumor Onkogene KRAS und NRAS gehören zu der sogenannten RAS Familie, zu dessen Superfamilie mehr als 170 verwandte Proteine zählen (Colicelli 2004). RAS Proteine sind essentielle Bestandteile von Signalnetzwerken, die die Zellproliferation, die Differenzierung bzw. das Überleben der Zelle kontrollieren. Die onkogenen Mutationen von NRAS oder KRAS-Genen verhindern ein physiologisches Ergebnis dieser Signalwege (Fernandez-Medarde und Santos 2011). Während KRAS Mutationen häufig bei verschiedenen Tumorarten vorkommen, ist die Bedeutung von NRAS Mutationen in Hinblick auf die Onkogenese beim Kolonkarzinom unsicher (Irahara et al. 2010).

Patienten mit RAS Mutationen profitieren nicht von monoklonalen Anti-EGFR-Antikörpern (Cremolini et al. 2015). Die Aktivität von antiangiogenen Wirkstoffen scheint nicht vom KRAS-Genstatus beeinflusst zu werden, wieso sich die Forschung auf die Entwicklung von Wirkstoffen konzentriert, die selektiv auf den

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Signalweg abzielen. So hat der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab in Kombination mit einer Chemotherapie wichtige klinische Vorteile in Bezug auf die Ansprechrate, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen gebracht (Garcia-Alfonso et al. 2014). VEGF ist entscheidend für die Neovaskularisation und damit essentiell für die Tumorentwicklung. Angiogenese ermöglicht dem Tumor in die Blutzirkulation einzutreten und durch Nährstoffe sein Wachstum zu gewährleisten (Bendardaf et al. 2017).

Die oben genannte EGFR-Familie besteht aus vier verschiedenen transmembranen Tyrosinkinase: HER1 oder EGFR, HER2, HER3 und HER4 (Human Epidermal growth factor Receptor 1-4). Außer HER2 werden alle Proteine durch spezifische Liganden reguliert und stellen wichtige Mediatoren für das normale Zellwachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zelle dar (Ng und Zhu 2008). Eine Amplifikation von HER2 beim Mammakarzinom geht zwar mit einer schlechten klinischen Prognose einher, bietet jedoch gleichermaßen einen therapeutischen Angriffspunkt. Humanisierte monoklonale Antikörper wie Trastuzumab können das Wachstum von Brustkrebszellen, die HER2 überexprimieren deutlich inhibieren (Goldenberg 1999).

Die Studienlage über die Bedeutung der HER2 Überexpression beim kolorektalen Karzinom ist jedoch uneinheitlich (Wu et al. 2015). Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass die duale Blockade von HER2 mit Trastuzumab und Lapatinib das Tumorwachstum von HER2 positiven, metastasierenden kolorektalen Karzinomen in patient-derived-xenografts (PDX) inhibiert (Sartore-Bianchi et al. 2016). PDX-Modelle beinhalten dieselben prinzipiellen histologischen und genetischen Charakteristika wie der Spendentumor und zeigen eine sichere Prognose hinsichtlich des klinischen Verlaufes sowie der Beurteilung präklinischer Medikamente, der Biomarker Identifikation und personalisierten Behandlungsstrategien auf (Hidalgo et al. 2014). Ferner konnte in einer ersten klinischen Studie bestätigt werden, dass die Kombination dieser Medikamente bei umfangreich vorbehandelten Patienten mit metastasierendem Darmkrebs wirksam ist (Sartore-Bianchi et al. 2016).

Obwohl die Prognose für Patienten mit rezidivierender oder metastasierter Erkrankung extrem schlecht ist, können Chemo- und Strahlentherapie die Überlebensraten verbessern. Dennoch sollen alternative Strategien, wie die Immuntherapie, Ergebnisse für Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium verbessern (Koido et al. 2013). Die Komplexität von Krebserkrankungen mit intra- und intertumoraler Heterogenität von Antigenen und des Genoms, verbunden mit einer immunsuppressiven Mikroumgebung, unterstreicht die Aussicht auf eine personalisierte gezielte Immuntherapie, um das eigene Immunsystem des Patienten gegen die Krankheit zu manipulieren (Chodon et al. 2015).

Krebszellen haben die Fähigkeit verschiedene Immun-Checkpoint Signalwege zu aktivieren, welche immunsuppressiv wirken (Darvin et al. 2018). Hier ist vor allem der PD-L1/ PD-1 Signalweg zu nennen. PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) wird von Tumorzellen exprimiert, um die T-Zell übermittelte

Immunantwort zu hemmen (Shi 2018). CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4) und PD-1 (Programmed Death 1) wirken sich als Oberflächenproteine auf aktivierten T-Zellen antiinflammatorisch auf die Immunantwort aus. Beide dieser inhibitorischen Checkpoints bieten zuverlässige Ansatzpunkte in der Krebstherapie. Sechs Medikamente, die PD-1 bzw. seinen Liganden angreifen und ein Medikament abzielend auf CTLA-4, sind derzeit für die Behandlung verschiedener Krebsarten zugelassen (Rotte 2019). Vor allem für Melanom-Patienten mit (asymptomatischen) Gehirnmastasen ist die Immun-Checkpoint Therapie, insbesondere die Kombination aus dem CTLA-4 Inhibitor Ipilimumab und dem PD-1 Inhibitor Nivolumab, die präferierte Behandlungsmethode (Shi et al., 2020). Trotz all der Effektivität dieser Therapie sprechen jedoch nicht alle Tumorarten darauf an (Shi, 2018).

Beim kolorektalen Karzinom kann die Kombination aus Ipilimumab und Nivolumab eingesetzt werden, allerdings nur bei Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (Rotte 2019). Mikrosatelliten (MS) sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen von ein bis vier Basenpaaren verteilt im menschlichen Genom. Durch die Wiederholungen sind sie besonders anfällig für Replikationsfehler, die normalerweise durch das Mismatch-Reparatur-System (MMR) ausgebessert werden. Ein mangelhaftes MMR (dMMR) führt zu Längenveränderungen der Mikrosatellitensequenzen, was als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet wird (De' Angelis et al. 2018). Ungefähr 15% aller kolorektaler Karzinome weisen eine Mikrosatelliteninstabilität und damit eine bessere Prognose auf als mikrosatellitenstabile (MSS) Tumoren (Vilar und Gruber 2010). Die Identifikation von mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomen ist demnach ein wichtiger prognostischer Marker für den individuellen Therapieerfolg und das Therapieansprechen der Chemo- bzw. Immuntherapie (De' Angelis et al. 2018).

Ferner weisen Kolonkarzinome in fortgeschrittenen Tumorstadien und hoher Mikrosatelliteninstabilität häufig eine BRAF (B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) Mutation auf. Zu den BRAF mutierten Tumoren gehören vor allem das weibliche Geschlecht, rechtsseitig gelegene Tumoren und höheres Alter (Barras et al. 2017). Diese Mutation bewirkt eine konstitutive Aktivierung des MAP- (Mitogen- Activated Protein) Kinase-Weges, welcher essentiell für die Zellproliferation und die Tumorprogression ist. Studien haben gezeigt, dass die BRAF Mutation das Sterberisiko von Patienten mit kolorektalen Karzinomen mehr als verdoppelt (Safae Ardekani et al. 2012). Bei 5% bis 11% der Patienten mit metastasierender Erkrankung tritt die BRAF Mutation auf, wobei diese Tumoren häufiger Peritonealmetastasen entwickeln, seltener solitäre Lebermetastasen und kürzere Überlebensraten nach Metastasektomie zu erwarten haben als Patienten mit BRAF-Wildtyp Tumoren (Yaeger et al. 2014).

Da sich durch die bereits genannten Aspekte zeigen lässt, dass das Kolonkarzinom ein aus immunonkologischer Sicht sehr interessantes Krankheitsbild darstellt, bietet es in Hinblick auf seine Diagnostik und Therapieoptionen weiterhin großen Anlass zur Forschung. Das Detektieren von

neuen Biomarkern und verbesserten Therapien steht dabei im Fokus der Wissenschaft.

Die Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR), auch bekannt als P504S, ist einer der wenigen Biomarker, der maligne Zellen der Prostata von benignen mit hoher Sensitivität und Spezifität unterscheiden kann (Jiang et al. 2004). Analysen von AMACR mRNA Konzentrationen haben ergeben, dass diese im Schnitt im maligne veränderten Prostatagewebe um das Neunfache erhöht sind, im Vergleich zum Normalgewebe (Luo et al. 2002). Physiologisch wurde eine hohe Expression von AMACR mRNA in der Leber, Niere und den Speicheldrüsen identifiziert, wobei das AMACR Protein in den Hepatozyten der Leber, den tubulären Epithelzellen der Niere, den bronchialen Epithelzellen der Lunge und den Epithelzellen der Mucosa der Gallenblase nachgewiesen ist (Jiang et al. 2003b). Das Gen für AMACR liegt auf dem Chromosom 5p13 und kodiert ein aus 382 Aminosäuren bestehendes Protein (Evans 2003), welches eine Schlüsselrolle in der beta-Oxidation von verzweigt-kettigen Fettsäuren und den Gallensäuren Zwischenprodukten Di- und Trihydroxycholestanoylsäure einnimmt. Im Speziellen katalysiert es die Umwandlung von (2R)-Methyl verzweigten Fettsäure-CoA-Ligasen in deren (S) stereoisomer Form. Nur Stereoisomere mit der 2-Methylgruppe in der (S) Position können von peroxisomalen Oxidasen verstoffwechselt werden, welche die ersten Enzyme im Laufe der beta-Oxidation darstellen. Die AMACR lässt sich sowohl in den Peroxisomen als auch in den Mitochondrien des menschlichen Organismus nachweisen. In Letzteren ist das Enzym entscheidend für den Stoffwechsel der Pristansäure (Ferdinandusse et al. 2000). Darüber hinaus nimmt AMACR eine zentrale Rolle in der Inversion von Ibuprofen und anderer 2-Arylpropionsäure-Derivate ein, da nur die S-Enantiomere die COX- (Cyclooxygenase) Aktivität maßgeblich inhibieren können und dementsprechend die Ausschüttung von Prostaglandinen und anderen Entzündungsmediatoren (Lloyd et al. 2013, Woodman et al. 2011).

Da P504S ein wertvolles Mittel in der Diagnostik des Prostatakarzinoms darstellt, wurde das Enzym ferner in Hinblick auf seine Bedeutung in der Diagnostik anderer Neoplasien untersucht.

Immunhistochemische Untersuchungen haben ergeben, dass Tumoren mit hoher AMACR Expression Adenokarzinome der Prostata, hepatozelluläre Karzinome, papilläre Nierenzellkarzinome und kolorektale Adenokarzinome umfassen (Went et al. 2006). In einer Studie wurden 1315 kolorektale Karzinome untersucht, wobei 81,7% der Fälle eine positive AMACR Färbung aufwiesen. Die Analyse der AMACR Immunhistochemie zeigt, dass sich diese deutlich mit der Differenzierung des Tumors, dem Staging, einem nicht-muzinösen Phänotypen und linksseitig gelegenen Tumoren verknüpfen lässt.

Bezogen auf den klinischen Ausgang gaben die Färbeergebnisse jedoch keinen Hinweis (Marx et al. 2008). Eine Studie aus 2017 konnte eine verminderte Expression der AMACR in high Grade Karzinomen nachweisen, was die genannten Ergebnisse stützt. Diese Studie basierte auf der Annahme, dass eine

Verbindung zwischen einer für die Pathogenese begünstigenden Ernährung und einer vermehrten Expression der AMACR in kolorektalen Vorläuferläsionen und Karzinomen besteht. Rotes Fleisch und Milchprodukte, die als Quelle für verzweigtkettige Fettsäuren dienen, benötigen die AMACR für ihre Oxidation und sind nachweislich an der Entwicklung von Darmkrebs beteiligt (Shukla et al. 2017).

Bis heute haben neun verschiedene Studien die Expression von AMACR beim Kolonkarzinom immunhistochemisch untersucht. Die Daten dieser Studien sind in den Tabellen 1 bis 9 zusammengestellt.

Tab. 1: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Shukla et al. 2017).

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Shukla et al., 2017	44	Klon-AN538-5M, Biogenex, USA	Finales Färbegergebnis ≥ 1 (20%)	45.45% geringe Expression, 13.63% moderate Expression	6.81%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Grading:

Kein signifikanter Unterschied der AMACR Expression in G1 und G2 Tumoren ($p > 0.05$)

AJCC Staging:

Keine signifikante Assoziation mit der AMACR Expression ($p > 0.05$)

Nodalstatus:

Kein signifikanter Unterschied der AMACR Expression in nodal positiven und negativen Karzinomen ($p > 0.05$)

Tab. 2: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Jiang et al. 2003a)

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Jiang et al. 2003a	176	Monoklonaler Kaninchen Antikörper zu AMACR/ P504 S	Braunes granuläres zytoplasmatisches Muster; Fälle mit >5% Färbung der Tumorzellen	/	69%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Grading:

Gut und moderat differenzierte Karzinome zeigten AMACR Überexpression (76%, bzw. 75%), schlecht differenzierte weniger Färbhäufigkeit (36%; $p < 0.01$)

TMN Klassifikation:

Keine Korrelation

Tab. 3: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Lin et al. 2007).

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Lin et al. 2007	163	Monoklonaler Antikörper für AMACR (Zeta, Sierra Madre, CA)	Diffuse oder apikale zytoplasmatische Färbung	75%	39%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Mangel an Färbung korreliert mit:

Schlechter Tumordifferenzierung ($p < 0.021$), muzinösem Phänotypen ($p < 0.001$), lymphovaskulärer Invasion ($p < 0.032$) und schlechter 5-Jahres-Überlebensrate ($p < 0.012$)

Tab. 4: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Marx et al. 2008).

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Marx et al. 2008	1315	Monoklonaler Kaninchen anti-Mensch p504s Antikörper (clone 13H4; DAKO, Glostrup, Denmark)	Tumore, die wenigstens eine schwache AMACR Färbung zeigen	81.7%, schwache Färbung in 21.0% der Fälle	60.7%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Verminderte AMACR Expression signifikant assoziiert mit:
 Hohem Tumorgrad ($p < 0.0001$) und hohem Tumorstadium ($p < 0.0001$)

Nodalstatus:
 Keine Korrelation ($p = 0.087$)

Patientenüberleben:
 Keine Korrelation ($p = 0.1669$)

Tab. 5: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Shi et al. 2007).

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Shi et al. 2007	106, 47 mit Lymphknotenmetastasen	Monoklonaler Kaninchen Antikörper zu AMACR/ P504S (Zymed, USA)	Fälle mit $>5\%$ positiver Färbung der Tumorzellen	Karzinome: 59.4%, mit Lymphknotenmetastasen: 46.8%	Gut und moderat differenzierte Karzinome: 79.6%, schlecht differenzierte Karzinome: 22.2%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Keine Relation zwischen:
 AMACR Expression und Gesamtüberleben

Höhere AMACR Expression in:
 Gut und moderat differenzierten Karzinomen ($p < 0.001$) bzw. ($p < 0.01$), im Vergleich zu schlecht bzw. undifferenzierten Karzinomen

Tab. 6: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Zhou et al. 2002)

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Zhou et al. 2002	TMA: 15, Glasobjektträger: 24 (16 gut und mäßig differenziert, 8 schlecht differenziert)	Polygonaler Kaninchen anti-AMACR Antikörper	Moderate (diffuse granuläre zytoplasmatische) und starke (diffuse intensive zytoplasmatische) Färbungsergebnisse	TMA: 92%, Glasobjektträger: 83%	/

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Positive Färbung:

100% der gut und mäßig differenzierten Karzinome, verglichen mit 64% der schlecht differenzierten Karzinome

Tab. 7: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Chen et al. 2005)

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Chen et al. 2005	66	Anti-AMACR Kaninchen IgG (Biocare Medical, Walnut Creek, USA)	Zytoplasmatische Färbung, Immunreaktivität in >5% der Tumorzellen	62%	/

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Muzinöse Tumore zeigen weniger AMACR Expression als nicht-muzinöse ($p < 0.0001$), schlecht differenzierte Karzinome zeigen weniger AMACR Expression als gut bis moderat differenzierte Karzinome ($p = 0.0259$)

Tab. 8: Immunhistochemische Studie zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Went et al. 2006)

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Went et al. (2006)	45 Adenokarzinome; Adenome moderate Dysplasie: 45, Adenome schwere Dysplasie: 42	Monoklonaler Kaninchen Antikörper (P504S, clone 13H4; Biologo, Germany)	Schwach: 1+ Färbung in <60% der Zellen oder 2+ Färbung in <30% der Zellen, Moderat: 1+ Färbung in $\geq 60\%$ der Zellen, 2+ Färbung in 30-70% oder 3+ Färbung in <30% der Zellen, Stark: 2+ Färbung in $\geq 70\%$ oder 3+ Färbung in $\geq 30\%$ der Zellen	Adenome moderate Dysplasie: 82%, Adenome schwere Dysplasie: 83%, Adenokarzinome: 71%	Adenome moderate Dysplasie: 24%, Adenome schwere Dysplasie: 40%, Adenokarzinome: 33%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

AMACR Expression gleich häufig in kolorektalen Adenomen und Karzinomen

Tab. 9: Immunhistochemische Studien zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom (Emam et al. 2016).

Autor	n	Antikörper	Kriterien für positiv	% positiv	% stark positiv
Emam et al. (2016)	196 kolorektale Karzinome, 49 Lymphknotenmetastasen	Polyklonaler Maus Antikörper, 1:200 (Dako, Dänemark)	Immunfärbung in $\geq 10\%$ der Zellen	Karzinome: 42.9%, Lymphknotenmetastasen: 32.7%	Karzinome: 10.7%, Lymphknotenmetastasen: 4.1%

Beziehung zu pT, pN, tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben:

Geringe AMACR Färbung assoziiert mit Auftreten von: Lymphknotenmetastasen ($p=0.039$) und peripheren Metastasen ($p=0.022$)

Keine Relation zu: Krankheitsfreiem Überleben ($p=0.414$) und Gesamtüberleben ($p=0.566$)

Reduzierte AMACR Färbung als unabhängige Variable für: Positive Resektionsränder ($p<0.001$), lymphovaskuläre Invasion ($p<0.001$), nodale ($p=0.046$) und periphere Metastasen ($p=0.026$)

In ihrer Gesamtheit suggerieren die Daten, dass die AMACR Expression beim Kolonkarzinom eine relevante Rolle spielt, wobei die genaue Einordnung der Bedeutung aufgrund der divergierenden Ergebnisse schwerfällt.

Eine wesentliche Ursache für abweichende Befunde immunhistochemischer Studien liegt in der Auswahl der für ein Projekt genutzten Reagenzien und Antikörper sowie die verwendeten Protokolle und Auswahlkriterien.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die klinische und biologische Bedeutung der AMACR Expression beim Kolonkarzinom besser zu verstehen. Um dies zu ermöglichen, wurde ein besonders großes Patientenkollektiv von 1802 Tumoren, mit zwei verschiedenen AMACR Antikörpern untersucht und die Ergebnisse wurden nicht nur mit chemisch-pathologischen Parametern, sondern auch mit relevanten molekularen Befunden wie beispielsweise Mikrosatellitenstatus, Zahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten und PD-L1 Expression in Beziehung gesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Die Tissue Microarray (TMA-) Methode

Tissue Microarrays werden mit einem eigens dafür hergestellten semi-automatischen Gerät hergestellt (Abb. 2). Ein wesentlicher Bestandteil des Gerätes ist ein Empfängerblockhalter, welcher sicherstellt, dass Empfängerblöcke immer an genau der gleichen Positionen in das Gerät eingespannt werden.

Der Empfängerblockhalter ist so konstruiert, dass 6 Blöcke gleichzeitig hergestellt werden können (Abb. 3). Über dem Blockhalter befindet sich ein mechanisches Gerät, welches im Wechsel den Einsatz eines Bohrers und einer Hohlzylinder an einer genau definierten Stelle des Empfängerblocks ermöglicht. TMAs werden immer mindestens in achtfacher Ausfertigung hergestellt, um die Herstellung möglichst effizient und ökonomisch zu gestalten. Die Herstellungsprozedur beginnt mit dem Herstellen von je einem 0,6 Millimeter messenden Loch in das erste Replikat. Danach wird die Wechseleinrichtung auf die Hohlzylinder umgestellt und es wird ein Zylinder aus dem vorbestimmten Gewebeblock ausgewählt. Der Zylinder wird dann in das vorgefertigte Loch deponiert. Diese Prozedur wird für die übrigen 7 Replikate des TMAs wiederholt, wobei darauf geachtet wird, dass die entnommenen Gewebezylinder aus unmittelbar benachbarten Regionen stammen. Dies ist wichtig, um mögliche Einflüsse einer Heterogenität im Gewebe auf die Untersuchungsbefunde, welche später mit verschiedenen Replikaten des gleichen TMAs erhoben werden, auszuschließen. Danach wird unter Einsatz eines computergesteuerten Schrittmotors die nächste Position des TMA Block angesteuert und die Prozedur wiederholt. Im optimalen Fall enthält ein TMA-Paraffinblock, welcher im UKE hergestellt wird, bis zu 612 verschiedene Gewebeproben, worunter auch Kontrollgewebe unterschiedlicher Art fallen kann.

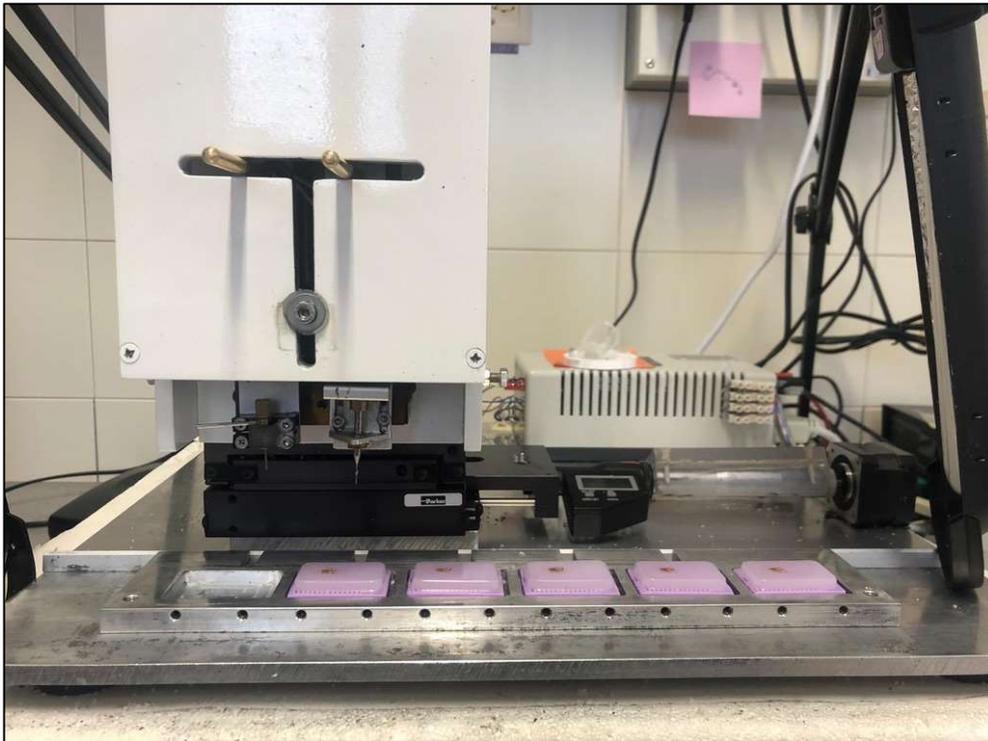


Abb. 2: Gerät zur Herstellung eines TMA's.

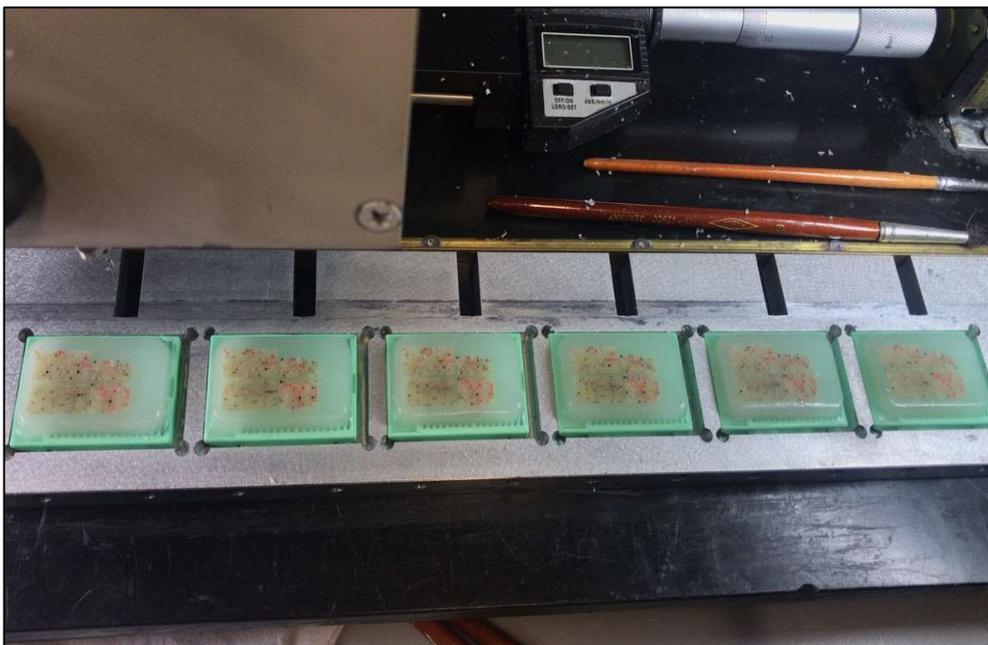


Abb. 3: Herstellung von sechs Replikaten für einen TMA.

Der Standardaufbau eines großen TMA's beinhaltet am UKE 6 Sektoren. Diese sind, um eine Orientierung am Gewebe zu ermöglichen, ungleichgroß und asymmetrisch angeordnet. Die Sektorenbezeichnung erfolgt mit Großbuchstaben (A-F). Die Sektoren enthalten 9 Zeilen (markiert mit 1-9) und eine variable Menge an Spalten (bezeichnet mit Kleinbuchstaben). Bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer TMA's ergibt sich eine eindeutige Bezeichnung jedes einzelnen Gewebestücks durch die TMA Bezeichnung und die Koordinate. Ein Beispiel für die Struktur eines UKE TMA's ist in Abbildung 4 gezeigt.

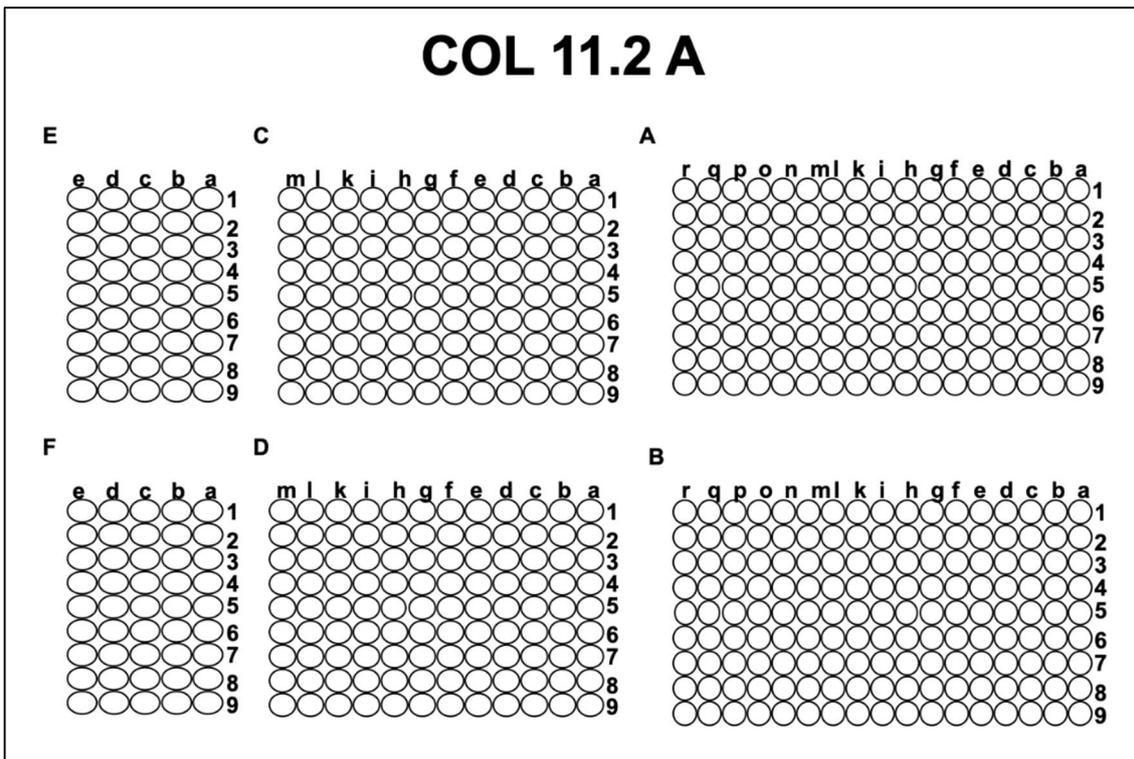


Abb. 4: Schematische Darstellung eines UKE TMA.

Das beschriebene Verfahren zur TMA Herstellung ist wenig arbeitsaufwendig. Die Herstellung eines TMA mit 600 Tumoren in 6 Replikaten dauert unter Einsatz einer Vollzeit MTA ungefähr 5 Tage. Diese Zeitdauer ist allerdings für den realistisch einkalkulierten Zeitaufwand für eine TMA Herstellung nur der kleinste Teil der Arbeit. Die Problematik beim Verfahren ist die Identifikation der geeigneten Tumoren sowie die Selektion der geeigneten Tumorblöcke und der relevanten, tumorenhaltenden Areale in ausgewählten Blöcken. Die Gesamtarbeit beinhaltet zunächst die Erstellung einer Liste durch eine Datenbankabfrage. Von dieser Liste lässt sich ein Teil bereits durch sorgfältiges Lesen der Unterlagen ausschließen, nämlich dann, wenn von sehr kleinen Tumoranteilen oder kleinen Gewebestücken gesprochen wird. Danach müssen von den Kandidatengeweben sämtliche Schnittpräparate aus dem Archiv geholt werden, wobei nicht selten 10 oder mehr Schnitte pro Fall herausgesucht werden. All diese Schnitte müssen von einem Pathologen auf Eignung für die TMA Herstellung evaluiert werden, wobei die Kriterien „möglichst viel Tumor, mit möglichst wenig Stroma oder Nekrosen“ dazwischen gelten. Von den ausgewählten Schnitten müssen in einer zweiten Phase die korrespondierenden Blöcke herausgesucht werden, um zu überprüfen, ob diese überhaupt für den Stanzprozess geeignet sind.

Die Paraffinblöcke sind naturgemäß ungleich dick und tief, was damit zusammenhängt, dass die vom Pathologen aus Tumorpräparaten herausgeschnittenen Scheiben von variabler Dicke sind. Je nachdem wie viele Schnitte und Zusatzuntersuchungen am ausgewählten Block durchgeführt wurden, kann bereits ein erheblicher Teil des ursprünglichen Blockes

aufgebraucht sein. Grundsätzlich sollen Gewebelöcke verwendet werden, welche mindestens eine verbliebene Tiefe von 2 Millimetern aufweisen.

Vom final ausgewählten Gewebelöck wird am korrespondierenden HE-Schnitt das zum Stanzen geeignete Gewebe von einem Pathologen mittels eines permanenten Filzstiftes markiert. Nach dem erfolgreichen Selektionsprozess für geeignete Proben werden diese in vorher definierter Reihenfolge in der Umgebung des Stanzgerätes zusammensortiert, sodass immer Schnitt und Block eines Falles aufeinander neben dem Stanzgerät liegen.

Für die Zeit, während der eine TMA geplant und hergestellt wird, ist es nötig, die Tumorschnitte und Blöcke durch die früher definierten Biopsienummern zu definieren. Nach dem Abschluss der TMA Herstellung werden die Biopsienummern allerdings entweder ausgeblendet oder definitiv gelöscht. Dieses Verfahren verspricht eine äußerst effiziente Pseudonomisierung bzw. Anonymisierung der Gewebe, sodass die Tissue Microarray-Technik ein extrem sicheres Verfahren zur Erfüllung von Datenschutzrichtlinien beschreibt. Das verbliebene Tissue Microarray-File beinhaltet dann nur die TMA Koordinate in Kombination mit den zum Zeitpunkt der Herstellung verfügbaren klinischen und pathologischen Daten. Ein Beispiel einer TMA Datei zum Kolonkarzinom ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Beispiel für ein Datenfile des Kolonkarzinom TMAs.

TMA Lokalisation	Tumor-lokalisation	Tumortyp	pT	pN	Tumordurchmesser (mm)	Tumorgrad
A 1a	C. descendens	Adenokarzinom	pT3	pN2	32	2
A 1b	C. transversum	Adenokarzinom	-	-	40	2
A 1c	C. ascendens	Adenokarzinom	pT3	pN0	120	2
A 1d	Sigma	Adenokarzinom	pT3	pN1	128	2
A 1e	Sigma	Adenokarzinom	pT3	pN0	56	2
A 1f	Rektum	Adenokarzinom	pT3	pN2	64	2

2.2 Kolonkarzinom TMA

2.2.1 Patientenkollektiv

Der Kolonkarzinom TMA beinhaltet 826 Karzinome aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und 976 Kolonkarzinome aus dem Institut für Pathologie des Klinikums Fürth.

Die zu den TMA verfügbaren Patientendaten setzen sich wie folgt zusammen: Tumorlokalisierung (in 1783 der Patientenfälle), Tumorseite (für 1794 Patienten, 1311 links- und 483 rechtsseitige Tumoren), Tumortyp (für 1801 Patienten), pT (in 1784 der Patientenfälle), pN (für 1767 Patienten), Tumordurchmesser (für 1757 Patienten), muzinöse Tumorkomponente (für 623 Patienten), Infiltrationstyp (für 723 Patienten), Tumor budding (für 1260 Patienten), peritumorale

lymphozytäre Infiltration (für 699 Patienten), Angioinvasion (für 1757 Patienten), Lymphgefäßinvasion (für 1740 Patienten), Perineuralscheideninvasion (für 783 Patienten), Mikrosatellitenstatus (für 1297 Patienten), RAS Mutation (für 847 Patienten), BRAF Mutation (für 157 Patienten), HER2 Amplifikation (für 767 Patienten), CD8 Dichte (für 1740 Patienten) und proliferierende CD8+ Zellen (für 1441 Patienten).

Eine Übersicht des Patientenkollektivs ist in folgender Tabelle (Tab. 11) dargestellt.

Tab. 11: Übersicht des Patientenkollektives des Kolonkarzinom TMAs.

	n	Hamburger Kollektiv	Fürther Kollektiv
Alle Tumoren	1802	826	976
Tumorlokalisation			
Zökum	172	35	137
C. ascendens	200	46	154
C. transversum	110	21	89
C. descendens	115	39	76
C. sigmoideum	725	452	273
Rektum	461	230	231
Tumorseite			
Links	1311	720	591
Rechts	483	101	382
Tumorstadium			
pT1	76	36	40
pT2	354	154	200
pT3	989	440	549
pT4	365	187	178
Nodalstatus			
pN-	926	409	517
pN+	841	404	437
V-Status			
V0	1295	601	694
V1	450	206	244
V2	12	6	6
L-Status			
L0	671	413	258
L1	1069	362	707
RAS Mutation			
Wildtyp	494	436	58
Mutiert	380	335	45
BRAF Mutation			
Wildtyp	135	128	7
Mutiert	22	22	0
Mikrosatellitenstatus			
Stabil	1203	647	556
Instabil	94	34	60

2.2.2 Aufbau des Hamburg-Fürth Kolonkarzinom TMAs

Aus früheren Studien, welche am gleichen TMA durchgeführt worden waren, waren bereits verschiedene molekulare Daten vorhanden.

Dazu gehörten immunhistochemische Daten zur Expression von MUC5AC (Rico et al. 2020), p53 und p16, E-Cadherine und PD-L1. Ferner der immunhistochemische Status der Mismatch-Repair-Gene MSH2 und MSH6, MLH1, PMS2 und die mittels digitaler Bildanalyse bestimmte Dichte CD8 positiver Lymphozyten in einem Unterkollektiv von 826 Tumoren (Abu Hashem 2021). Es ist hervorzuheben, dass die CD8 Dichte des Kollektivs mit einer aufwändigen Vorgehensweise ungewöhnlich präzise bestimmt wurde. Das Verfahren beinhaltete nicht nur eine automatische Auszählung der CD8 positiven Zellen für jeden Gewebespot, sondern auch die Berücksichtigung der Fläche eines TMA Spots. Dies ist eine wichtige Korrektur, denn in einem nicht zu vernachlässigenden Teil der Fälle ist ein theoretisch 0,6 Millimeter messender TMA Spot nicht vollumfänglich auf jedem Schnitt vorhanden.

Der Hamburg-Fürth Kolonkarzinom TMA besteht aus vier Gewebepblöcken, welche 521, 303, 612 und 362 verschiedene Tumoren enthalten. Die Paraffinblöcke des TMA Blocks sind in den Abbildungen 5 und 6, Übersichtsaufnahmen von 4 gefärbten Schnitten in den Abbildungen 7 bis 10 dargestellt.

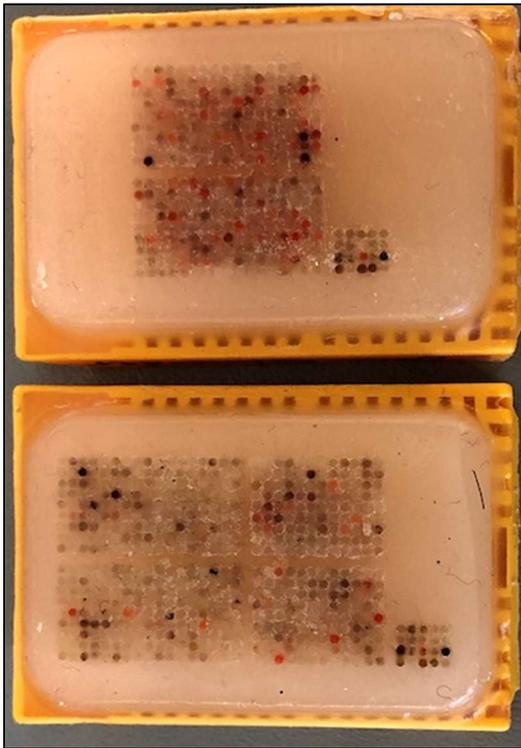


Abb. 5: Paraffinblöcke des Kolonkarzinom TMAs (unten COL 10.2 A, oben COL 10.2 B).



Abb. 6: Paraffinblöcke des Kolonkarzinom TMAs (unten COL 11.2 A, oben COL 11.2 B).

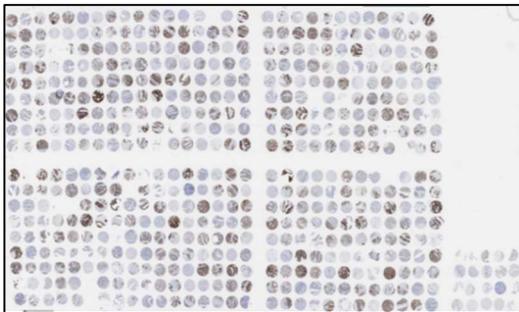


Abb. 7: Übersichtsaufnahme HE-Schnitt (COL 10.2 A).



Abb. 8: Übersichtsaufnahme HE-Schnitt (COL 11.2 A).



Abb. 9 Übersichtsaufnahme in der Färbung 1:1350 (COL 10.2 A).



Abb. 10: Übersichtsaufnahme in der Färbung 1:1350 (COL 11.2 A).

2.3 Immunhistochemie

Nachdem für optimale Färbeverhältnisse gesorgt wurde, sind zwei verschiedene Antikörper für die immunhistochemische Färbung genutzt worden.

Der Klon AMACR 8F4 wurde am Institut für Pathologie des UKE erzeugt. Zur Immunisierung wurde das Peptid AMACR4 verwendet, welches den Aminosäuren „CLWKTQKLSLWEAPRGQNML“ des AMACR Proteins entspricht. Dieser Antikörper hatte zuvor an einem speziell hergestellten AMACR Test-TMA bestmögliche Ergebnisse gezeigt. Demnach wurde dieser für die weitere Diagnostik als optimal einsetzbar erachtet. Vor allem konnte beim Prostatakarzinom und den proximalen Nierentubuli eine intensive Färbung nachgewiesen werden, wohingegen sich die Schleimhaut des Kolons und Plazentagewebe weitestgehend als nicht angefärbt darstellten.

Das folgende Protokoll wurde für die Färbung verwendet:

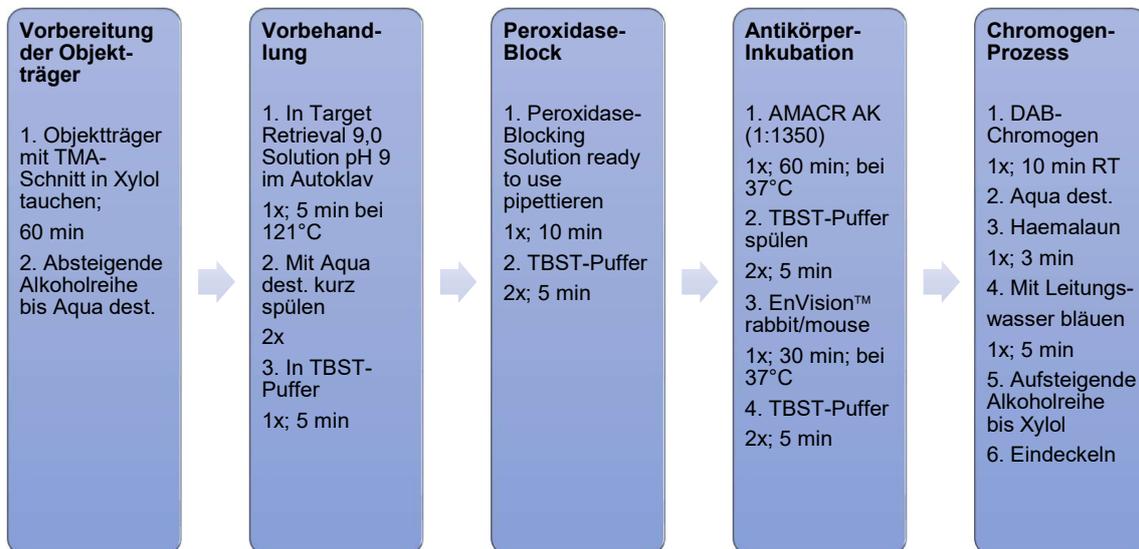


Abb. 11: Immunhistochemisches Färbeprotokoll für den AMACR Antikörper UKE Klon HH 8F4.

Als zweiter Antikörper wurde der Dako Klon 13H4 Ready to use (Dako IR060) verwendet. Für diesen ist nach dem am pathologischen Institut standardisierten Färbeprotokoll für die Routine Diagnostik vorgegangen worden.

Der Vorgang der Immunhistochemie fand im Dako-Stainer statt, wobei der Antikörper gemeinsam mit dem Dako Envision Flex-Kit in den Dako-Stainer gegeben wurde. Vorher wurden 4µm dicke Schnitte hergestellt, die zunächst im Brutschrank bei 98°C und pH9 30 Minuten entparaffiniert wurden. Die Färberegebnisse sind im Anschluss von dem Institutsleiter der Pathologie, Prof. Sauter, ausgewertet worden und der prozentuale Anteil der gefärbten Tumorzellen und die Färbeintensität (0, 1+, 2+, 3+) geschätzt.

Danach erfolgte die Klassifikation der Tumorgewebe in vier Kategorien:

negativ, schwach positiv, mäßig positiv, stark positiv. Die Einteilung erfolgte auf nachstehender Grundlage:

negativ: keine Färbung nachweisbar; schwach positiv: Färbeintensität 1+ in weniger als 70% der Tumorzellen oder 2+ in maximal 30% der Tumorzellen;

mäßig positiv: 1+ in mehr als 70% der Tumorzellen oder 2+ in mehr als 30%, aber höchstens 70% der Tumorzellen oder 3+ Intensität in maximal 30% der Tumorzellen; stark positiv: 2+ in mehr als 70% der Tumorzellen oder 3+ in mehr als 30% der Tumorzellen.

2.4 Statistik

Für die Evaluation der statistischen Beziehungen zwischen kategorischen und kontinuierlichen Variablen (CD8 Lymphozytendichte) wurde ein t-Test durchgeführt. P-Werte mit einem Wert von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit der Tissue Microarrays

Für den Klon HH 8F4 waren 1497 von 1802 untersuchten Tumoren (83%) auswertbar. Für den Klon 13H4 von Dako waren 1492 der 1802 untersuchten Tumoren (82,8 %) auswertbar. Ursachen für die Nichtauswertbarkeit von einzelnen Geweben war das Fehlen eindeutiger Tumorzellen aus dem Gewebespot des Arrays oder aber das Fehlen von Gewebe an einzelnen Stellen eines TMAs.

3.2 Immunhistochemische Befunde

Die immunhistochemischen Befunde waren für die beiden verwendeten Antikörper weitgehend identisch. Die Mehrzahl der untersuchten Tumoren zeigten eine in Ausmaß unterschiedliche zytoplasmatische granuläre Anfärbung, wobei meist alle in einem TMA Spot erfassten Zellen eine weitgehend identische Anfärbbarkeit zeigten.

Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität sind für den DAKO Antikörper in Abbildung 12 und für den Klon 8F4 in den Abbildungen 13 bis 14 dargestellt.

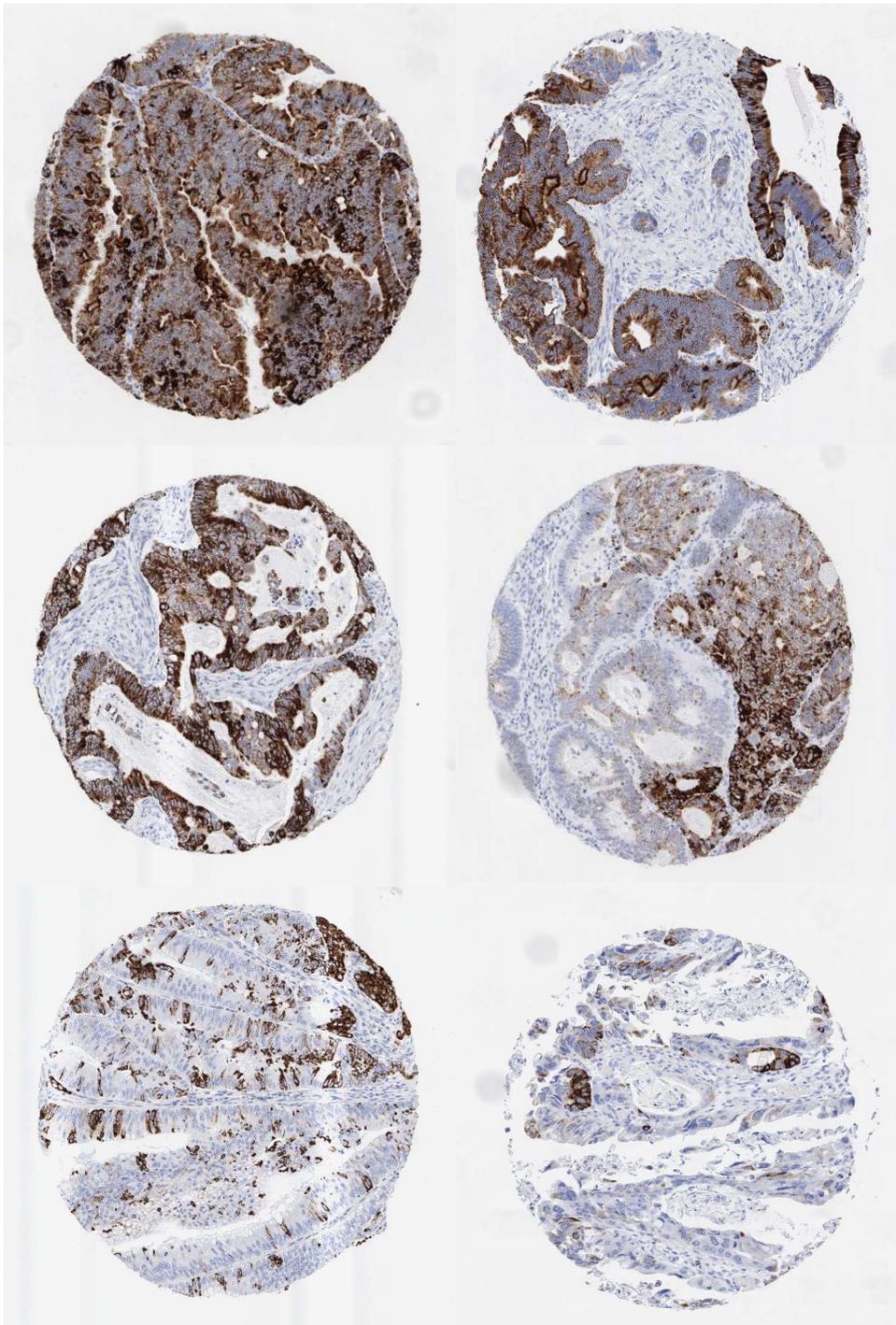


Abb.12: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon Dako 13H4.

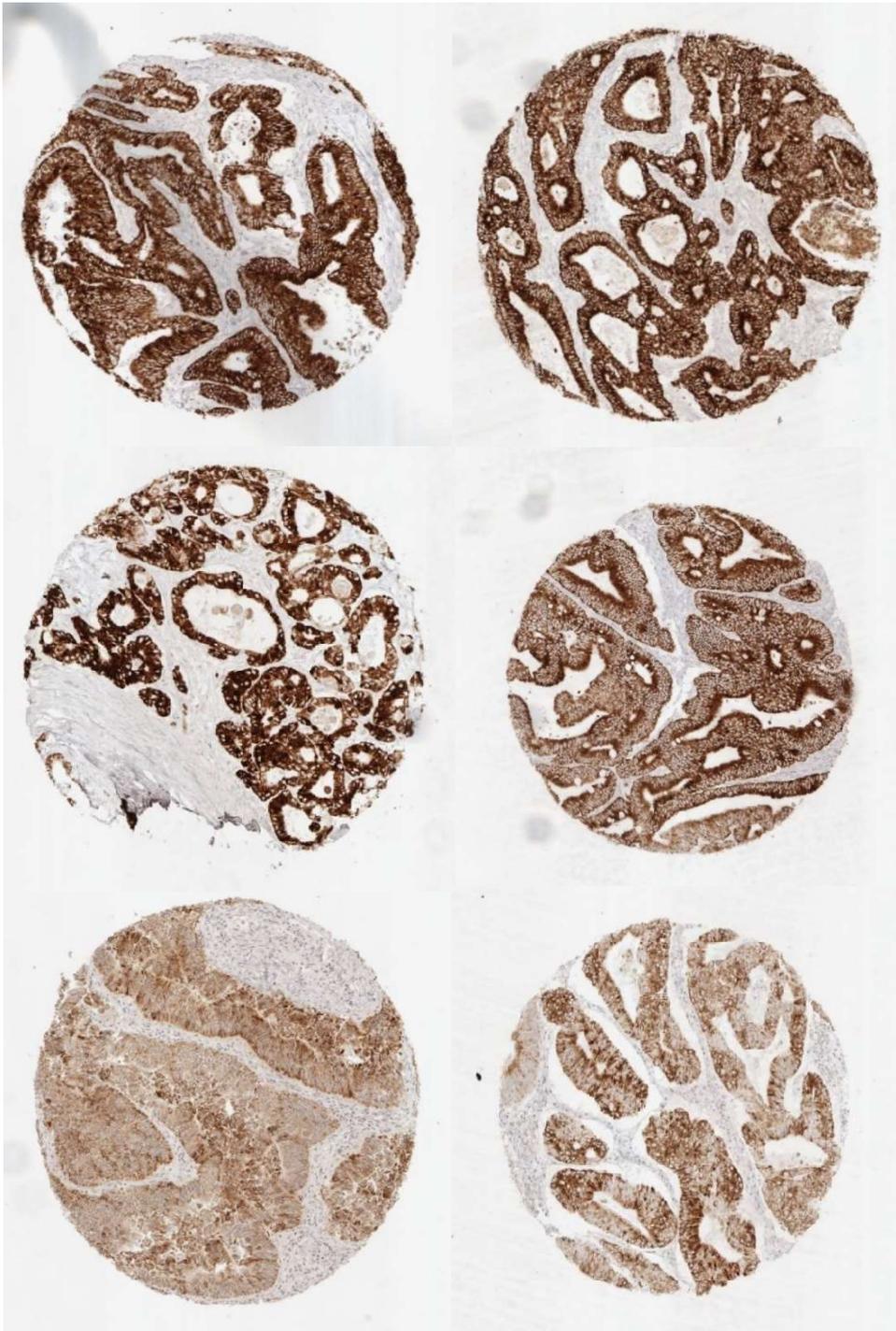


Abb. 13: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon HH 8F4.

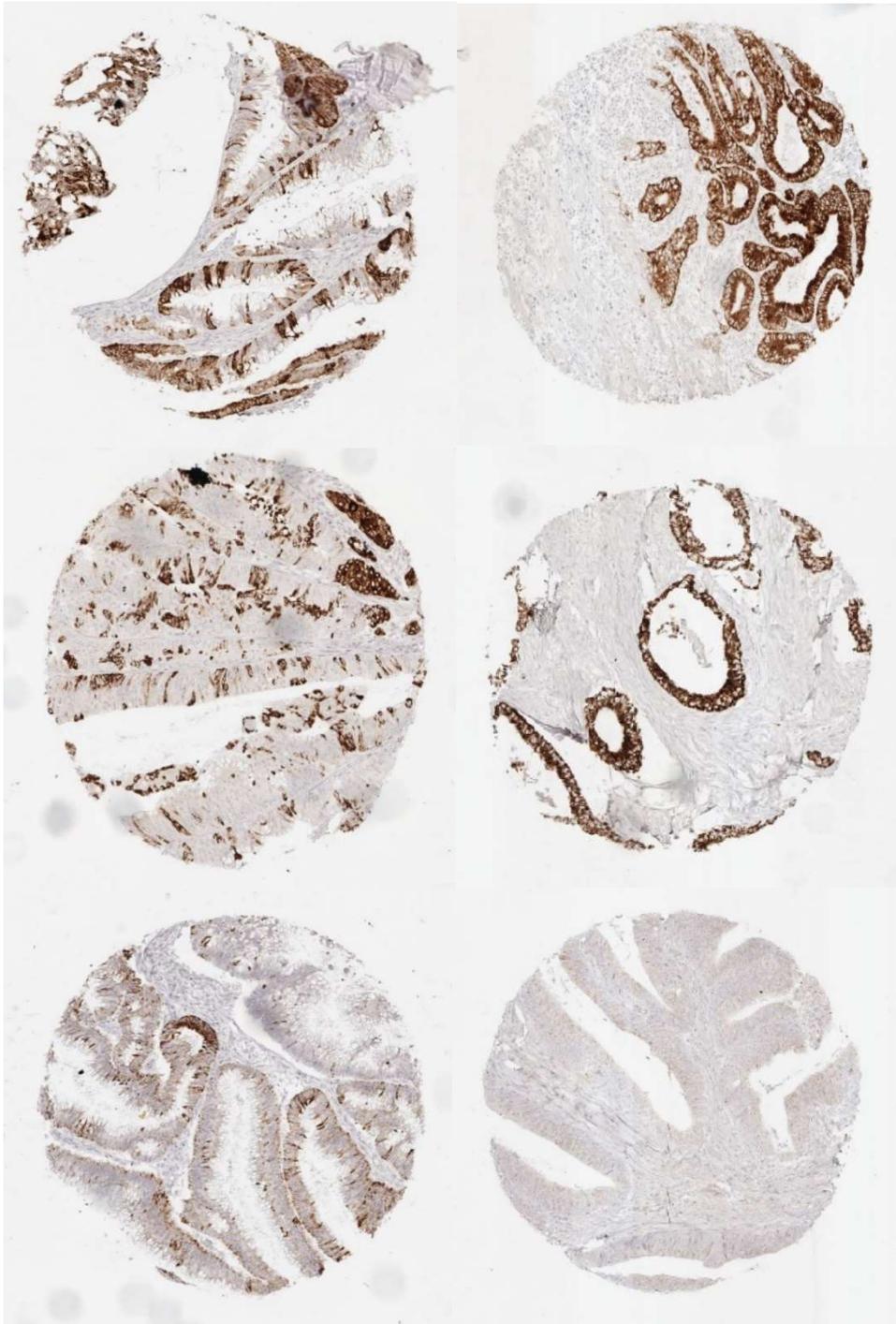


Abb. 14: Repräsentative Bilder von Kolonkarzinomen mit unterschiedlich stark ausgeprägter AMACR Positivität; Klon HH 8F4.

Der Vergleich der mit den beiden Antikörpern erzielten Färbeergebnisse ergab keine Anhaltspunkte auf einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Antikörpern. Mit dem Dako Antikörper waren 22% der Tumoren als negativ, 16% als schwach positiv, 15% als mäßig positiv und 47% als stark positiv klassifiziert worden, wobei die entsprechenden Zahlen für den Klon 8F4 mit 15% negativen, 12% schwach positiven, 15% mäßig stark positiven und 58% stark positiven Tumoren sehr ähnlich ausfiel. Dementsprechend bestand auch eine enge Korrelation zwischen den mit beiden Antikörpern gefundenen Färbeintensitäten (Abb. 15, $p < 0.0001$).

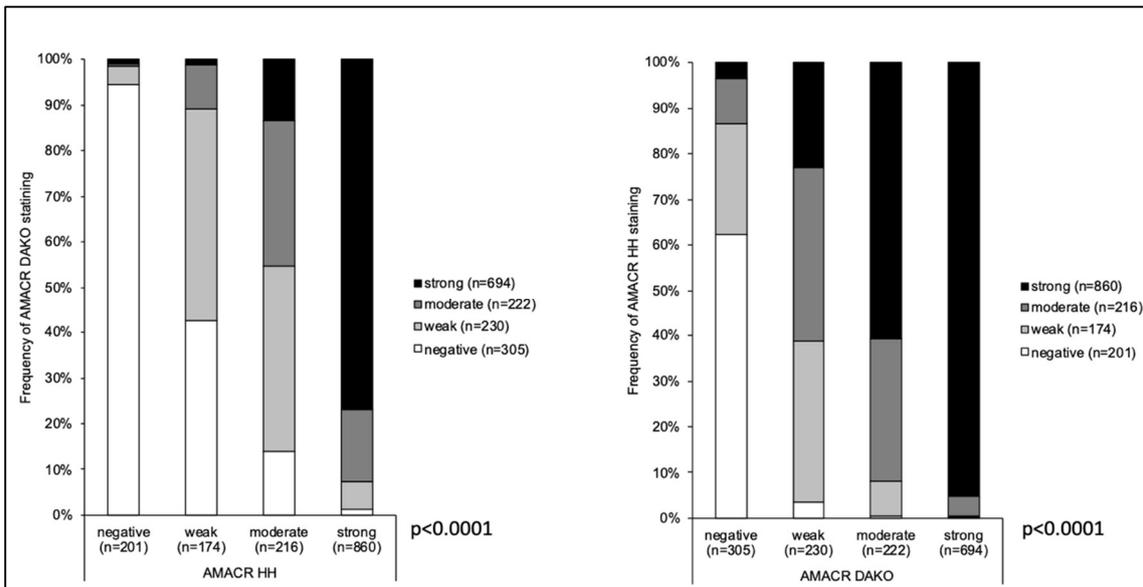


Abb. 15: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 in beiden Kollektiven.

Da die untersuchten Tumoren in zwei verschiedenen pathologischen Instituten verarbeitet worden waren, erfolgte zum Ausschluss systematischer Unterschiede, beispielsweise verursacht durch Unterschiede in den Fixationspraktiken, eine separate Analyse der beiden Kollektive, wobei die Häufigkeitsverteilung der AMACR-Befunde sowohl für den Klon HH 8F4 (Abb. 16) als auch für den Klon Dako 13H4 (Abb. 17) keine relevanten Unterschiede aufwiesen.

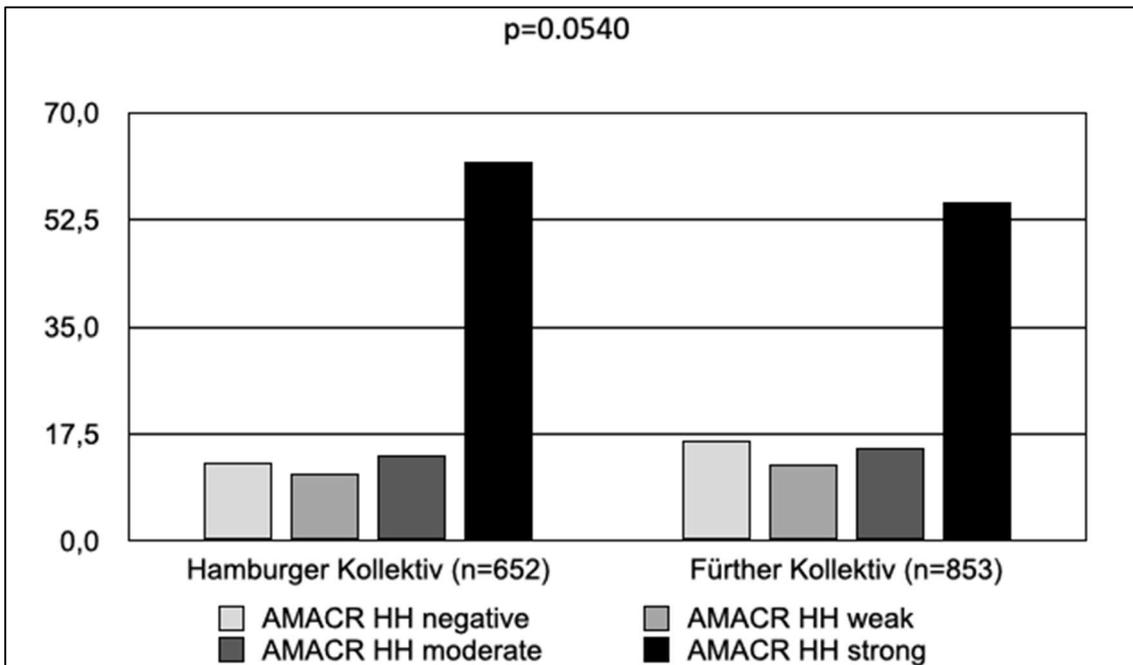


Abb. 16: AMACR HH 8F4 in beiden Kollektiven.

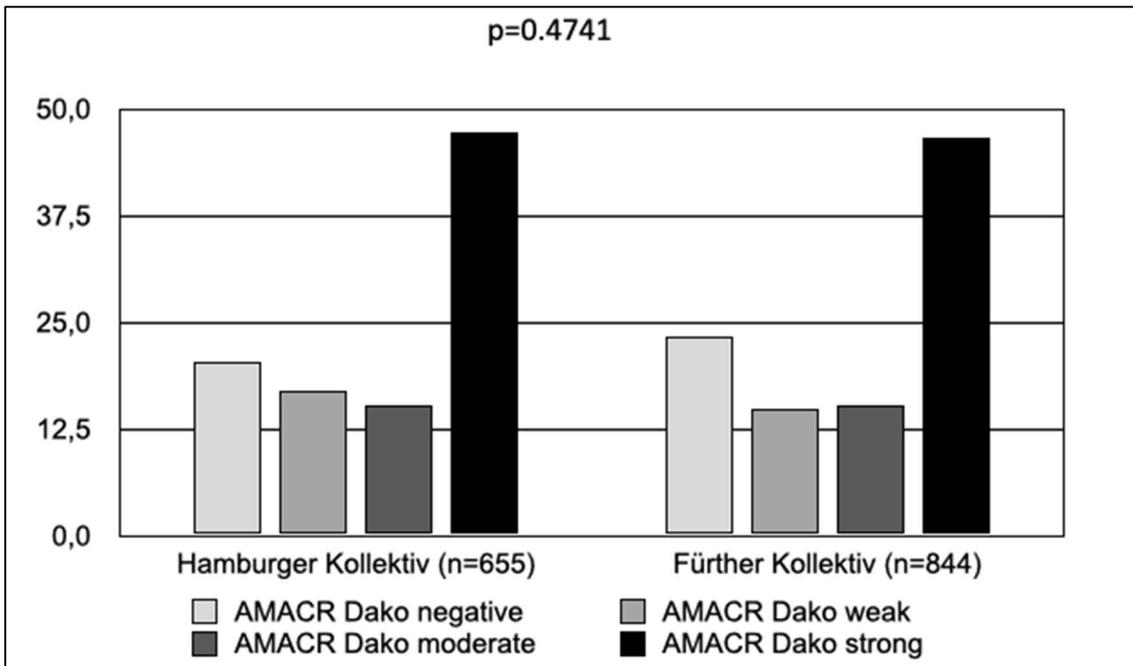


Abb. 17: AMACR Dako 13H4 in beiden Kollektiven.

Dementsprechend befanden sich zwischen den beiden Antikörpern in den Unterkollektiven aus Fürth (Abb. 18, $p < 0.0001$) und Hamburg (Abb. 19, $p < 0.0001$) auch weitgehend identische Beziehungen zwischen den mit den beiden unterschiedlichen Antikörpern erhobenen Befunden.

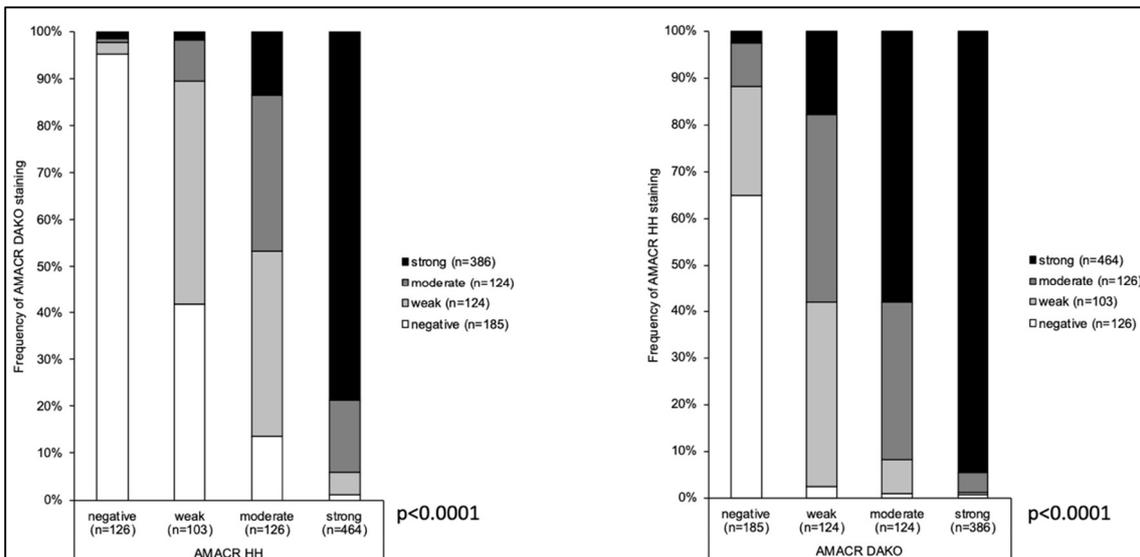


Abb. 18: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 im Fürther Unterkollektiv.

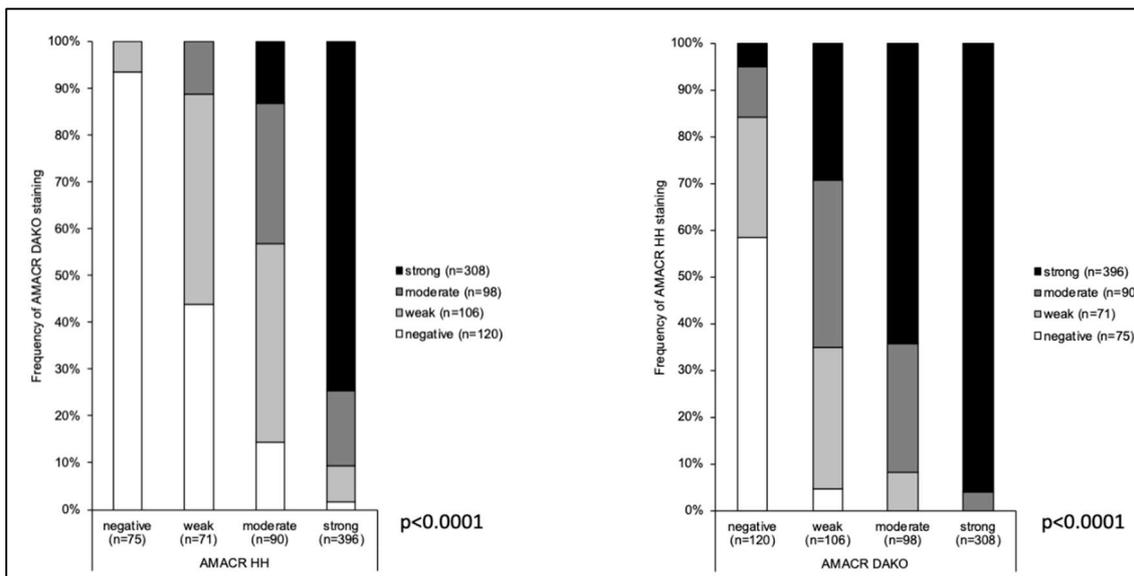


Abb. 19: AMACR HH 8F4 vs. AMACR Dako 13H4 im Hamburger Unterkollektiv.

3.3 Beziehung zu klinischen und molekularen Parametern (Klon HH 8F4)

Der Zusammenhang zwischen dem mit dem UKE Klon 8F4 bestimmten AMACR Status sowie klinischen und molekularen Variablen ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Tab. 12: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter.

		AMACR (HH 8F4)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
	Alle Tumoren	1497	14,8	12,0	14,8	58,4	
pT Status	pT1	60	13,3	11,7	16,7	58,3	0.2383
	pT2	309	13,9	10,4	16,8	58,9	
	pT3	827	13,4	12,5	15,1	59,0	
	pT4	286	20,3	11,9	10,8	57,0	
N-Status	pN-	776	14,7	10,6	13,4	61,3	0.1382
	pN+	691	15,2	13,3	15,6	55,9	
V-Status	V0	1056	14,5	11,5	15,8	58,2	0.0653
	V+	397	16,6	13,6	10,8	58,9	
L-Status	L0	549	12,9	12,0	13,5	61,6	0.1522
	L1	896	16,3	11,7	15,6	56,4	
Tumorseite	links	1077	10,5	11,1	14,9	63,5	<0.0001
	rechts	414	26,1	14,0	14,7	45,2	
MS Status	instabil	83	66,3	10,8	6,0	16,9	<0.0001
	stabil	1042	9,2	11,6	15,2	64,0	

		AMACR (HH 8F4)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
KRAS	Mut. Ex12/13/61	298	13,4	14,1	20,5	52,0	<0.0001
	Wt.	386	13,5	9,6	8,8	68,1	
BRAF	Mut. V600E	13	76,9	15,4	0,0	7,7	<0.0001
	Wt.	79	12,7	8,9	19,0	59,5	
p53	negativ	239	12,6	11,7	19,2	56,5	<0.0001
	schwach	269	25,3	13,4	14,1	47,2	
	moderat	112	14,3	12,5	19,6	53,6	
	stark	631	9,7	10,6	13,5	66,2	
p16	negativ	427	21,1	12,4	11,9	54,6	<0.0001
	schwach	409	7,3	10,3	17,1	65,3	
	moderat	192	12,0	15,6	15,6	56,8	
	stark	111	7,2	9,9	14,4	68,5	
MUC5AC	negativ	1203	10,0	11,9	14,0	64,1	<0.0001
	schwach	83	22,9	15,7	25,3	36,1	
	moderat	53	32,1	18,9	5,7	43,4	
	stark	79	64,6	8,9	17,7	8,9	
E-Cadherin	negativ	7	57,1	0,0	0,0	42,9	0.0036
	schwach	66	24,2	10,6	21,2	43,9	
	moderat	124	21,0	13,7	12,1	53,2	
	stark	1161	12,9	11,9	14,7	60,5	
PD-L1 (Tumor) (10% cutoff)	negativ	1133	11,7	11,7	14,7	62,0	<0.0001
	positiv	46	56,5	17,4	15,2	10,9	

Die Darstellung macht deutlich, dass keine enge Beziehung zwischen klassischen Parametern der Tumoraggressivität wie pT, pN, V-Status und L-Status und der AMACR Expression besteht. Allerdings bestehen hoch signifikante Beziehungen zwischen der AMACR Expression und der Tumorlokalisierung ($p < 0.0001$) und allen acht untersuchten molekularen Parametern. Eine erhöhte AMACR Expression ist positiv assoziiert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer kräftigen immunhistochemischen p53 Positivität ($p < 0.0001$) und einer kräftigen p16 Expression ($p < 0.0001$). Gleichzeitig weisen Tumoren mit kräftiger AMACR Expression seltener eine Mikrosatelliteninstabilität ($p < 0.0001$), RAS Mutationen ($p < 0.0001$), BRAF Mutationen ($p < 0.0001$), eine MUC5AC Expression ($p < 0.0001$), einen E-Cadherin Expressionsverlust ($p = 0.0036$) und eine PD-L1 Expression ($p < 0.0001$) auf.

Wegen der bekannten erheblichen prognostischen Bedeutung der Mikrosatelliteninstabilität beim Kolonkarzinom wurden alle genannten Beziehungen zum histologischen Phänotyp und zu molekularen Parametern

auch separat in den Untergruppen von mikrosatellitenstabilen und -instabilen Tumoren evaluiert.

Die Beziehung zwischen der AMACR Expression, mikrosatellitenstabilen Tumoren und den untersuchten Parametern ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSS-Tumoren

		AMACR (HH 8F4)					p-Wert
		n	negativ	schwach	moderat	stark	
	Alle MSS Tumoren	1042	9,2	11,6	15,2	64,0	
pT Status	pT1	41	7,3	4,9	14,6	73,2	0.0474
	pT2	222	6,3	8,6	18,5	66,7	
	pT3	575	8,9	12,3	15,5	63,3	
	pT4	193	13,5	13,5	9,8	63,2	
N-Status	pN-	534	7,9	9,7	13,5	68,9	0.0186
	pN+	488	10,7	13,5	16,2	59,6	
V-Status	V0	726	8,3	10,3	17,4	64,0	0.0006
	V+	285	11,9	15,4	9,1	63,5	
L-Status	L0	409	5,9	12,2	13,9	68,0	0.0065
	L1	593	11,6	10,8	16,4	61,2	
Tumorseite	links	792	8,2	10,5	14,6	66,7	0.0105
	rechts	245	12,7	15,1	16,7	55,5	
KRAS	Mut. Ex12/13/61	243	9,5	14,4	20,6	55,6	<0.0001
	Wt.	309	7,1	10,4	8,1	74,4	
BRAF	Mut. V600E	5	40,0	40,0	0,0	20,0	0.0134
	Wt.	65	4,6	9,2	18,5	67,7	
p53	negativ	188	7,4	13,3	17,6	61,7	0.0686
	schwach	176	12,5	12,5	16,5	58,5	
	moderat	79	6,3	12,7	24,1	57,0	
	stark	520	8,3	9,8	12,7	69,2	
p16	negativ	314	13,1	13,1	12,4	61,5	0.0008
	schwach	357	4,2	9,0	18,8	68,1	
	moderat	167	8,4	16,2	14,4	61,1	
	stark	94	7,4	9,6	13,8	69,1	
MUC5AC	negativ	882	7,4	11,1	14,1	67,5	<0.0001
	schwach	57	14,0	19,3	26,3	40,4	
	moderat	24	8,3	12,5	12,5	66,7	
	stark	32	43,8	12,5	25,0	18,8	

		AMACR (HH 8F4)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
E- Cadherin	negativ	3	0,0	0,0	0,0	100,0	0.1289
	schwach	40	17,5	15,0	22,5	45,0	
	moderat	75	9,3	14,7	10,7	65,3	
	stark	846	8,5	11,3	15,4	64,8	
PD-L1 (Tumor) (10% cutoff)	negativ	840	7,4	11,1	15,0	66,5	<0.0001
	positiv	20	30,0	30,0	25,0	15,0	

In dem Unterkollektiv der mikrosatellitenstabilen Tumoren besteht eine signifikante Assoziation zwischen einer vermehrten AMACR Expression und linksseitiger Tumorlokalisation sowie einer verminderten Häufigkeit von RAS Mutationen, BRAF Mutationen, einer MUC5AC Überexpression und einer nachweisbaren PD-L1 Expression. Die AMACR Positivität ist aber auch in diesem Unterkollektiv mit einer p16 Expression und tendenziell auch mit einer höheren Häufigkeit einer nuklearen p53 Akkumulation (p=0.0686) assoziiert. Die Beziehung zwischen der AMACR Expression und den untersuchten klinischen und molekularen Parametern ist für die Gruppe der mikrosatelliteninstabilen Tumoren in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: AMACR (Klon HH 8F4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSI-Tumoren.

		AMACR (HH 8F4)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
	Alle MSI Tumoren	83	66,3	10,8	6,0	16,9	
pT Status	pT1	6	66,7	16,7	0,0	16,7	0.7811
	pT2	19	84,2	5,3	5,3	5,3	
	pT3	41	61,0	12,2	7,3	19,5	
	pT4	17	58,8	11,8	5,9	23,5	
N-Status	pN-	55	69,1	9,1	5,5	16,4	0.9237
	pN+	26	61,5	11,5	7,7	19,2	
V-Status	V0	67	68,7	9,0	6,0	16,4	0.633
	V+	15	53,3	20,0	6,7	20,0	
L-Status	L0	38	76,3	7,9	5,3	10,5	0.30001
	L1	43	58,1	14,0	4,7	23,3	
Tumorseite	links	35	42,9	14,3	8,6	34,3	0.0004
	rechts	48	83,3	8,3	4,2	4,2	

		AMACR (HH 8F4)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
KRAS	Mut. Ex12/13/61	9	77,8	0,0	0,0	22,2	0.6272
	Wt.	18	72,2	5,6	5,6	16,7	
BRAF	Mut. V600E	5	100,0	0,0	0,0	0,0	0.2475
	Wt.	6	66,7	0,0	16,7	16,7	
p53	negativ	12	41,7	0,0	25,0	33,3	0.0321
	schwach	42	71,4	16,7	0,0	11,9	
	moderat	12	66,7	8,3	8,3	16,7	
	stark	11	63,6	9,1	0,0	27,3	
p16	negativ	44	70,5	11,4	6,8	11,4	0.2314
	schwach	19	57,9	21,1	0,0	21,1	
	moderat	7	57,1	0,0	14,3	28,6	
	stark	3	33,3	0,0	0,0	66,7	
MUC5AC	negativ	44	45,5	18,2	6,8	29,5	0.0008
	schwach	6	83,3	0,0	16,7	0,0	
	moderat	8	100,0	0,0	0,0	0,0	
	stark	20	90,0	5,0	5,0	0,0	
E-Cadherin	negativ	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0.8144
	schwach	7	71,4	0,0	0,0	28,6	
	moderat	5	60,0	20,0	0,0	20,0	
	stark	61	62,3	13,1	8,2	16,4	
PD-L1 (Tumor) (10% cutoff)	negativ	53	56,6	11,3	7,5	24,5	0.0328
	positiv	12	91,7	8,3	0,0	0,0	

Die Ergebnisse sind den Daten aus dem Gesamtkollektiv sehr ähnlich. Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der AMACR Expression und klinischen Malignitätsparametern wie pT, pN, V-Status und L-Status. Eine eindeutige statistische Beziehung findet sich in diesem Kollektiv für die inverse Beziehung zwischen MUC5AC und AMACR Expression ($p=0.0008$). Darüber hinaus erreichen die Beziehungen zwischen starker AMACR Expression, nukleärer p53 Akkumulation ($p=0.0321$) und dem fehlenden Nachweis einer tumoralen PD-L1 Expression ($p=0.0328$) statistische Signifikanz.

Wegen der signifikanten Beziehung zwischen AMACR Expression, Mikrosatelliteninstabilität und der Tumorlokalisierung wurden separate Untersuchungen der Beziehung zwischen AMACR Expression und Mikrosatelliteninstabilität in Tumorkollektiven von identischer Lokalisation im Kolon durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: AMACR (Klon HH 8F4) vs. MSI in unterschiedlichen Tumorlokalisationen.

AMACR HH 8F4		MSI			p-Wert
		n	instabil	stabil	
Zökum	negativ	22	68,2	31,8	<0.0001
	schwach	13	7,7	92,3	
	moderat	19	5,3	94,7	
	stark	47	2,1	97,9	
C. ascendens	negativ	41	51,2	48,8	<0.0001
	schwach	15	20,0	80,0	
	moderat	17	5,9	94,1	
	stark	57	1,8	98,2	
C. transversum	negativ	8	50,0	50,0	0.0004
	schwach	13	0,0	100,0	
	moderat	7	0,0	100,0	
	stark	32	0,0	100,0	
C. descendens	negativ	8	50,0	50,0	0.0135
	schwach	6	33,3	66,7	
	moderat	13	15,4	84,6	
	stark	40	5,0	95,0	
Sigma	negativ	39	15,4	84,6	0.0042
	schwach	48	4,2	95,8	
	moderat	60	0,0	100,0	
	stark	306	3,3	96,7	
Rektum	negativ	33	15,2	84,8	0.0002
	schwach	34	2,9	97,1	
	moderat	46	2,2	97,8	
	stark	190	0,0	100,0	

Die Beziehung zwischen AMACR Expression, Mikrosatelliteninstabilität in links- und rechtsseitig gelegenen Tumoren ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: AMACR (Klon HH 8F4) vs. MSI in links- und rechtsseitigen Kolonkarzinomen.

AMACR HH 8F4		MSI			
		n	instabil	stabil	p-Wert
Links	negativ	80	18,8	81,3	<0.0001
	schwach	88	5,7	94,3	
	moderat	119	2,5	97,5	
	stark	540	2,2	97,8	
Rechts	negativ	71	56,3	43,7	<0.0001
	schwach	41	9,8	90,2	
	moderat	43	4,7	95,3	
	stark	138	1,4	98,6	

Die Ergebnisse zeigen sowohl für links- und rechtsseitige Kolonkarzinome als auch für die Untergruppen der Tumoren im Zökum, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma und Rektum jeweils statistisch signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität zwischen Tumoren mit unterschiedlicher AMACR Expression. Für alle Gruppen fanden sich bei Karzinomen mit starker oder zumindest mäßiggradiger AMACR Expression nur selten eine Mikrosatelliteninstabilität. Eine Mikrosatelliteninstabilität fand sich aber im rechtsseitigen Kolon bei 56% von komplett AMACR negativen Karzinomen und bei 18,8% von 80 linksseitigen AMACR negativen Karzinomen.

Die Beziehung zwischen der AMACR Expression und der Zahl der in den untersuchten Tumoren nachweisbaren CD8 positiven Zellen pro Quadratmillimeter (CD8 Dichte) ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: AMACR (Klon HH 8F4) vs. CD8 Dichte in mikrosatellitenstabilen und -instabilen Tumoren.

	AMACR HH 8F4	n	CD8 Dichte (Zellen/mm ²)	p-Wert
Alle Tumoren	negativ	211	399,3±31,8	<0.0001
	schwach	172	286,1±35,2	
	moderat	208	319,2±32	
	stark	840	207,3±15,9	
MS-stabile Tumoren	negativ	91	386±47,7	0.0029
	schwach	117	291±42	
	moderat	149	323,5±37,2	
	stark	650	225,6±17,8	
MS-instabile Tumoren	negativ	53	580,2±75,5	0.2406
	schwach	9	249,5±183,2	
	moderat	5	501,3±245,8	
	stark	13	326,7±152,4	

Dabei zeigt sich, dass die Zahl der CD8 positiven Zellen bei komplett AMACR negativen Tumoren am höchsten ist (399.3±31.8) und bei Tumoren mit starker AMACR Expression am geringsten (207.3±15.9, p<0.0001). Die angesichts der bekannten starken Beziehung zwischen Mikrosatelliteninstabilität und Zahl der intratumoralen Lymphozyten durchgeführte separate Untersuchung von mikrosatellitenstabilen und -instabilen Karzinomen ergab für die Untergruppe der MSS-Tumoren die gleiche Beziehung wie im Gesamtkollektiv. Tumoren mit AMACR Negativität zeigten die höchste Zahl intratumoraler Lymphozyten (386.0±47.7) und Tumoren mit starker AMACR Expression die geringste (225.6±17.8, p=0.0029). Auch bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren war die durchschnittliche Zahl von intratumoralen CD8 positiven Lymphozyten in der Gruppe der AMACR negativen Tumoren mit (580.2±75.5) deutlich höher als beispielsweise in Tumoren mit starker AMACR Positivität (326.57±152.4), doch erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz (p=0.2406).

3.4 Beziehung zu klinischen und molekularen Parametern (Klon Dako 13H4)

Die Beziehung zwischen der AMACR Expression und histopathologischen bzw. molekularen Parametern ist für den Klon Dako 13H4 in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter.

		AMACR (Dako)					p-Wert
		n	negativ	schwach	moderat	stark	
	Alle Tumoren	1492	22,1	15,8	15,3	46,8	
pT Status	pT1	60	21,7	20,0	18,3	40,0	0.0732
	pT2	308	18,2	15,9	16,9	49,0	
	pT3	817	20,7	15,8	15,8	47,7	
	pT4	292	29,5	14,0	11,6	44,9	
N-Status	pN-	767	20,2	13,7	15,6	50,5	0.034
	pN+	693	23,4	17,6	15,2	43,9	
V-Status	V0	1055	21,4	15,3	15,5	47,8	0.4841
	V+	394	24,1	17,0	14,0	44,9	
L-Status	L0	546	19,4	14,3	14,7	51,6	0.0657
	L1	894	23,5	16,3	15,5	44,6	
Tumorseite	links	1080	17,5	16,8	15,7	50,0	<0.0001
	rechts	406	34,0	13,1	14,0	38,9	
MS-Status	instabil	78	67,9	11,5	11,5	9,0	<0.0001
	stabil	1046	15,9	16,0	16,1	52,1	
KRAS	Mut. Ex12/13/61	301	22,9	20,6	18,6	37,9	0.0002
	Wt.	389	19,0	14,1	12,6	54,2	
BRAF	Mut. V600E	15	86,7	13,3	0,0	0,0	<0.0001
	Wt.	79	16,5	21,5	8,9	53,2	
p53	negativ	242	21,5	19,4	14,5	44,6	<0.0001
	schwach	275	31,3	15,3	14,2	39,3	
	moderat	109	22,9	15,6	18,3	43,1	
	stark	626	15,0	14,5	16,0	54,5	
p16	negativ	424	28,3	16,0	12,0	43,6	<0.0001
	schwach	411	13,9	15,1	17,8	53,3	
	moderat	195	19,0	19,0	16,4	45,6	
	stark	109	10,1	13,8	15,6	60,6	
MUC5AC	negativ	1194	16,8	16,2	15,3	51,7	<0.0001
	schwach	84	40,5	14,3	17,9	27,4	
	moderat	51	37,3	11,8	15,7	35,3	
	stark	76	68,4	14,5	10,5	6,6	
E-Cadherin	negativ	8	62,5	0,0	12,5	25,0	0.0036
	schwach	66	34,8	13,6	12,1	39,4	
	moderat	125	34,4	10,4	16,8	38,4	
	stark	1158	19,2	16,9	14,9	49,1	

		AMACR (Dako)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
PD-L1 (Tumor) (10% cutoff)	negativ	1136	19,7	16,1	14,9	49,3	<0.0001
	positiv	46	63,0	17,4	10,9	8,7	

Dabei sind die Ergebnisse weitestgehend analog mit den erzielten Resultaten des Klons HH 8F4. Einziger Unterschied ist, dass die Untersuchung von 767 nodal-negativen und 693 nodal-positiven Kolonkarzinomen einen marginalen Unterschied in der AMACR Expression ergibt, mit etwas häufigerer starker Positivität in der Gruppe der nodal-negativen Karzinome ($p=0.034$). Im Übrigen besteht auch für den Dako Klon kein überzeugender Zusammenhang zwischen histopathologischen Malignitätsparametern und dem AMACR Expressionsniveau. Hingegen findet sich auch hier eine deutliche Beziehung zwischen einer hochgradigen AMACR Expression und einer Tumorlokalisierung im linksseitigen Kolon ($p<0.0001$), dem gehäuftem Vorkommen einer nukleären p53 Proteinakkumulation und einer höheren Häufigkeit von p16 Positivität (je $p<0.0001$). Im Gegensatz dazu ist die Mikrosatelliteninstabilität ($p<0.0001$), RAS Mutationen ($p=0.0002$), BRAF V600E Mutationen ($p<0.0001$), eine MUC5AC Expression ($p<0.0001$), ein E-Cadherin Verlust ($p=0.0036$) und das Vorliegen einer PD-L1 Expression in Tumorzellen von Tumoren mit kräftiger AMACR Expression weniger häufig als beispielsweise in AMACR negativen Kolonkarzinomen.

Die Ergebnisse der separaten Untersuchungen dieser Beziehung in mikrosatellitenstabilen (Tab. 19) und mikrosatelliteninstabilen Tumoren (Tab. 20) ergaben für die Gruppe der mikrosatellitenstabilen Tumoren ein ähnliches Bild wie bei der Untersuchung mit dem Klon HH 8F4.

Tab. 19: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSS-Tumoren.

		AMACR (Dako)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
	Alle MSS Tumoren	1046	15,9	16,0	16,1	52,1	
pT Status	pT1	41	12,2	22,0	17,1	48,8	0.0746
	pT2	223	11,2	14,3	18,4	56,1	
	pT3	572	14,7	16,8	15,9	52,6	
	pT4	199	23,6	14,1	13,1	49,2	
N-Status	pN-	531	12,1	13,7	16,0	58,2	0.0004
	pN+	494	19,2	18,0	16,2	46,6	

		AMACR (Dako)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
V-Status	V0	728	14,0	15,8	16,1	54,1	0.0555
	V+	287	20,6	17,1	15,3	47,0	
L-Status	L0	409	12,2	15,9	14,2	57,7	0.0249
	L1	597	17,9	15,9	16,8	49,4	
Tumorseite	links	795	13,7	16,4	16,4	53,6	0.0129
	rechts	246	22,8	14,6	14,6	48,0	
KRAS	Mut. Ex12/13/61	245	18,8	19,2	21,6	40,4	<0.0001
	Wt.	313	12,5	15,0	12,8	59,7	
BRAF	Mut. V600E	6	66,7	33,3	0,0	0,0	0.0014
	Wt.	66	9,1	22,7	7,6	60,6	
p53	negative	191	18,3	18,8	13,6	49,2	0.1945
	weak	181	19,9	14,4	17,1	48,6	
	moderate	80	13,8	17,5	17,5	51,3	
	strong	517	12,0	15,3	16,1	56,7	
p16	negative	315	19,7	17,5	11,7	51,1	0.0226
	weak	358	11,2	15,4	18,7	54,7	
	moderate	171	15,2	17,5	16,4	50,9	
	strong	92	8,7	13,0	16,3	62,0	
MUC5AC	negative	880	13,1	16,4	15,2	55,3	<0.0001
	weak	58	32,8	17,2	20,7	29,3	
	moderate	25	20,0	8,0	28,0	44,0	
	strong	31	48,4	22,6	16,1	12,9	
E-Cadherin	negative	3	0,0	0,0	33,3	66,7	0.1289
	weak	41	26,8	17,1	14,6	41,5	
	moderate	77	24,7	10,4	18,2	46,8	
	strong	847	14,4	17,1	15,0	53,5	
PD-L1 (Tumor) (10% cutoff)	negative	841	14,1	16,3	15,5	54,1	<0.0001
	positive	21	52,4	23,8	14,3	9,5	

Tab. 20: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. histopathologische und molekulare Parameter in MSI-Tumoren.

		AMACR (Dako)					p-Wert
		n	negativ	schwach	moderat	stark	
	Alle MSI Tumoren	78	67,9	11,5	11,5	9,0	
pT Status	pT1	5	80,0	20,0	0,0	0,0	0.0854
	pT2	19	78,9	5,3	5,3	10,5	
	pT3	38	65,8	7,9	21,1	5,3	
	pT4	16	56,3	25,0	0,0	18,8	
N-Status	pN-	51	68,6	11,8	13,7	5,9	0.5164
	pN+	25	64,0	12,0	8,0	16,0	
V-Status	V0	62	71,0	9,7	12,9	6,5	0.2622
	V+	15	53,3	20,0	6,7	20,0	
L-Status	L0	35	77,1	5,7	11,4	5,7	0.3712
	L1	41	61,0	14,6	12,2	12,2	
Tu. Seite	links	32	43,8	15,6	25,0	15,6	0.0006
	rechts	46	84,8	8,7	2,2	4,3	
KRAS	Mut. Ex12/13/61	6	66,7	16,7	0,0	16,7	0.5739
	Wt.	19	84,2	5,3	5,3	5,3	
BRAF	Mut. V600E	6	100,0	0,0	0,0	0,0	0.1926
	Wt.	5	80,0	20,0	0,0	0,0	
p53	negativ	10	40,0	20,0	20,0	20,0	0.2044
	schwach	40	72,5	12,5	5,0	10,0	
	moderat	10	80,0	0,0	20,0	0,0	
	stark	11	54,5	9,1	27,3	9,1	
p16	negativ	41	78,0	9,8	7,3	4,9	0.1498
	schwach	18	44,4	16,7	16,7	22,2	
	moderat	6	50,0	16,7	33,3	0,0	
	stark	3	33,3	0,0	33,3	33,3	
MUC5AC	negativ	42	50,0	16,7	19,0	14,3	0.0367
	schwach	6	83,3	16,7	0,0	0,0	
	moderat	7	85,7	0,0	0,0	14,3	
	stark	18	88,9	5,6	5,6	0,0	
E- Cadherin	negativ	1	100,0	0,0	0,0	0,0	0.7147
	schwach	8	75,0	0,0	12,5	12,5	
	moderat	6	50,0	16,7	33,3	0,0	
	stark	57	64,9	14,0	10,5	10,5	

		AMACR (Dako)					
		n	negativ	schwach	moderat	stark	p-Wert
PD-L1 (Tumor)	negativ	52	63,5	11,5	13,5	11,5	0.3584
	(10% cutoff) positiv	11	81,8	9,1	0,0	9,1	

In der großen Gruppe der mikrosatellitenstabilen Tumoren ergaben sich keine eindeutigen Hinweise auf einen Bezug der AMACR Expression zu histopathologischen Malignitätsparametern. Es bestanden jedoch signifikante Zusammenhänge mit der Häufigkeit von KRAS Mutationen, BRAF Mutationen, der MUC5AC Expression, dem Nachweis von PD-L1 in Tumorzellen und auch mit einer vermehrten p16 Expression ($p=0.0226$).

In der Gruppe der mikrosatelliteninstabilen Tumoren waren lediglich die Beziehungen zwischen einer erhöhten AMACR Expression, linksseitiger Tumorlokalisation ($p=0.0006$) und einer geringgradigen MUC5AC Expression ($p=0.0367$) statistisch signifikant.

Die Beziehung der Zusammenhänge zwischen AMACR Expression und Mikrosatelliteninstabilität ist für die einzelnen Darmabschnitte in Tabelle 21 und für die Tumorseite in Tabelle 22 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass auch für den DAKO Antikörper in jeder einzelnen Tumorlokalisation (links, rechts, Zökum, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigma, Rektum) ein signifikanter Zusammenhang zwischen AMACR Negativität und einem gehäuften Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität bestand.

Tab. 21: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. MSI in unterschiedlichen Tumorlokalisationen.

AMACR Dako		MSI			p-Wert
		n	instabil	stabil	
Zökum	negativ	35	48,6	51,4	<0.0001
	schwach	11	9,1	90,9	
	moderat	12	8,3	91,7	
	stark	45	2,2	97,8	
C. ascendens	negativ	44	40,9	59,1	<0.0001
	schwach	17	17,6	82,4	
	moderat	15	0,0	100,0	
	stark	47	2,1	97,9	
C. transversum	negativ	16	25,0	75,0	0.0076
	schwach	12	0,0	100,0	
	moderat	10	0,0	100,0	
	stark	26	0,0	100,0	

		AMACR Dako	MSI		
			n	instabil	stabil
C. descendens	negativ	10	50,0	50,0	0.0074
	schwach	11	9,1	90,9	
	moderat	12	16,7	83,3	
	stark	32	3,1	96,9	
Sigma	negativ	68	5,9	94,1	0.0452
	schwach	74	2,7	97,3	
	moderat	70	8,6	91,4	
	stark	244	1,6	98,4	
Rektum	negativ	45	11,1	88,9	0.0004
	schwach	50	4,0	96,0	
	moderat	54	0,0	100,0	
	stark	153	0,0	100,0	

Tab. 22: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. MSI in links- und rechtseitigen Kolonkarzinomen.

		AMACR Dako	MSI		
			n	instabil	stabil
Links	negativ	123	11,4	88,6	<0.0001
	schwach	135	3,7	96,3	
	moderat	138	5,8	94,2	
	stark	431	1,2	98,8	
Rechts	negativ	95	41,1	58,9	<0.0001
	schwach	40	10,0	90,0	
	moderat	37	2,7	97,3	
	stark	120	1,7	98,3	

Die Beziehung zwischen AMACR Expression, MS-Status und der Zahl der intratumoralen CD8 positiven Zellen ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tab. 23: AMACR (Klon Dako 13H4) vs. CD8 Dichte in mikrosatellitenstabilen und -instabilen Tumoren.

	AMACR Dako	n	CD8 Dichte (Dichte/mm ²)	p-Wert
Alle Tumoren	negativ	315	337,4±26	<0.0001
	schwach	221	293,3±31,1	
	moderat	220	299,1±31,2	
	stark	668	201,1±17,9	
MS-stabile Tumoren	negativ	160	325,2±35,6	0.0209
	schwach	160	295,7±35,6	
	moderat	161	295,1±35,5	
	stark	529	218,6±19,6	
MS-instabile Tumoren	negativ	51	542,2±80	0.4973
	schwach	9	335,2±190,5	
	moderat	9	283,3±190,5	
	stark	6	385,6±233,3	

AMACR negative Tumoren zeigen die höchste Dichte CD8 positiver Zellen (337.4±26.0) und Tumoren mit starker AMACR Expression die geringste (201.1±17.9, p<0.0001).

Das gleiche Bild findet sich in der größeren Subgruppe der mikrosatellitenstabilen Tumoren. Die Zahl der CD8 positiven Lymphozyten pro Quadratmillimeter ist in AMACR negativen Tumoren am höchsten (325.2±35.6) und bei stark AMACR positiven Tumoren am geringsten (218.6±19.6, p=0.0209). Bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren ergibt sich wiederum kein signifikanter Unterschied in der Lymphozytendichte bei Tumoren unterschiedlicher AMACR Expression. Allerdings ist die durchschnittliche Zahl CD8 positiver Lymphozyten mit (542.2±80.0) in AMACR negativen Tumoren deutlich größer als in Tumoren mit starker (385.6±233.3) oder mäßiggradiger AMACR Expression (283.3±190.5, p=0.4973).

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden 1802 kolorektale Karzinome erfolgreich auf die Expression von AMACR untersucht. Damit handelt es sich um die bisher größte zur Expression dieses Gens beim Kolonkarzinom durchgeführten Studie und die Ergebnisse sind sowohl aus biologischer wie auch aus methodischer Sicht relevant.

Eine AMACR Positivität wurde in unserer Studie in ca. 85% der Fälle gefunden, wobei für den Klon HH 8F4 58.4% der Tumoren stark positiv, 14.8% mäßig positiv, 12.0% geringgradig positiv und 14.8% komplett negativ waren. Die meisten früheren Studien hatten keine ähnlich detaillierte Aufschlüsselung ihrer

Befunde in vier Kategorien vorgenommen, sondern lediglich positive und negative Tumoren unterschieden.

Tab 24 zeigt die für die Unterscheidung von AMACR positiven und negativen Tumoren genutzten Kriterien, welche von >5% bis ≥70% reichten und es erstaunt somit nicht, dass die Zahl der AMACR positiven Tumoren in den verschiedenen Studien zwischen 7% und 92% variierte.

Tab. 24: Kriterien für die Unterscheidung von AMACR positiven und negativen Tumoren in den neun immunhistochemischen Studien.

Autor	Kriterien für positiv
Shukla et al. 2017	Finales Färbeergebnis ≥ 1 (6-20%)
Jiang et al. 2003a	Braunes granuläres zytoplasmatisches Muster; Fälle mit >5% Färbung der Tumorzellen
Lin et al. 2007	Diffuse oder apikale zytoplasmatische Färbung
Marx et al. 2008	Tumoren, die wenigstens eine schwache AMACR Färbung zeigen
Shi et al. 2007	Fälle mit >5% positiver Färbung der Tumorzellen
Zhou et al. 2002	Moderate (diffuse granuläre zytoplasmatische) und starke (diffuse intensive zytoplasmatische) Färbe- ergebnisse
Chen et al. 2005	Zytoplasmatische Färbung, Immunreaktivität in >5% der Tumorzellen
Went et al. 2006	Schwach: 1+ Färbung in <60% der Zellen oder 2+ Färbung in <30% der Zellen, moderat: 1+ Färbung in ≥ 60% der Zellen, 2+ Färbung in 30-70% oder 3+ Färbung in <30% der Zellen, stark: 2+ Färbung in ≥70% oder 3+ Färbung in ≥30% der Zellen
Emam et al. 2016	Immunfärbung in ≥ 10% der Zellen

Die Aufschlüsselung in vier distinkte Untergruppen hat den Vorteil, dass zwei Gruppen identifiziert werden, welche auch für ungeübte Immunhistochemie-Betrachter einfach zu unterscheiden sind: die komplett negativen und die stark

positiven. Die Untergruppen der gering und mäßig stark positiven sind schwieriger abzugrenzen und unterliegen mit Sicherheit auch subjektiven Einflüssen. Zahlreiche frühere TMA-Studien am Institut für Pathologie des UKE haben gezeigt, dass im Falle echter klinischer oder biologischer Unterschiede zwischen Tumoren mit unterschiedlicher Expression eines am TMA untersuchten Markers, diese beim Vergleich komplett negativer und stark positiver Tumoren am deutlichsten und sichersten zu Tage treten.

Die intermediären Gruppen unterscheiden sich häufig nicht stark. Dass sich trotz der großen Zahl erfolgreich untersuchter Tumoren keine signifikante Beziehung zwischen der AMACR Expression und einem der untersuchten histopathologischen Parameter für aggressives Tumorverhalten (pT, pN, V-Status, L-Status) fand, passt zu den Ergebnissen mehrerer früherer Studien, welche auch keine signifikanten Assoziationen zum histologischen Tumor Phänotyp fanden und insbesondere auch keine Beziehung zum klinischen Verlauf.

Von neun Studien, die die AMACR Expression beim kolorektalen Karzinom immunhistochemisch untersucht hatten (siehe *Tab. 1 bis 9: Immunhistochemische Studien zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom*), konnten alleinig drei Untersuchungen Angaben zu klinischen Verlaufsdaten, insbesondere dem Patientenüberleben berichten. Zwei dieser Studien konnten keine Relation zwischen AMACR Expression und Patientenüberleben bzw. dem krankheitsfreien Überleben finden (Shi et al. 2007, Emam et al. 2016), wohingegen eine Studie eine signifikante Beziehung zwischen erhöhter AMACR Expression und besserer 5-Jahres-Prognose, bezogen auf das krankheitsspezifische Überleben, beschreibt (Lin et al. 2007). Andere Studien konnten lediglich einen Zusammenhang zwischen verminderter AMACR Färbung, schlechterem histologischen Differenzierungsgrad und dem Auftreten von Metastasen dokumentieren. Insgesamt sprechen die verfügbaren Daten somit stark gegen eine klinisch bedeutsame Prognoserelevanz der AMACR Expression beim Kolonkarzinom.

Auch bei anderen Tumorarten haben Studien zur prognostischen Bedeutsamkeit der AMACR Expression zu unterschiedlichen Resultaten geführt. Beim Prostatakarzinom haben mindestens vier Studien eine signifikante Beziehung zwischen geringer AMACR Expression und ungünstiger Prognose gezeigt (Kuefer et al. 2002, Rubin et al. 2005, Rubin et al. 2004, Rubin et al. 2002), wobei mindestens zwei Studien eine derartige Beziehung nicht finden konnten, bzw. eine höhere AMACR Expression einhergehend mit einer schlechten Prognose beschreiben (Box et al. 2016, Takahara et al. 2009)

Beim oralen Plattenepithelkarzinom hat eine Studie einen Zusammenhang zwischen erhöhter AMACR Expression und ungünstiger Prognose beschrieben (He et al. 2018), während andere Untersucher keine starke AMACR Expression in dieser Tumorentität finden konnten (Went et al. 2006). Ferner konnte beim hepatozellulären Karzinom eine Beziehung zwischen erhöhter AMACR Expression und schlechter Prognose gezeigt werden (Li et al. 2008), wobei

andere Studien dies nicht bestätigen konnten (Xu et al., 2014). Li Ching Wu et al. konnten eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten AMACR Expression und ungünstiger Prognose beim Gallenblasenkarzinom aufzeigen (Wu et al. 2012), während andere Publikationen nur selten eine nachweisbare AMACR Expression bei dieser Art der Neoplasie feststellen konnten (Went et al. 2006).

Der Vergleich der AMACR Expression mit der Tumorlokalisation im Colon ergab eine kontinuierliche Zunahme der AMACR Expression von proximal nach distal. In einer ehemaligen, ebenfalls am UKE, aber an einem komplett anderen Tumorkollektiv durchgeführten Studie, war ein solches Ergebnis bereits früher gefunden worden.

Damals wurde spekuliert, dass die Zunahme im distalen Colon mit der bekannten Rolle von AMACR als Schlüsselenzym des Fettmetabolismus im Zusammenhang stehen konnte. Angesichts der zunehmenden Konzentrierung des Darminhaltes während der Darmpassage könnte angenommen werden, dass im distalen Colon mehr Fettsäurederivate zu verstoffwechseln sind als im proximalen Colon. Angesichts der hoch signifikanten Beziehung zwischen einer erhöhten AMACR Expression und einer distalen Tumorlokalisation ist eine deutliche Anhäufung von mikrosatelliteninstabilen Tumoren in der Gruppe der AMACR negativen Karzinome zu erwarten, denn schließlich tritt die Mikrosatelliteninstabilität insbesondere bei Karzinomen des proximalen, rechtsseitigen Colons auf.

Die große Zahl, der in dieser Studie untersuchten Tumoren erlaubte es, die Beziehung zwischen AMACR, Tumorlokalisation und Mikrosatelliteninstabilität in zahlreichen verschiedenen Regionen des Colons separat zu untersuchen. Dass in jedem einzelnen der untersuchten Abschnitte ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen Mikrosatelliteninstabilität und dem Fehlen einer AMACR Expression gefunden werden konnte, spricht für eine echte biologische Beziehung zwischen verminderter AMACR Expression und Mikrosatelliteninstabilität, welche nicht durch die Beziehung beider Parameter zur Tumorlokalisation im Colon getriggert ist.

Andere Untersucher hatten bereits von einer Beziehung zwischen Mikrosatelliteninstabilität und niedriger AMACR Expression berichtet (Chen et al. 2005), doch wurde bei diesen Untersuchungen die Tumorlokalisation nicht mit einbezogen und es wurden auch keine biologischen Mechanismen, welche diesem Zusammenhang zugrunde liegen, beschrieben. Ein möglicher Erklärungsansatz läge in der besonders häufigen mutationsbedingten Inaktivierung von AMACR oder AMACR induzierenden Genen durch betroffene Mikrosatelliten in der Promotorregion oder anderer regulierender Sequenzen dieser Gene. Der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität ist aktuell der wahrscheinlich wichtigste molekulare Befund, der in einem Kolonkarzinom erhoben werden kann. Während die meisten Kolonkarzinome nicht von einer immunonkologischen Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren profitieren, wurde für

mikrosatelliteninstabile Tumoren ein sehr gutes Ansprechen auf eine derartige Therapie gezeigt.

Der Grund hierfür liegt in den zahlreichen Mutationen mikrosatelliteninstabiler Tumoren, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von tumoralen Neoantigenen führen, welche es dem Immunsystem besser ermöglicht, die Tumorzellen als immunologisch „fremd“ zu erkennen. Bereits die Tatsache, dass 66.3% aller komplett AMACR negativen Kolonkarzinome mikrosatelliteninstabil sind, (aber nur 16.9% der stark AMACR positiven) lässt daran denken, dass der fehlende AMACR Nachweis ein Surrogat für ein mögliches Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibitoren Therapie sein könnte. Diese Möglichkeit wird durch die zusätzliche und von der Mikrosatelliteninstabilität offensichtlich unabhängigen Beziehung zu zwei anderen bekannten Prädiktoren für ein Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren, die Expression von PD-L1 und die Zahl der intratumoralen CD8 positiven Lymphozyten weiter gesteigert. Komplett AMACR negative Kolonkarzinome zeigten sowohl in allen Tumoren als auch in der Untergruppe der mikrosatellitenstabilen Tumoren deutlich häufiger eine PD-L1 Positivität und deutlich mehr intratumorale CD8 positive Lymphozyten als Tumoren mit nachweisbarer und insbesondere hoher AMACR Expression.

Die pathogenetische Gemeinsamkeit der drei eng mit einer verminderten AMACR Expression einhergehenden Parameter Mikrosatelliteninstabilität, PD-L1 Expression und hohe Dichte CD8 positiver Lymphozyten, ist die in allen Fällen erhöhte Tumorimmunogenität. Die Mikrosatelliteninstabilität erzeugt mit ihrer hohen Mutationsfrequenz eine gesteigerte Immunogenität von Tumorzellen, da aufgrund des Verlusts von DNA-Reparaturmechanismen somatische Mutationen innerhalb der DNA akkumulieren, wodurch sie anfälliger für den Angriff durch tumorinfiltrierende Lymphozyten und Makrophagen werden. Eine vermehrte Infiltration durch CD8 positive Lymphozyten ist Folge einer erhöhten Immunogenität von Tumoren (Narayanan et al. 2019) und eine gesteigerte PD-L1 Expression in Tumorzellen ist ein Mechanismus zur Abwehr zytotoxischer T-Lymphozyten durch hoch immunogene Tumorzellen (Rosenbaum et al. 2016).

Die offensichtliche Beziehung zwischen geringer AMACR Expression und hoher Tumorimmunogenität beim Kolonkarzinom könnte durch eine äußerst zufällig häufige Störung der AMACR Expression oder der Expression von AMACR induzierenden Genen bedingt sein. Alternativ wäre es denkbar, dass die von AMACR vermittelten Stoffwechselfunktionen in Zellen mit einer erhöhten Mutationslast aus einem anderen Grund an Bedeutung verlieren.

Dass die Expression von AMACR in Kolonkarzinomen biologische Bedeutung besitzt, wird auch durch weitere signifikante Beziehungen mit anderen molekularen Parametern unterstrichen. Signifikante Beziehungen zu KRAS- und BRAF Mutationen sowie der Expression von p16 und MUC5AC, welche sowohl in allen Tumoren als auch in der Subgruppe der mikrosatellitenstabilen Tumoren zu finden sind, spricht für direkte oder indirekte funktionelle Zusammenhänge zwischen diesen Genen, die nach weiterer Aufklärung verlangen.

Auch aus methodischer Sicht ergibt die vorliegende Arbeit interessante Aspekte. So wurden zur Minimierung methodischer Einflüsse auf die Ergebnisse der Studie zwei voneinander unabhängige Kollektive mit zwei verschiedenen Antikörpern untersucht. Dass beide Parameter keinen relevanten Einfluss auf die Ergebnisse ausübten, spricht für die Robustheit der immunhistochemischen AMACR Untersuchung beim Kolonkarzinom. Für beide Antikörper wurden Protokolle etabliert, mit dem Ziel im normalen Kolonepithel möglichst eine AMACR Negativität zu sehen, bei gleichzeitig möglichst großer Zahl an AMACR positiven Tumoren. Die Umsetzung dieser Vorgabe führte mit zwei verschiedenen, nicht miteinander verwandten Antikörpern, zu einem praktisch identischen Ergebnis. Daraus wäre abzuleiten, dass die Expressionsunterschiede zwischen Tumoren und Normalgewebe so groß sind, dass auch mit weiteren AMACR Antikörpern prinzipiell ein ähnliches Ergebnis erzielt werden könnte. Auch die fehlenden Unterschiede in der Anfärbung von Tumoren aus Fürth und Hamburg war nicht unbedingt zu erwarten. Die Immunreaktivität von Tumoren hängt prinzipiell von der färbeanalytischen Verarbeitung der Gewebeproben ab. Die Formalinfixierung führt zu einer Vernetzung von Proteinstrukturen, durch welche zwar eine Autolyse verhindert, aber die Zugänglichkeit der vernetzten Proteine für Antikörper erschwert.

Zwar kann die formalinbedingte Vernetzung von Proteinen durch spezielle Vorbehandlungen bei großer Hitze zumindest teilweise rückgängig gemacht werden, doch ist der Erhalt der Epitope innerhalb eines Präparates und zwischen verschiedenen Präparaten uneinheitlich.

Wesentliche Parameter für den Einfluss der Formalinfixation sind die Dauer der Formalinfixierung und die Menge des zur Fixation verwendeten Formalins. Die Formalinmenge sollte im Idealfall zehnfach größer sein als die zu fixierende Gewebemenge, da sonst die Formalinkonzentration durch die im Präparat (einschließlich Kot) vorhandenen Flüssigkeiten verdünnt und in ihrer Funktion eingeschränkt wird.

Die Dauer der Fixation entscheidet darüber, ob auch tief im Präparat liegende Gewebeabschnitte vom Formalin erreicht werden und ausgiebig lange fixiert werden. Gerade bei Großpräparaten wie Kolonresektaten oder Kolonteilresektaten ist es aus praktischen Gründen schwierig, die zehnfache Menge Formalin beizufügen und die Fixationsdauer wird durch den begrifflichen Wunsch der einsendenden Kliniker nach einer möglichst schnellen Diagnoseübermittlung limitiert. Es wäre nicht überraschend, wenn zwei Pathologieinstitute und die assoziierten Kliniker sich in ihrer Fixationsstrategie und der zeitlichen Abläufe der Untersuchungen systematisch unterscheiden würden. Das dies für Pathologieinstitute des UKE und des Klinikums Fürth offenbar nicht zutrifft, spricht dafür, dass Präparate dieser Institutionen sich gut für gemeinsame Studien zusammenführen lassen.

Bisherige Studien zur AMACR Expression beim Kolonkarzinom hatten zwischen 15 und 1315 kolorektale Karzinome untersucht. Unsere Studie mit 1802 erfolgreich untersuchten Karzinomen stellt somit die mit Abstand größte Studie dar. Dass in unserer Untersuchung gleich zwei Antikörper zum Einsatz kamen,

sodass letztlich 3604 erfolgreiche AMACR Untersuchungen erfolgten, wurde durch die Tissue Microarray-Methode ermöglicht. Die 3604 Untersuchungen erforderten in diesem Format lediglich die Färbung von acht Gewebeschnitten, welche innerhalb von einer Stunde hergestellt, innerhalb eines Tages gefärbt und innerhalb von weniger als vier Stunden von einem Pathologen ausgewertet werden konnten. Die Limitierung einer TMA-Untersuchung auf ein 0.6mm messendes Gewebestück pro Tumor wurde immer wieder als mögliche Schwäche der Methode diskutiert, da fokale Befunde in einem heterogenen Tumor mit diesem Verfahren übersehen werden können.

Studien haben allerdings gezeigt, dass alle klinisch etablierten Prognosemarker wie die HER2 Östrogen- und Progesteronrezeptor Untersuchungen beim Mammakarzinom, die PTEN Analyse beim Prostatakarzinom oder der Ki67-Labeling-Index beim Harnblasenkarzinom sich an Tissue Microarrays (wenn diese groß genug sind) ohne Weiteres reproduzieren lassen. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass an Großschnitten identifizierte fokale Befunde, welche sich an aus den entsprechenden Blöcken hergestellten TMAs nicht identifizieren lassen, keine klinische Relevanz besitzen müssen (Torhorst et al. 2001).

Die Limitierung einer Tumoruntersuchung auf ein 0.6 mm messendes Gewebeareal weist auch mehrere Vorteile auf, die über die rasche Abarbeitung einer TMA-Studie hinausgehen. Für die vorliegende Studie von besonderer Bedeutung ist die maximale Vergleichbarkeit verschiedener molekularer Befunde, welche an konsekutiven Schnitten eines TMAs erhoben werden. Alle in dieser Studie verwendeten molekularen Befunde, wie der PD-L1 Status, die Zahl der CD8 positiven Zellen, die AMACR Expression sowie die Expression von p53, p16, MUC5AC und E-Cadherin, wurden somit an konsekutiven Gewebeschnitten und identischen Subpopulationen der Tumoren bestimmt. Die Limitierung auf ein 0.6 mm messendes Gewebestück sichert dabei, dass auffällige oder diskrepante Befunde nicht durch Tumorheterogenität mit Untersuchung unterschiedlicher Tumorareale hervorgerufen sind. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die AMACR Expression im Vergleich zu anderen molekularen Befunden auch inverse Zusammenhänge aufzeigte. Eine starke AMACR Expression war mit einer geringen MUC5AC Expression und einer geringen Zahl von CD8 positiven Lymphozyten assoziiert. Inverse Korrelationen an Tissue Microarrays schließen falsch positive Korrelationen durch eine ungenügende Gewebequalität aus. Wenn in einem TMA nämlich ein hoher Anteil von Tumoren vorkommt, welche durch eine unangemessene Gewebepreparation nicht immunreaktiv sind, würden diese Tumoren mit den meisten eingesetzten Antikörpern ein negatives Färbeergebnis erzeugen.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studie keine Hinweise für eine relevante prognostische Bedeutung der AMACR Expressionen beim Kolonkarzinom. Es zeigt sich aber ein hoch signifikanter Zusammenhang mit allen Parametern, die bekanntermaßen mit einer erhöhten Ansprechwahrscheinlichkeit auf Immuncheckpoint-Inhibitoren hindeuten:

Mikrosatelliteninstabilität, PD-L1 Überexpression und eine hohe Zahl intratumoraler CD8+ Lymphozyten. Die mögliche Bedeutung der immunhistochemischen Untersuchungen von AMACR als Surrogat für ein mögliches Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibitoren Therapie beim Kolonkarzinom und anderen Tumoren macht weitere Untersuchungen notwendig.

5. Zusammenfassung

Die Alpha-Methylacyl-Coenzym A Racemase (AMACR) ist beim Kolonkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe häufig überexprimiert. Die Befunde der Literatur sind allerdings bezüglich der Häufigkeit der Überexpression und ihrer klinischen Relevanz divergent. Zur Klärung der möglichen klinischen Bedeutung der AMACR Expression beim Kolonkarzinom wurde deswegen eine Studie an mehr als 1800 Karzinomen durchgeführt, wobei zur Minimierung möglicher methodischer Probleme zwei verschiedene Antikörper an zwei verschiedenen Patientenkollektiven -gesammelt in zwei unterschiedlichen Pathologieinstituten-zum Einsatz kamen. In einem Tissue Microarray-Format wurden 1802 Karzinome, davon 826 aus dem Institut für Pathologie des UKE und 976 aus dem Institut für Pathologie des Klinikums Fürth immunhistochemisch mit dem Antikörper HH 8F4 (hergestellt am UKE) und dem Dako Klon 13H4 untersucht. Die mit den beiden verschiedenen Antikörpern erzielten Ergebnisse unterschieden sich kaum. Von 1497 (Klon HH 8F4) bzw. 1492 (Dako Klon) auswertbaren Tumoren des Gesamtkollektivs waren 15% (HH 8F4) / 22% (Dako) negativ, 12% / 16% schwach positiv, 15% / 15% mäßig stark positiv und 58% / 47% stark positiv. Es bestand eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Antikörper ($p < 0.0001$). Da auch zwischen den beiden Tumorkollektiven keine signifikanten Unterschiede in der AMACR Expression gefunden wurden und die Beziehungen zwischen der AMACR Expression und klinischen bzw. molekularen Parametern für beide Antikörper weitestgehend identische Ergebnisse erzielten, werden nachstehend ausschließlich Ergebnisse für HH 8F4 am Gesamtkollektiv wiedergegeben.

Dabei fanden sich keine signifikanten Beziehungen zu histopathologischen Malignitätsparametern, wie pT Stadium ($p = 0.23$), Nodalstatus ($p = 0.13$), V-Status ($p = 0.0653$) und L-Status ($p = 0.15$). Eine hoch signifikante Assoziation fand sich aber zwischen geringer oder fehlender AMACR Expression, einer rechtsseitigen Tumorlokalisierung und dem Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität. 66.3% aller AMACR negativen Tumoren waren mikrosatelliteninstabil. Die signifikante Beziehung zwischen AMACR Negativität und Mikrosatelliteninstabilität war unabhängig von der Tumorlokalisierung und fand sich in Unterkollektiven von Tumoren von links ($p < 0.0001$), rechts ($p < 0.0001$), Zökum ($p < 0.0001$), Colon ascendens ($p < 0.0001$), Colon transversum ($p = 0.0004$), Colon descendens ($p = 0.0135$), Sigma ($p = 0.0042$) und Rektum ($p = 0.0002$). Weiter vergleichende Untersuchungen mit existierenden Daten früherer Studien ergaben zudem

signifikante Zusammenhänge zwischen einem negativen Ausfall der AMACR Expression und PD-L1 Positivität ($p < 0.0001$) sowie einer erhöhten intratumoralen Dichte von CD8 positiven Lymphozyten ($p < 0.0001$). Tumoren mit kräftiger AMACR Expression weisen seltener RAS Mutationen ($p < 0.0001$), BRAF Mutationen ($p < 0.0001$), eine MUC5AC Expression ($p < 0.0001$) und einen E-Cadherin Expressionsverlust ($p = 0.0036$) auf.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie, dass die AMACR Expression nicht mit histopathologischen Malignitätsparametern beim Kolonkarzinom korreliert, hingegen aber eng mit Parametern für ein Ansprechen auf eine immunonkologische Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren assoziiert ist.

Nur 15% aller Kolonkarzinome sind AMACR negativ. Von diesen sind 66.3% mikrosatelliteninstabil (im Gegensatz zu 16.9% der stark AMACR positiven) und 56.5% PD-L1 positiv (im Vergleich zu 10.9% der stark AMACR positiven).

Für die Annahme, dass eine AMACR Negativität ein Surrogat für ein mögliches Therapieansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren darstellt, spricht auch die signifikant höhere Zahl CD8 positiver Lymphozyten in dieser Subpopulation. Weitere Studien sind nötig, um die eindeutig prädiktive Bedeutung der AMACR Expression für Checkpoint-Inhibitoren zu klären.

Alpha-methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR) is frequently overexpressed in colon carcinoma compared to normal tissue. However, findings in literature are divergent regarding the frequency of overexpression and its clinical relevance. Therefore, to clarify the possible clinical relevance of AMACR expression in colon carcinoma, a study was performed on more than 1800 carcinomas, using two different antibodies on two different patient collectives, collected in two different pathology institutes, to minimize potential methodological problems. In a tissue microarray format, 1802 carcinomas, including 826 from the Institute of Pathology at UKE and 976 from the Institute of Pathology at Klinikum Fürth, were examined immunohistochemically with the antibody HH 8F4 (produced at UKE) and the Dako clone 13H4.

The results obtained with the two different antibodies hardly differed. Of 1497 (clone HH 8F4) and 1492 (Dako clone) evaluable tumors of the total collective, respectively, 15% (HH 8F4) / 22% (Dako) were negative, 12% / 16% weakly positive, 15% / 15% moderately strongly positive, and 58% / 47% strongly positive. There was a highly significant correlation between the results of both antibodies ($p < 0.0001$). Since no significant differences in AMACR expression were found between the two tumor collectives and the relationships between AMACR expression and clinical or molecular parameters were largely identical for both antibodies, only results for HH 8F4 in the overall collective are presented below.

No significant relationships were found with histopathological malignancy parameters such as pT stage ($p = 0.23$), nodal status ($p = 0.13$), V-status ($p = 0.0653$) and L-status ($p = 0.15$). However, a highly significant association was found between low or absent AMACR expression, a right-sided tumor location and the presence of microsatellite instability. 66.3% of all AMACR negative tumors were microsatellite unstable. The significant relationship between AMACR negativity and microsatellite instability was independent from tumor location and was found in subcollectives of tumors from the left ($p < 0.0001$), right ($p < 0.0001$), cecum ($p < 0.0001$), ascending colon ($p < 0.0001$), transverse colon ($p = 0.0004$), descending colon ($p = 0.0135$), sigmoid ($p = 0.0042$) and rectum ($p = 0.0002$). Further comparisons with existing data from previous studies also revealed significant associations between negative failure of AMACR expression and PD-L1 positivity ($p < 0.0001$) as well as increased intratumoral density of CD8 positive lymphocytes ($p < 0.0001$). Tumors with strong AMACR expression were less likely to have RAS mutations ($p < 0.0001$), BRAF mutations ($p < 0.0001$), MUC5AC expression ($p < 0.0001$) and loss of E-Cadherin expression ($p = 0.0036$).

In summary, the data from this study show that AMACR expression is not correlated with histopathologic malignancy parameters in colon carcinoma but is closely associated with parameters for response to immuno-oncologic therapy with checkpoint inhibitors. Only 15% of all colon carcinomas are AMACR negative. Of these, 66.3% are microsatellite unstable (compared with 16.9% of those strongly AMACR positive) and 56.5% are PD-L1 positive (compared with 10.9% of those strongly AMACR positive). The significantly higher number of

CD8 positive lymphocytes in this subpopulation also supports the assumption that AMACR negativity is a surrogate for a possible therapeutic response to immune checkpoint inhibitors. Further studies are needed to clarify the true predictive significance of AMACR expression for checkpoint inhibitors.

6. Literaturverzeichnis

- ABU HASHEM, R. 2021. Die Bedeutung proliferierender CD8 positiver Lymphozyten beim Kolonkarzinom. Medizinische Dissertation, Institut für Pathologie, Universität Hamburg.
- BARRAS, D., MISSIAGLIA, E., WIRAPATI, P., SIEBER, O. M., JORISSEN, R. N., LOVE, C., MOLLOY, P. L., JONES, I. T., MCLAUGHLIN, S., GIBBS, P., GUINNEY, J., SIMON, I. M., ROTH, A. D., BOSMAN, F. T., TEJPAR, S. & DELORENZI, M. 2017. BRAF V600E Mutant Colorectal Cancer Subtypes Based on Gene Expression. *Clin Cancer Res*, 23, 104-115.
- BENDARDAF, R., EL-SERAFI, A., SYRJANEN, K., COLLAN, Y. & PYRHONEN, S. 2017. The effect of vascular endothelial growth factor-1 expression on survival of advanced colorectal cancer patients. *Libyan J Med*, 12, 1290741.
- BOX, A., ALSHALALFA, M., HEGAZY, S. A., DONNELLY, B. & BISMAR, T. A. 2016. High alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) is associated with ERG expression and with adverse clinical outcome in patients with localized prostate cancer. *Tumour Biol*, 37, 12287-12299.
- CARVALHO, B., DIOSDADO, B., TERHAAR SIVE DROSTE, J. S., BOLIJN, A. S., KOMOR, M. A., DE WIT, M., BOSCH, L. J. W., VAN BURINK, M., DEKKER, E., KUIPERS, E. J., COUPE, V. M. H., VAN GRIEKEN, N. C. T., FIJNEMAN, R. J. A. & MEIJER, G. A. 2018. Evaluation of Cancer-Associated DNA Copy Number Events in Colorectal (Advanced) Adenomas. *Cancer Prev Res (Phila)*, 11, 403-412.
- CHAN, D. L. H., SEGELOV, E., WONG, R. S., SMITH, A., HERBERTSON, R. A., LI, B. T., TEBBUTT, N., PRICE, T. & PAVLAKIS, N. 2017. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 6, CD007047.
- CHEN, Z. M., RITTER, J. H. & WANG, H. L. 2005. Differential expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in adenocarcinomas of the small and large intestines. *Am J Surg Pathol*, 29, 890-896.
- CHODON, T., KOYA, R. C. & ODUNSI, K. 2015. Active Immunotherapy of Cancer. *Immunol Invest*, 44, 817-836.
- COLICELLI, J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004, RE13.

- CREMOLINI, C., LOUPAKIS, F., ANTONIOTTI, C., LUPI, C., SENSI, E., LONARDI, S., MEZI, S., TOMASELLO, G., RONZONI, M., ZANIBONI, A., TONINI, G., CARLOMAGNO, C., ALLEGRINI, G., CHIARA, S., D'AMICO, M., GRANETTO, C., CAZZANIGA, M., BONI, L., FONTANINI, G. & FALCONE, A. 2015. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *The Lancet Oncology*, 16, 1306-1315.
- DARVIN, P., TOOR, S. M., SASIDHARAN NAIR, V. & ELKORD, E. 2018. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*, 50, 1-11.
- DE' ANGELIS, G. L., BOTTARELLI, L., AZZONI, C., DE' ANGELIS, N., LEANDRO, G., DI MARIO, F., GAIANI, F. & NEGRI, F. 2018. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*, 89, 97-101.
- DEMORY BECKLER, M., HIGGINBOTHAM, J. N., FRANKLIN, J. L., HAM, A. J., HALVEY, P. J., IMASUEN, I. E., WHITWELL, C., LI, M., LIEBLER, D. C. & COFFEY, R. J. 2013. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics*, 12, 343-355.
- EMAM, E., GOMAA, W., AL-AHWAL, M., MUSHREF, R., AL-MAGHRABI, B., BUHMEIDA, A., AL-QAHTANI, M. & AL-MAGHRABI, J. 2016. Lack of AMACR Immunostaining is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Colorectal Carcinoma. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 6.
- ENGIN, O., UYAR, M. E., SUNAMAK, O. & IPEKCI, F. 2015. Colon Cancer Risk and Prevention. *Colon Polyps and the Prevention of Colorectal Cancer*. Springer, 236.
- EVANS, A. J. 2003. Alpha-methylacyl CoA racemase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J Clin Pathol*, 56, 892-897.
- FEENEY, G., SEHGAL, R., SHEEHAN, M., HOGAN, A., REGAN, M., JOYCE, M. & KERIN, M. 2019. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management. *World J Gastroenterol*, 25, 4850-4869.
- FERDINANDUSSE, S., DENIS, S., L. I. J., DACREMONT, G., WATERHAM, H. R. & WANDERS, R. J. 2000. Subcellular localization and physiological role of alpha-methylacyl-CoA racemase. *J Lipid Res*, 41, 1890-1896.
- FERNANDEZ-MEDARDE, A. & SANTOS, E. 2011. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2, 344-358.
- GARCIA-ALFONSO, P., GRANDE, E., POLO, E., AFONSO, R., REINA, J. J., JORGE, M., CAMPOS, J. M., MARTINEZ, V., ANGELES, C. & MONTAGUT, C. 2014. The role of antiangiogenic agents in the treatment of patients with advanced colorectal cancer according to K-RAS status. *Angiogenesis*, 17, 805-821.

- GIOVANNUCCI, E. 1995. Insulin and colon cancer. *Cancer Causes Control*, 6, 164-179.
- GOLDENBERG, M. M. 1999. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clinical Therapeutics*, 21, 309-318.
- HAMILTON, S. R. 1992. The adenoma-adenocarcinoma sequence in the large bowel: variations on a theme. *J Cell Biochem Suppl*, 16G, 41-6.
- HATCH, Q. M., KNIERY, K. R., JOHNSON, E. K., FLORES, S. A., MOEIL, D. L., THOMPSON, J. J., MAYKEL, J. A. & STEELE, S. R. 2016. Screening or Symptoms? How Do We Detect Colorectal Cancer in an Equal Access Health Care System? *J Gastrointest Surg*, 20, 431-8.
- HE, H. L., LEE, Y. E., CHANG, M. T., SHIUE, Y. L., CHANG, S. L., CHEN, T. J. & CHIU, C. T. 2018. AMACR overexpression acts as a negative prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci*, 15, 638-644.
- HIDALGO, M., AMANT, F., BIANKIN, A. V., BUDINSKA, E., BYRNE, A. T., CALDAS, C., CLARKE, R. B., DE JONG, S., JONKERS, J., MAELANDSMO, G. M., ROMAN-ROMAN, S., SEOANE, J., TRUSOLINO, L. & VILLANUEVA, A. 2014. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov*, 4, 998-1013.
- HUANG, C. & CHEN, Y. 2017. Lymphangiogenesis and colorectal cancer. *Saudi Med J*, 38, 237-244.
- IRAHARA, N., BABA, Y., NOSHO, K., SHIMA, K., YAN, L., DIAS-SANTAGATA, D., IAFRATE, A. J., FUCHS, C. S., HAIGIS, K. M. & OGINO, S. 2010. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol*, 19, 157-163.
- JIANG, Z., FANGER, G. R., BANNER, B. F., WODA, B. A., ALGATE, P., DRESSER, K., XU, J., REED, S. G., ROCK, K. L. & CHU, P. G. 2003a. A dietary enzyme: alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S is overexpressed in colon carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 27, 422-6.
- JIANG, Z., FANGER, G. R., WODA, B. A., BANNER, B. F., ALGATE, P., DRESSER, K., XU, J. & CHU, P. G. 2003b. Expression of α -methylacyl-coa racemase (p504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Human Pathology*, 34, 792-796.
- JIANG, Z., WODA, B. A., WU, C. L. & YANG, X. J. 2004. Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker: alpha-methylacyl CoA racemase (P504S). *Am J Clin Pathol*, 122, 275-289.
- JOHNS, L. E. & HOULSTON, R. S. 2001. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*, 96, 2992-3003.

- KALIMUTHU, S. N., CHELLIAH, A. & CHETTY, R. 2016. From traditional serrated adenoma to tubulovillous adenoma and beyond. *World J Gastrointest Oncol*, 8, 805-809.
- KOIDO, S., OHKUSA, T., HOMMA, S., NAMIKI, Y., TAKAKURA, K., SAITO, K., ITO, Z., KOBAYASHI, H., KAJIHARA, M., UCHIYAMA, K., ARIHIRO, S., ARAKAWA, H., OKAMOTO, M., GONG, J. & TAJIRI, H. 2013. Immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 19, 8531-8542.
- KUEFER, R., VARAMBALLY, S., ZHOU, M., LUCAS, P. C., LOEFFLER, M., WOLTER, H., MATTFELDT, T., HAUTMANN, R. E., GSCHWEND, J. E., BARRETTE, T. R., DUNN, R. L., CHINNAIYAN, A. M. & RUBIN, M. A. 2002. α -Methylacyl-CoA Racemase: Expression Levels of this Novel Cancer Biomarker Depend on Tumor Differentiation. *The American Journal of Pathology*, 161, 841-848.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF).2019a. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Präoperative Diagnostik und Chirurgie, 105.
[Online im Internet] URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Langversion_2.1.pdf/
[Stand: 10.04.2021, 13:30].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF). 2019b. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Endoskopie: Durchführung und Polypenmanagement, 97-98.
[Online im Internet] URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Langversion_2.1.pdf/
[Stand: 10.04.2021, 13:35].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF). 2019c. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Adjuvante und neoadjuvante Therapie, 157.
[Online im Internet] URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Langversion_2.1.pdf/
[Stand: 10.04.2021, 13:40].
- LEISCHNER, H. 2020. Kolorektales Karzinom. In: BASICS Onkologie, 5. Aufl., Elsevier GmbH, München, 29, 71-73.
- LI, W., CAGLE, P. T., BOTERO, R. C., LIANG, J. J., ZHANG, Z. & TAN, D. 2008. Significance of overexpression of alpha methylacyl-coenzyme A racemase in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 27, 2.

- LIN, A., WEISER, M. R., KLIMSTRA, D. S., PATY, P. B., TANG, L. H., AL-AHMADIE, H., HOO PARK, S., GUILLEM, J. G., TEMPLE, L., WONG, W. D., GERALD, W. L. & SHIA, J. 2007. Differential expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in colorectal carcinoma bears clinical and pathologic significance. *Hum Pathol*, 38, 850-856.
- LLOYD, M. D., YEVGLEVSKIS, M., LEE, G. L., WOOD, P. J., THREADGILL, M. D. & WOODMAN, T. J. 2013. alpha-Methylacyl-CoA racemase (AMACR): metabolic enzyme, drug metabolizer and cancer marker P504S. *Prog Lipid Res*, 52, 220-230.
- LUO, J., ZHA, S., GAGE, W. R., DUNN, T. A., HICKS, J. L., BENNETT, C. J., EWING, C. M., PLATZ, E. A., FERDINANDUSSE, S., WANDERS, R. J., TRENT, J. M., ISAACS, W. B. & DE MARZO, A. M. 2002. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res*, 62, 2220-2226.
- MARX, A., SIMON, P., SIMON, R., MIRLACHER, M., IZBICKI, J. R., YEKEBAS, E., KAIFI, J. T., TERRACCIANO, L. & SAUTER, G. 2008. AMACR expression in colorectal cancer is associated with left-sided tumor localization. *Virchows Arch*, 453, 243-248.
- NARAYANAN, S., KAWAGUCHI, T., PENG, X., QI, Q., LIU, S., YAN, L. & TAKABE, K. 2019. Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. *Sci Rep*, 9, 13455.
- NG, K. & ZHU, A. X. 2008. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 65, 8-20.
- NORDLINGER, B., VAN CUTSEM, E., GRUENBERGER, T., GLIMELIUS, B., POSTON, G., ROUGIER, P., SOBRERO, A., YCHOU, M., EUROPEAN COLORECTAL METASTASES TREATMENT, G. & SIXTH INTERNATIONAL COLORECTAL LIVER METASTASES, W. 2009. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Ann Oncol*, 20, 985-992.
- OFFERHAUS, G. J. A., GIARDIELLO, F. M., KRUSH, A. J., BOOKER, S. V., TERSMETTE, A. C., KELLEY, N. C. & HAMILTON, S. R. 1992. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 102, 1980-1982.
- OKAYASU, I. 2012. Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol Int*, 62, 368-380.

- RICO, S. D., HOFLMAYER, D., BUSCHECK, F., DUM, D., LUEBKE, A. M., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., HINSCH, A., MOLLER-KOOP, C., PEREZ, D., IZBICKI, J. R., NEIPP, M., MOFID, H., LARUSSON, H., DANIELS, T., ISBERT, C., COERPER, S., DITTERICH, D., RUPPRECHT, H., GOETZ, A., FRAUNE, C., MOLLER, K., MENZ, A., BERNREUTHER, C., CLAUDITZ, T. S., SAUTER, G., UHLIG, R., WILCZAK, W., SIMON, R., STEURER, S., LEBOK, P., BURANDT, E., KRECH, T. & MARX, A. H. 2020. Elevated MUC5AC expression is associated with mismatch repair deficiency and proximal tumor location but not with cancer progression in colon cancer. *Med Mol Morphol*.
- RIIHIMAKI, M., HEMMINKI, A., SUNDQUIST, J. & HEMMINKI, K. 2016. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*, 6, 29765.
- ROBERT KOCH-INSTITUT UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. 2019. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin. 17,38.
[Online im Internet] URL:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile [Stand: 08.06.2020, 13:56].
- RODRIGUEZ-BIGAS, M. A., LIN, E. H., CRANE, C. H. 2003. Surgical Management of Colorectal Cancer. In: Holland-Frei Cancer Medicine. Kufe, D.W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., et al. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker.
- ROSEN, L. S., JACOBS, I. A. & BURKES, R. L. 2017. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target Oncol*, 12, 599-610.
- ROSENBAUM, M. W., BLEDSOE, J. R., MORALES-OYARVIDE, V., HUYNH, T. G. & MINO-KENUDSON, M. 2016. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*, 29, 1104-1112.
- ROTTE, A. 2019. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 38, 255.
- RUBIN, M. A., BISMAR, T. A., ANDREN, O., MUCCI, L., KIM, R., SHEN, R., GHOSH, D., WEI, J. T., CHINNAIYAN, A. M., ADAMI, H. O., KANTOFF, P. W. & JOHANSSON, J. E. 2005. Decreased alpha-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 1424-1432.
- RUBIN, M. A., ZERKOWSKI, M. P., CAMP, R. L., KUEFER, R., HOFER, M. D., CHINNAIYAN, A. M. & RIMM, D. L. 2004. Quantitative Determination of Expression of the Prostate Cancer Protein α -Methylacyl-CoA Racemase Using Automated Quantitative Analysis (AQUA). *The American Journal of Pathology*, 164, 831-840.

- RUBIN, M. A., ZHOU, M., DHANASEKARAN, S. M., VARAMBALLY, S., BARRETTE, T. R., SANDA, M. G., PIENTA, K. J., GHOSH, D. & CHINNAIYAN, A. M. 2002. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA*, 287, 1662-1670.
- SAFAEE ARDEKANI, G., JAFARNEJAD, S. M., TAN, L., SAEEDI, A. & LI, G. 2012. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 7, e47054.
- SARTORE-BIANCHI, A., TRUSOLINO, L., MARTINO, C., BENCARDINO, K., LONARDI, S., BERGAMO, F., ZAGONEL, V., LEONE, F., DEPETRIS, I., MARTINELLI, E., TROIANI, T., CIARDIELLO, F., RACCA, P., BERTOTTI, A., SIRAVEGNA, G., TORRI, V., AMATU, A., GHEZZI, S., MARRAPESE, G., PALMERI, L., VALTORTA, E., CASSINGENA, A., LAURICELLA, C., VANZULLI, A., REGGE, D., VERONESE, S., COMOGLIO, P. M., BARDELLI, A., MARSONI, S. & SIENA, S. 2016. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17, 738-746.
- SCHIRRMACHER, V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*, 54, 407-419.
- SHACTER, E. & WEITZMAN, S. A. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)*, 16, 217-26, 229; discussion 230-232.
- SHI, D. D., ARNAOUT, O., BI, W. L., BUCHBINDER, E. I., CAGNEY, D. N., INSCO, M. L., LIU, D., SCHOENFELD, J. D. & AIZER, A. A. 2020. Severe Radiation Necrosis Refractory to Surgical Resection in Patients with Melanoma and Brain Metastases Managed with Ipilimumab/Nivolumab and Brain-Directed Stereotactic Radiation Therapy. *World Neurosurg*, 139, 226-231.
- SHI, X., GONG, E. & WU, X. 2007. Alpha-methylacyl-CoA Racemase/P504S Overexpression in Colorectal Carcinoma is Correlated With Tumor Differentiation. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 15, 175-180.
- SHI, Y. 2018. Regulatory mechanisms of PD-L1 expression in cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 67, 1481-1489.
- SHUKLA, N., ADHYA, A. K. & RATH, J. 2017. Expression of Alpha - Methylacyl - Coenzyme A Racemase (AMACR) in Colorectal Neoplasia. *J Clin Diagn Res*, 11, EC35-EC38.
- SINGH, T., AMIRTHAM, U., SATHEESH, C. T., LAKSHMAIAH, K. C., SURESH, T. M., BABU, K. G. & RAMACHANDRA, C. 2011. Floor-of-mouth metastasis in colorectal cancer. *Ann Saudi Med*, 31, 87-9.

- SMITH, D., BALLAL, M., HODDER, R., SOIN, G., SELVACHANDRAN, S. N. & CADE, D. 2006. Symptomatic presentation of early colorectal cancer. *Ann R Coll Surg Engl*, 88, 185-90.
- STEINKE, V., ENGEL, C., BUTTNER, R., SCHACKERT, H. K., SCHMIEGEL, W. H. & PROPPING, P. 2013. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch Arztebl Int*, 110, 32-38.
- TAKAHARA, K., AZUMA, H., SAKAMOTO, T., KIYAMA, S., INAMOTO, T., IBUKI, N., NISHIDA, T., NOMI, H., UBAI, T., SEGAWA, N. & KATSUOKA, Y. 2009. Conversion of Prostate Cancer from Hormone Independency to Dependency Due to AMACR Inhibition: Involvement of Increased AR Expression and Decreased IGF1 Expression. *Anticancer Research*, 29, 2497-2505.
- THUN, M. J., JACOBS, E. J. & PATRONO, C. 2012. The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol*, 9, 259-267.
- TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KOCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H., MIHATSCH, M., KALLIONIEMI, O. P. & SAUTER, G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159, 2249-2256.
- VALDERRAMA-TREVINO, A. I., BARRERA-MERA, B., CEBALLOS-VILLALVA, J. C. & MONTALVO-JAVE, E. E. 2017. Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. *Euroasian J Hepatogastroenterol*, 7, 166-175.
- VILAR, E. & GRUBER, S. B. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 153-162.
- WALUGA, M., ZORNIK, M., FICHNA, J., KUKLA, M. & HARTLEB, M. 2018. Pharmacological and dietary factors in prevention of colorectal cancer. *J Physiol Pharmacol*, 69.
- WENT, P. T., SAUTER, G., OBERHOLZER, M. & BUBENDORF, L. 2006. Abundant expression of AMACR in many distinct tumour types. *Pathology*, 38, 426-432.
- WINAWER, S. J., ZAUBER, A. G., HO, M. N., O'BRIEN, M. J., GOTTLIEB, L. S., STERNBERG, S. S., WAYE, J. D., SCHAPIRO, M., BOND, J. H., PANISH, J. F. & ET AL. 1993. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*, 329, 1977-1981.
- WOODMAN, T. J., WOOD, P. J., THOMPSON, A. S., HUTCHINGS, T. J., STEEL, G. R., JIAO, P., THREADGILL, M. D. & LLOYD, M. D. 2011. Chiral inversion of 2-arylpropionyl-CoA esters by human alpha-methylacyl-CoA racemase 1A (P504S)—a potential mechanism for the anti-cancer effects of ibuprofen. *Chem Commun (Camb)*, 47, 7332-7334.

- WU, L. C., CHEN, L. T., TSAI, Y. J., LIN, C. M., LIN, C. Y., TIAN, Y. F., SHEU, M. J., UEN, Y. H., SHIUE, Y. L., WANG, Y. H., YANG, S. J., WU, W. R., LI, S. H., IWAMURO, M., KOBAYASSHI, N., HUANG, H. Y. & LI, C. F. 2012. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase overexpression in gallbladder carcinoma confers an independent prognostic indicator. *J Clin Pathol*, 65, 309-314.
- WU, S. W., MA, C. C. & LI, W. H. 2015. Does overexpression of HER-2 correlate with clinicopathological characteristics and prognosis in colorectal cancer? Evidence from a meta-analysis. *Diagn Pathol*, 10, 144.
- XU, B., CAI, Z., ZENG, Y., CHEN, L., DU, X., HUANG, A., LIU, X. & LIU, J. 2014. alpha-Methylacyl-CoA racemase (AMACR) serves as a prognostic biomarker for the early recurrence/metastasis of HCC. *J Clin Pathol*, 67, 974-979.
- YAEGER, R., CERCEK, A., CHOU, J. F., SYLVESTER, B. E., KEMENY, N. E., HECHTMAN, J. F., LADANYI, M., ROSEN, N., WEISER, M. R., CAPANU, M., SOLIT, D. B., D'ANGELICA, M. I., VAKIANI, E. & SALTZ, L. B. 2014. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 120, 2316-2324.
- ZHOU, M., CHINNAIYAN, A. M., KLEER, C. G., LUCAS, P. C. & RUBIN, M. A. 2002. Alpha-Methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol*, 26, 926-931.

7. Danksagung

Zunächst möchte ich meinen beiden Doktorvätern Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter und Herrn Prof. Dr. Ronald Simon für die tatkräftige und positive Unterstützung auf dem Weg des Fertigstellens dieser Dissertation bedanken. Den Austausch habe ich jederzeit als konstruktiv und kollegial empfunden.

Ferner möchte ich insbesondere Frau Melanie Witt aus dem TMA Labor des Institutes für Pathologie am UKE danken, die mich zunächst als Doktorandin aufgenommen, eingearbeitet und stets bei organisatorischen und fachlichen Fragen, auch im Rahmen der Dissertation, unterstützt hat. Ebenso bedanke ich mich bei Inge, Maren und Sünje für das allzeit geistreiche und nette Arbeitsklima. Als Doktorandin in einem großen Team mit anderen Doktoranden möchte ich mich auch bei denjenigen bedanken, die diese Zeit mit mir erlebt haben.

Zum Schluss bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, Wilken und Bettina, die mich auf dem Weg ab Beginn des Studiums bis hierhin unterstützt haben. Vor allem aber auch meinem Bruder, der mich durch sein Medizinstudium ermutigt hat, Zahnmedizin zu studieren. Ein weiterer besonderer Dank gilt meinem Ehemann, René, der mir immer zur Seite steht und mich unterstützt.

8. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

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 nach Ausgabe (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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: