

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Innere Medizin
Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg

Direktor:
Prof. Dr. med. Andreas de Weerth

Das Kolonkarzinom im Stadium II – prognostische Bedeutung des CDX2- und MSI/MMR-Status – eine immunhistologische Analyse

Dissertation

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

vorgelegt von:

Christian Seevers
aus Hamburg

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.12.2021

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Hans Klose

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas de Weerth

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung und Zielsetzung.....	2
2	Einleitung.....	3
2.1	Das Kolonkarzinom.....	3
2.2	Das Kolonkarzinom im Stadium II.....	5
2.3	Prognostische Faktoren beim Kolonkarzinom im Stadium II.....	9
2.3.1	Klinisch-pathologische Faktoren.....	9
2.3.2	Molekulare Marker.....	10
2.4	Caudaltype-Homebox-Transcription-Factor 2 (CDX2).....	12
2.5	Der MSI/MMR-Status.....	13
3	Patienten, Material und Methoden.....	14
3.1	Patientenkollektiv.....	14
3.2	Untersuchungsmaterial.....	16
3.3	Anfertigung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte.....	17
3.4	Immunhistochemie.....	17
3.5	Auswertung der Immunhistochemie.....	18
3.5.1	Methodik der Bestimmung des CDX2-Status.....	18
3.5.2	Methodik der Bestimmung des MMR-Status.....	19
3.5.3	Evaluation der Immunhistochemie.....	20
3.6	Statistische Analyse.....	20
4	Ergebnisse.....	22
4.1	Charakteristika des Patientenkollektivs.....	22
4.2	5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben.....	25
4.3	Ergebnisse der Untersuchung des CDX2-Status.....	26
4.3.1	Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und morphologischen/molekularen Tumoreigenschaften.....	29
4.3.2	Korrelation zwischen negativem CDX2-Status und der Prognose.....	31
4.4	Ergebnisse der Untersuchung des MSI/MMR-Status.....	33
4.4.1	Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und morphologischen/molekularen Tumoreigenschaften.....	37
4.4.2	Korrelation zwischen dem MSI/MMR-Status und der Prognose.....	41
5	Diskussion.....	43
5.1	Diskussion der Charakteristika und Prognose des Patientenkollektivs.....	43
5.1.1	Diskussion der klinisch-pathologischen und epidemiologischen Eigenschaften des vorliegenden Patientenkollektivs.....	43

5.1.2	Diskussion der Prognose im vorliegenden Patientenkollektiv.....	44
5.2	Diskussion der Ergebnisse der CDX2 Immunhistochemie.....	45
5.2.1	Diskussion der Methodik der CDX2 Immunhistochemie.....	45
5.2.2	Diskussion von CDX2 und klinisch-pathologischen Assoziationen.....	47
5.2.3	Diskussion von CDX2 als Prognosefaktor.....	48
5.3	Diskussion der Immunhistochemie des MSI/MMR-Status.....	50
5.3.1	Diskussion der Methodik der MSI/MMR-Statusbestimmung.....	50
5.3.2	Diskussion des MSI/MMR-Status und klinisch-pathologischen Assoziationen.....	50
5.3.3	Der MSI/MMR-Status als Prognosefaktor.....	51
6	Gesamtergebnis.....	53
7	Zusammenfassung.....	54
8	Summary.....	55
9	Abkürzungsverzeichnis.....	56
10	Tabellenverzeichnis.....	57
11	Abbildungsverzeichnis.....	58
12	Literaturverzeichnis.....	61
13	Danksagung.....	68
14	Lebenslauf.....	69
15	Eidesstattliche Versicherung.....	70

1

2 Fragestellung und Zielsetzung

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland bei Männern die dritthäufigste und bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung (Robert Koch-Institut 2019). Das Kolonkarzinom wird am häufigsten im Stadium II diagnostiziert und hat in diesem Stadium eine heterogene Prognose (O'Connell et al. 2004; Labianca et al. 2013).

Die TNM-Klassifikation hat bei der Prognoseabschätzung des Kolonkarzinoms nach wie vor eine Schlüsselrolle. Ergänzend werden klinisch-pathologische und molekulare Faktoren hinzugezogen, die Tumoren mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einer schlechten Prognose identifizieren sollen.

Trotz aller Bemühungen um eine genaue Klassifikation ist beim Kolonkarzinom im Stadium II die Prognose nicht adäquat einzuschätzen und es fehlt ein überzeugend wirksames adjuvantes Therapiekonzept.

Aufgrund dieser Problematik ist es Gegenstand der aktuellen Forschung, die bisherige Klassifikation zu ergänzen, zu untergliedern und neu zu strukturieren. Eine zentrale Rolle bei den Bemühungen, die Prognose von Kolonkarzinomen im Stadium II zu verbessern, spielen molekulare Marker. Zu diesen molekularen Markern gehören der Caudaltype-Homeobox-Transcription-Factor 2 (CDX2) und der Mikrosatelliteninstabilität/Mismatch-Repair-Status (MSI/MMR-Status).

Die immunhistochemische Untersuchung des CDX2-Status beim Kolonkarzinom im Stadium II wurde in den letzten Jahren in mehreren Studien vorgelegt. Ein negativer CDX2-Status gilt beim Kolonkarzinom in diesem Stadium als vielversprechender Marker für eine schlechte Prognose (Dalerba et al. 2016).

Der MSI/MMR-Status wurde bezüglich seiner prognostischen Wertigkeit umfangreich untersucht. Beim Kolonkarzinom im Stadium II geht der MSI-H/MMRD-Status mit einer besseren Prognose einher, auch wenn die Studienlage diesbezüglich noch sehr heterogen ist (Gkekas et al. 2017).

Hieraus ergab sich für die vorgelegte Arbeit die Frage, ob sich mit der Bestimmung des CDX2-Status, unter Berücksichtigung des MSI/MMR-Status, eine genauere Prognoseabschätzung erreichen lässt.

Folgende Hypothese wurde aus oben beschriebener Problematik aufgestellt:

„Ein negativer CDX2-Status ist beim Kolonkarzinom im Stadium II ein molekularer Marker für eine schlechte Prognose. Das parallele Vorliegen eines negativen CDX2- und Mikrosatelliten-Stabil/Mismatch-Repair-Proficient - (MSS/MMRP) - Status kann eine schlechte Prognose beim Kolonkarzinom im Stadium II noch besser antizipieren.“

3 Einleitung

3.1 Das Kolonkarzinom

Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den drei häufigsten Tumorleiden überhaupt. In der globalen Krebsstatistik liegt das kolorektale Karzinom mit einer geschätzten Inzidenz von 1.096.601 Neuerkrankungen und 551.269 Todesfällen pro Jahr auf Platz vier hinter dem Bronchial-, Mamma- und Prostatakarzinom (Bray et al. 2018).

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland bei Männern die dritthäufigste und bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung (Deutsches Krebsforschungszentrum 2020). Nach Daten des Robert Koch-Institutes (RKI) erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland etwa 32.300 Männer und 25.990 Frauen am kolorektalen Karzinom (Robert Koch-Institut 2019).

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinom variiert geographisch erheblich. Etwa 55 % der kolorektalen Karzinome treten in westlichen Industriestaaten, d.h. in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland auf. Im internationalen Vergleich lag Deutschland im Jahr 2012 in Bezug auf die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate auf dem siebten Platz bei Männern bzw. achten Platz bei Frauen (Ferlay et al. 2013). Das Lebenszeitrisko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken liegt in Deutschland bei 5-6 % (Messmann 2021).

Die Anzahl der Neuerkrankungen verzeichnete bei Männern und Frauen ab 55 Jahren zwischen 2003 und 2013 einen Rückgang um 16 %. Dies ist unter anderem auf die 2002 eingeführte Koloskopie im Rahmen der gesetzlichen Krebsfrüherkennung zurückzuführen, welche für alle Personen ab 55 Jahren angeboten wird (Robert Koch-Institut 2016). Zusätzlich hat sich die Prognose durch ein interdisziplinäres Management, sowie eine verbesserte Diagnostik und Therapie schrittweise verbessert (Heervä et al. 2018; Böckelman et al. 2015).

Mit zunehmendem Lebensalter nimmt das Erkrankungsrisiko stetig zu. Nach dem 50. Lebensjahr kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms. Der Großteil (ca. 90 %) der sporadischen kolorektalen Karzinome manifestiert sich nach dem 55. Lebensjahr. Bei Männern lag das mittlere Erkrankungsalter im Jahr 2016 bei 72 und bei Frauen bei 76 Jahren (Robert Koch-Institut 2019).

Kolorektale Karzinome treten am häufigsten sporadisch auf. Entscheidende Risikofaktoren für die Entstehung kolorektaler Karzinome sind, neben dem hohen Alter, ein erhöhter Körperfettanteil, bestimmte Nahrungsmittel wie tierische Fette und „rotes“ Fleisch sowie der Konsum von Tabak (Mayer et al. 2020). Als protektive Faktoren gelten eine ballaststoffreiche Ernährung, Milchprodukte, körperliche Aktivität, eine langfristige Einnahme von nichtsteroidalen

Antirheumatika (NSAR) und eine Hormonersatztherapie bei Frauen (Nagtegaal 2019).

Bei der Entstehung kolorektaler Karzinome spielen zudem eine erbliche Prädisposition und spezifische Syndrome eine Rolle. Bei 25 % der Patienten liegt eine positive Familienanamnese vor. Verwandte ersten Grades haben ein 2- bis 3-fach erhöhtes Risiko, ihrerseits an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Genetisch klar definierte Syndrome sind bei etwa 3-5 % der kolorektalen Karzinome ursächlich. Diese Syndrome können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Das hereditäre-nicht-polypöse Tumorsyndrom (Lynch-Syndrom) ist deutlich häufiger und ist mit einem 10-15 Jahre früheren Auftreten kolorektaler Karzinome verbunden. Die etwa zehn, im wesentlichen autosomal-dominant vererbten, hereditären Polyposissyndrome sind deutlich seltener (Zagrapan und Offner 2020).

Zudem ist bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Crohn-Colitis, Colitis ulcerosa) das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken mit zunehmender Dauer und Ausdehnung der Grunderkrankung erhöht (Aust et al. 2013). Nach 25 Erkrankungsjahren entsteht bei 8-30 % der Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ein kolorektales Karzinom (Mayer et al. 2020).

Die Pathogenese kolorektaler Karzinome ist komplex. Vereinfachend können drei Modelle der Pathogenese voneinander abgegrenzt werden, die für den Großteil der kolorektalen Karzinome verantwortlich sind. Am häufigsten entwickeln sich sporadische kolorektale Karzinome durch genetische Alterationen über die „Adenom-Karzinom-Sequenz“. Dies wird als „Chromosomal-Instability-Pathway“ bezeichnet. Das konventionelle Adenom des Kolons ist die klassische Vorläuferläsion (Guinney et al. 2015). Weitere 15-20 % aller kolorektalen Karzinome entstehen im Rahmen epigenetischer Prozesse. Durch die zunehmende Methylierung der DNA kommt es zu einem konsekutiven Funktionsverlust wichtiger DNA-Reparaturgene bzw. Tumorsuppressorgene. Hierbei wird gehäuft eine epigenetische Inaktivierung des MLH1-Gens beobachtet. Als Vorläufer bei diesem Pathogeneseweg treten sessile serratierte Läsionen (SSL) auf (Zagrapan und Offner 2020; Nagtegaal 2019). Zusätzlich entstehen 2-3 % der kolorektalen Karzinome auf dem Boden einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Grundlage dieses Tumorgeneseweges sind Keimbahnmutationen des MSI/MMR-Systems (Zagrapan und Offner 2020).

Histopathologisch liegen in 80-85 % der Fälle klassische Adenokarzinome im Differenzierungsgrad I-III vor. In Abbildung 1 ist ein klassisches Adenokarzinom im Differenzierungsgrad G2 dargestellt. Das muzinöse Adenokarzinom ist mit ca. 15-20 % die häufigste Variante des Adenokarzinoms. Auf weitere seltene histopathologische Varianten, die nach der WHO-Klassifikation eingeteilt werden, soll hier nicht näher eingegangen werden (Aust et al. 2013; Nagtegaal 2019).

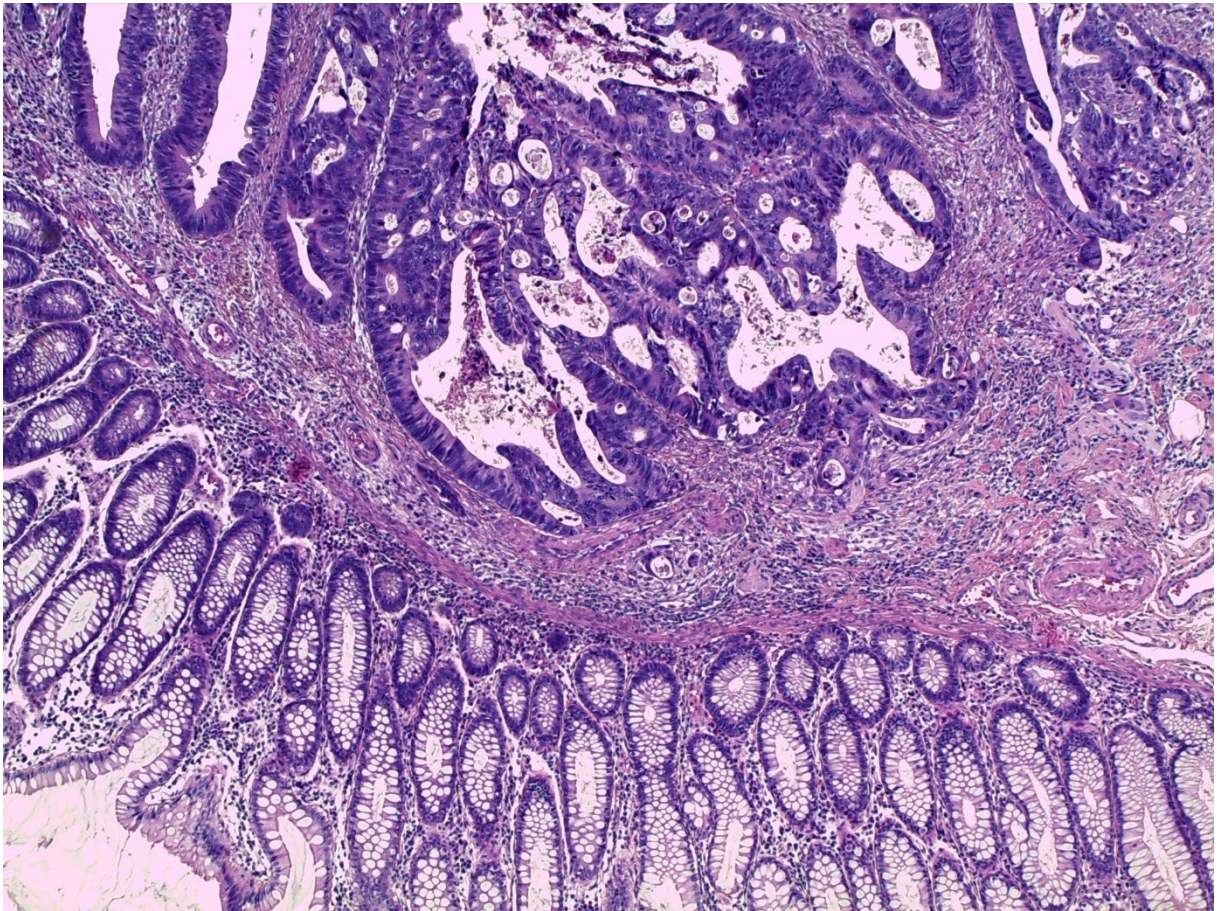


Abbildung 1: HE-Präparat mit Darstellung des Kolonkarzinom im oberen Bildabschnitt. Differenzierungsgrad G2. Im unteren Bildabschnitt ist ein Abschnitt normaler Kolonschleimhaut abgebildet. 50-fache Vergrößerung. (Quelle: Prof. Dr. Günther, Pathologie MVZ Lademannbogen).

Kolonkarzinome werden nach dem internationalen Dokumentationssystem von Rektumkarzinomen abgegrenzt. Tumoren, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder mehr von der Anokutanlinie entfernt sind gelten als Kolonkarzinome (Søreide et al. 1997; Fielding et al. 1991).

3.2 Das Kolonkarzinom im Stadium II

Das Kolonkarzinom wird in etwa 31 % der Fälle im UICC - (Union Internationale Contre Le Cancer) - Stadium II diagnostiziert und stellt damit das häufigste Krankheitsstadium bei Diagnosestellung dar (Mayer et al. 2020).

Das Stadium II gilt als Frühstadium der Erkrankung und entspricht dem TNM-Stadium T3 oder T4 a/b, N0, M0. Es liegt somit eine lokal begrenzte Krankheitsausdehnung ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasierung vor. Die TNM-Klassifikation des Kolonkarzinoms ist in Tabelle 1 dargestellt und die Abbildung 2 zeigt ein Kolonkarzinom im T3-Stadium.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation Kolonkarzinom (Wittekind 2017).

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M	Metastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten), ohne Peritonealmetastasen
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

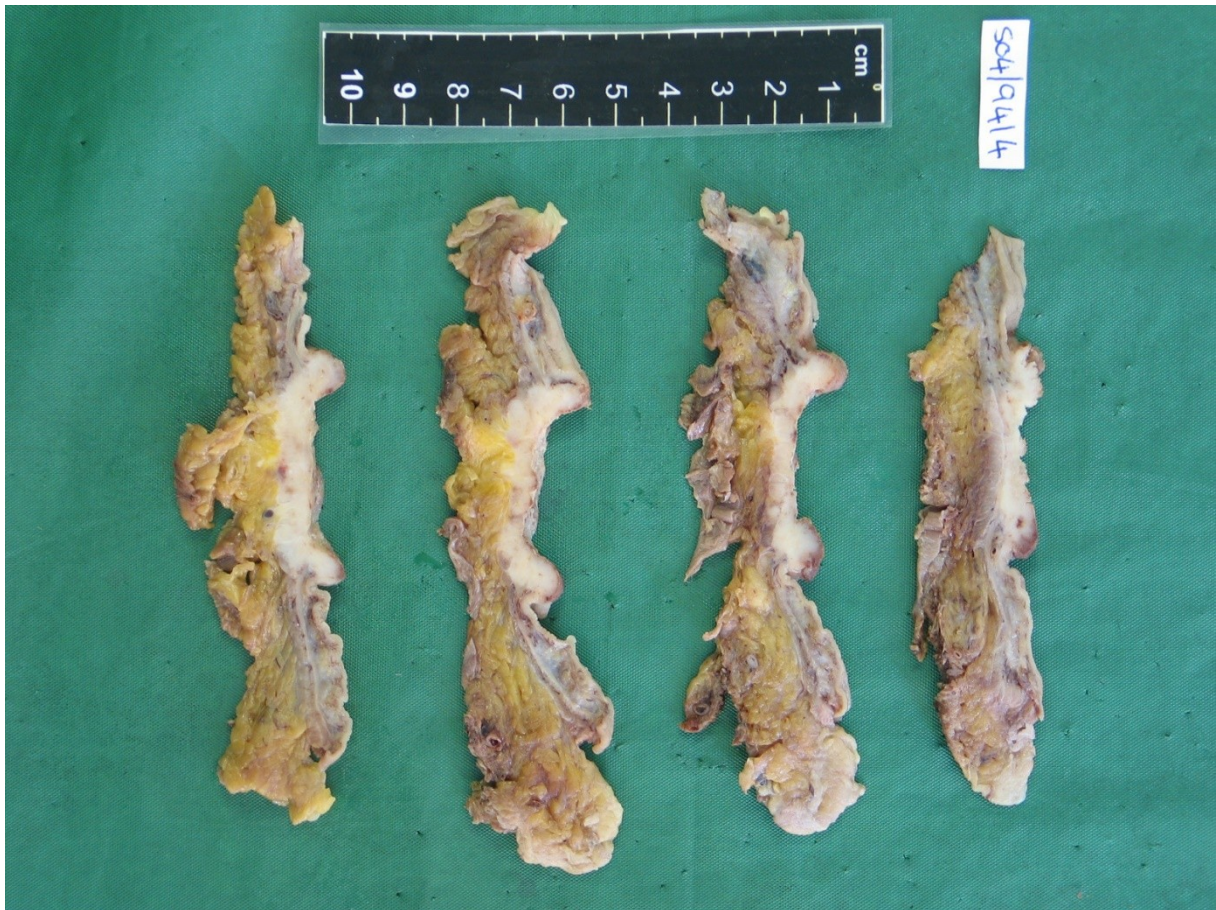


Abbildung 2: Makroskopische Darstellung eines Kolonkarzinoms. Das Ausmaß der Infiltration entspricht hier einem T3-Stadium (Quelle: Prof. Dr. Günther, Pathologie MVZ Lademannbogen).

Seit der 7. Auflage des UICC-Stagingsystems (2010) werden beim Kolonkarzinom im Stadium II drei Substadien, IIA (T3N0), IIB (T4aN0) und IIC (T4bN0), unterschieden. Derzeit erfolgt die Einteilung nach der 8. Auflage des UICC-Stagingsystems. Für das Kolonkarzinom im Stadium II ergab sich dabei keine Veränderung gegenüber der Voraufgabe (Wittekind 2017). Therapeutisch hat die Unterteilung in das Stadium IIB oder IIC keine Relevanz, da sich die aktuellen deutschen Empfehlungen in Bezug auf das Stadium IIB und IIC nicht unterscheiden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Die UICC-Stadien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Stadieneinteilung Kolonkarzinom nach UICC 8. Auflage (Wittekind 2017).

UICC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
Stadium 0	Tis	NO	M0
Stadium I	T1, T2	NO	M0
Stadium II	T3, T4	NO	M0
Stadium IIA	T3	NO	M0
Stadium IIB	T4a	NO	M0
Stadium IIC	T4b	NO	M0
Stadium III	Jedes T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
Stadium IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

Mehrere Faktoren sind beim Kolonkarzinom im Stadium II als prognostisch ungünstig identifiziert worden. Hierzu zählen T4- und High-Grade-Tumoren sowie eine Tumorperforation oder eine unter Notfallbedingungen durchgeführte Resektion. Auch Tumoren, bei denen weniger als 12 Lymphknoten histopathologisch untersucht wurden, haben eine schlechtere Prognose (André et al. 2009; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Allerdings kann trotz der Identifikation dieser Risikofaktoren die Prognose beim Kolonkarzinom im Stadium II nicht präzise vorhergesagt werden (Labianca et al. 2013).

Bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium II gibt es, im Gegensatz zu den Stadien I und III, keinen eindeutigen Behandlungsalgorithmus bezüglich einer adjuvanten Therapie. Während Patienten durch eine alleinige operative Resektion im Stadium I adäquat therapiert sind, wird bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium III seit 1990 eine adjuvante Chemotherapie empfohlen (NIH consensus conference 1990).

Für Tumoren im Stadium III konnte in zahlreichen Studien der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie nachgewiesen werden. Die routinemäßige Gabe einer adjuvanten Chemotherapie ist in der klinischen Praxis seit vielen Jahren etabliert (André et al. 2004; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Dies unterscheidet sich von der Situation beim Kolonkarzinom im Stadium II, wo die Datenlage bezüglich eines Nutzens einer adjuvanten Chemotherapie nicht eindeutig belegt werden konnte. In einer Vielzahl von Studien konnte kein signifikanter Überlebensvorteil durch eine postoperative adjuvante Chemotherapie gezeigt werden (O'Connor et al. 2011; Benson et al. 2004; Mamounas et al. 1999). Der Nutzen einer adjuvanten Therapie im UICC Stadium II kann allerdings nicht

gänzlich ausgeschlossen werden und liegt bei ca. 3 % im 5-Jahres-Gesamtüberleben (QUASAR Collaborative 2007). Die Empfehlung der deutschen Leitlinien lautet deswegen, dass bei Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im Stadium II eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden kann (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Diese Empfehlung gilt unabhängig davon, ob Risikofaktoren vorliegen, da auch bei Vorliegen von Risikofaktoren kein signifikanter Nutzen einer adjuvanten Therapie nachgewiesen werden konnte (André et al. 2015).

Zusammenfassend ist beim Kolonkarzinom im Stadium II weder die Prognose adäquat einzuschätzen, noch ist ein überzeugend wirksames adjuvantes Therapiekonzept vorhanden.

3.3 Prognostische Faktoren beim Kolonkarzinom im Stadium II

3.3.1 Klinisch-pathologische Faktoren

Das Tumorstaging und damit die Festlegung der anatomischen Ausdehnung mittels TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung in UICC-Stadien, hat bei der Prognoseabschätzung und bei der weiteren Therapieentscheidung nach wie vor eine Schlüsselrolle. Es ist das wichtigste Instrument zur Prognoseabschätzung und entscheidend für die Festlegung des Therapieprozederes. Das T-Stadium ist beim Kolonkarzinom im Stadium II, innerhalb der TNM-Klassifikation, der entscheidende Faktor, da sich in diesem Stadium definitionsgemäß weder eine Lymphknotenmetastasierung noch eine Fernmetastasierung nachweisen lässt. Die Studienlage bezüglich des Einflusses des T-Stadiums auf die Prognose fällt jedoch nicht eindeutig aus. Mehrere Metaanalysen konnten aber zeigen, dass T4-Tumoren im Vergleich zu T3-Tumoren eine schlechtere Prognose haben (Gill et al. 2004; Böckelman et al. 2015).

Die Anzahl der histopathologisch untersuchten Lymphknoten gilt beim Kolonkarzinom als stadienunabhängiger Risikofaktor. Trotz uneinheitlicher Studienlage hinsichtlich der genauen Anzahl der zu untersuchenden Lymphknoten, müssen für ein adäquates Staging mindestens 12 Lymphknoten untersucht werden (Wittekind 2017; Nagtegaal 2019).

Eine unter Notfallbedingungen durchgeführte Operation wurde als weiterer Risikofaktor für eine schlechte Prognose identifiziert (Jestin et al. 2005; McArdle et al. 2006). Patienten, die im Rahmen einer Tumorperforation, eines Tumoreinrisses oder eines Ileus operiert wurden, haben ein schlechteres tumorspezifisches Langzeitüberleben als elektiv operierte Patienten (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Das TNM-Stadium, die Anzahl untersuchter Lymphknoten und eine Operation unter Notfallbedingungen sollen nach deutschen Leitlinienempfehlungen bei der Entscheidung zur adjuvanten Therapie berücksichtigt werden. Weitere klinisch-pathologische Risikofaktoren für eine schlechte Prognose wurden identifiziert,

diese sollen allerdings keinen Einfluss auf die Entscheidung zur adjuvanten Therapie haben (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Die Graduierung gehört zu den typischen Merkmalen, die in der histopathologischen Diagnostik Berücksichtigung finden. Die Studienlage bezüglich des prognostischen Wertes des Gradings in Bezug auf das kolorektale Karzinom ist nicht eindeutig. Grundsätzlich wurde der Differenzierungsgrad als stadienunabhängiger prognostischer Faktor eingestuft (Compton 1999). Beim Kolonkarzinom spiegeln die gängigen morphologisch definierten Graduierungskriterien die Prognose aber nicht korrekt wider. Laut deutscher S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom hat das Grading keinen pauschalen Einfluss auf die Indikation für eine adjuvante Therapie beim Kolonkarzinom im Stadium II (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Tabelle 3: Grading kolorektaler Adenokarzinome (Wittekind 2017).

Differenzierungsgrad	Glanduläre Strukturen (%)
G1 - gut differenziert	>95
G2 - mittelhoch differenziert	50-95
G3 – schlecht bzw. gering differenziert	5-50
G4 - undifferenziert	<5
Low grade (G1 und G2)	>50
High grade (G3 und G4)	<50

Die Invasion von Tumorzellen in Venen oder Lymphgefäßen spielt eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess maligner Tumoren. Auch die perineurale Invasion (PNI) stellt eine Möglichkeit zur Metastasierung und lokalen Ausbreitung des Malignoms dar (Liebig et al. 2009). Der prognostische Wert der Angio- und Perineuralinvasion beim Kolonkarzinom im Stadium II konnte wiederholt nachgewiesen werden (Skancke et al. 2019; Mirkin et al. 2017) Die Bestimmung der Angioinvasion und PNI als Prognosefaktor leidet aber unter einem hohen Grad an Subjektivität und einer fehlenden Standardisierung (van Wyk et al. 2017).

Zudem wird die Tumorlokalisierung als möglicher prognostischer Faktor diskutiert. Die Ergebnisse einiger Studien konnten zeigen, dass die Tumorlokalisierung prognostisch bedeutsam ist. Rechtsseitige Tumoren waren stadienübergreifend mit einem schlechteren 5-Jahres-Gesamtüberleben assoziiert (Petrelli et al. 2017). Insbesondere in den frühen Stadien des Kolonkarzinoms sind die Ergebnisse bezüglich des prognostischen Wertes der Tumorlokalisierung aber widersprüchlich (Hanna und Lenz 2020).

3.3.2 Molekulare Marker

Neben den oben genannten klinisch-pathologischen Risikofaktoren spielen molekulare Marker bei der Prognoseabschätzung und Prädiktion eine zunehmend wichtige Rolle. Trotz eines identischen Tumorstadiums und einer oft ähnlichen

Histologie haben die Tumoren ein unterschiedliches molekulares Profil, welches die Variation der Prognose und des Therapieansprechens erklären könnte. Um eine bessere Prognoseabschätzung, eine zielgerichtete Therapie sowie eine entsprechende Risikoeinschätzung bezüglich des Karzinomrisikos zu ermöglichen, kommt der Bestimmung von molekularen Markern eine zunehmend wichtige Bedeutung zu. Durch eine entsprechende molekularpathologische Charakterisierung der Erkrankung, könnte in Zukunft eine differenzierte prognostischen Einschätzung erfolgen. Zudem könnte durch die Gewinnung prädiktiver Informationen in Zukunft eine differenziertere Therapieauswahl getroffen werden.

Derzeit hat nur der MSI/MRR-Status in Bezug auf das Kolonkarzinom im Stadium II eine Bedeutung für weitere Therapieentscheidungen. Bei Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Status soll beim Kolonkarzinom im Stadium II von einer adjuvanten Therapie abgesehen werden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Weitere molekulare Marker könnten beim Kolonkarzinom im Stadium II eine prognostische Bedeutung haben. Hierzu gehören der CDX2-Status, die BRAF- und Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene-(KRAS)-Genmutation sowie genetische Paneluntersuchungen. Diese Faktoren haben aber derzeit keinen Einfluss auf die Gabe einer adjuvanten Therapie beim Kolonkarzinom im Stadium II (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Die BRAF- und KRAS-Gene sind Protoonkogene, welche für Proteine codieren, die in der Signaltransduktionskaskade des Epidermal Growth Faktor Rezeptors (EGFR) eine wichtige Rolle spielen.

Die Mutation des BRAF-Genes ist beim metastasierten kolorektales Karzinom ein wichtiger prädiktiver Faktor, um ein fehlendes Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie mit monoklonalen Antikörpern vorherzusagen (Pietrantonio et al. 2015). Zudem spielt die BRAF-Bestimmung bei der Diagnostik des Lynch Syndrom eine wichtige Rolle (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Auch der KRAS-Mutationsstatus hat aktuell nur beim metastasierten kolorektales Karzinom eine Bedeutung. Er soll das Ansprechen auf eine Anti-EGFR-Therapie bei Patienten mit metastasierten kolorektales Karzinomen prüfen (Benvenuti et al. 2007; Douillard et al. 2013). Insgesamt kommt der BRAF- und der KRAS-Mutation beim Kolonkarzinom im Stadium II nach aktuellem Kenntnisstand keine therapieentscheidende prädiktive oder prognostische Bedeutung zu (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Eine weitere Möglichkeit der Prognoseabschätzung besteht darin, das genetische Material kolorektales Karzinome mit Paneluntersuchungen auf bestimmte Abweichungen und Muster zu untersuchen. Auf diese Weise kann die Expression von 7 bis 634 Genen gleichzeitig untersucht werden (Cuyle und Prenen 2017). Bisher konnten mit den genetischen Paneluntersuchungen retrospektiv prognostische Gruppen gebildet werden. Trotz vielversprechender Ergebnisse, wird bisher keines dieser Verfahren für die Entscheidungsfindung beim Kolonkarzinom im Stadium II eingesetzt (Dalerba et al. 2016; Puccini et al. 2017).

3.4 Caudaltype-Homebox-Transcription-Factor 2 (CDX2)

Wie oben bereits erwähnt, gilt der negative CDX2-Status als möglicher negativer Prognosefaktor beim Kolonkarzinom im Stadium II.

CDX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Regulationsprotein in der embryonalen Darmentwicklung und Darmdifferenzierung eine zentrale Rolle spielt (Beck und Stringer 2010). Das codierende CDX2-Gen gehört zur Familie der Caudal-Related-Homebox-Gene (Olsen et al. 2014). Homebox-Gene sind bei malignen Tumorerkrankungen häufig dereguliert und spielen gleichzeitig eine Rolle als Onko- und Tumorsuppressorgene (Tomasello et al. 2018).

Im entwickelten Darm spielt CDX2 im Verlauf des Lebens bezüglich der Organhomöostase eine wichtige Rolle und wirkt zusätzlich einer Karzinogenese entgegen. Im Rahmen der Karzinogenese kommt es zu Änderungen der Genexpression und Genaktivität von CDX2 (Guo et al. 2004). Der Verlust der CDX2-Expression trägt zur Malignomentstehung bei, indem eine erhöhte Zellmigration und maligne Transformation in Gang gesetzt werden. Zudem hat der Transkriptionsfaktor CDX2 Einfluss auf wichtige regulatorische Gene, mit Auswirkungen auf den Zellzyklus, Apoptose und Zelladhäsion (Olsen et al. 2014).

Wenn CDX2 in einem Kolonkarzinom ausgefallen ist, geht dies häufig mit aggressiven Tumoreigenschaften, wie einem schlechten Differenzierungsgrad, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Invasion von Blutgefäßen, BRAF-Mutation und einem CpG island methylator phenotype (CIMP) einher (Baba et al. 2009; Olsen et al. 2014; Bae et al. 2015).

Die Bestimmung des CDX2-Status findet seit vielen Jahren vor allem in der diagnostischen Pathologie Anwendung. Der CDX2-Status wird als molekularer Marker für die Identifikation von Gewebe mit kolorektalem Ursprung, u.a. bei der CUP-Syndrom- (cancer of unknown primary)- Diagnostik verwendet (Tomasello et al. 2018; Li und Folpe 2004). In mindestens 90 % der Fälle zeigt sich bei Karzinomen mit kolorektalem Ursprung eine positive nukleäre Expression von CDX2 (Barbareschi et al. 2003).

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften wird die Expression von CDX2 aktuell als unabhängiger Prognosefaktor beim kolorektalen Karzinom diskutiert. Durch eine 2016 veröffentlichte Studie von Dalerba et al. ist der CDX2-Status als unabhängiger Prognosefaktor in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. In einer retrospektiven Analyse von zwei unabhängigen Stichproben konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem negativen CDX2-Status eine deutlich schlechtere Prognose bezüglich der Endpunkte 5-Jahres-Gesamt- und 5-Jahres-krankheitsfreies-Überleben hatten. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass Patienten mit einem negativen CDX2-Status auch im Stadium II einen größeren Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie haben (Dalerba et al. 2016).

Die immunhistochemische Untersuchung der CDX2-Expression könnte technisch und wirtschaftlich ein relativ einfaches und kostengünstiges Verfahren darstellen,

um einen prognostischen Faktor zu untersuchen, welcher beim Kolonkarzinom im Stadium II eine schlechtere Prognose anzeigt und zusätzlich zur Entscheidungsfindung für eine adjuvante Chemotherapie beiträgt. Die Studienlage ist diesbezüglich allerdings nicht eindeutig, insbesondere wenn zusätzlich der MSS/MMR-Status Berücksichtigung findet (Slik et al. 2019; Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018).

3.5 Der MSI/MMR-Status

Die Bestimmung des Status der Mikrosatelliteninstabilität bzw. die immunhistochemische Bestimmung des Mismatch-Repair-Protein-Status hat in der Tumorpathologie aktuell ein sehr breites Indikationsspektrum und eine zunehmende klinisch-therapeutische Relevanz. Dies betrifft v.a. das Kolorektal-, das Magen- und das Endometriumkarzinom. Seit mehr als zwei Jahrzehnten hat die Bestimmung vom MSI/MMR-Status beim Screening auf das Lynch-Syndrom klinische Bedeutung (Dietmaier et al. 2019).

Eine Mikrosatelliteninstabilität, die auf einen Defekt eines oder mehrerer MMR-Proteine zurückzuführen ist, liegt bei etwa 15 % der kolorektalen Karzinome vor (Guastadisegni et al. 2010). Zu einem Ausfall der MMR-Proteine kommt es am häufigsten durch ein epigenetisches ‚Silencing‘ der MutL-homolog-1 - (MLH1) - Promotorregion. Dies erfolgt durch eine Hypermethylierung im Bereich des MLH1-Genes. Die anschließende Heterodimerbildung von MLH1 und PMS2 (Postmeiotic-Segregation-Increased 2) führt häufig zu einem kombinierten Ausfall dieser beiden MMR-Proteine. Punktmutationen im Bereich der MMR-Gene sind seltener für einen MSI-H/MMRD-Status verantwortlich (Umar et al. 2004). In ca. 2-3 % der Fälle ist eine Keimbahnmutation im Bereich der MMR-Gene für das Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Status verantwortlich. Dann liegt ein autosomal dominant vererbtes Lynch-Syndrom vor (Boland et al. 2008; Zagrapan und Offner 2020).

Das Mismatch-Repair-System besteht aus den vier MMR-Proteinen MLH1, MSH2 (MutS homolog 2), MSH6 (MutS homolog 6) und PMS2. Kommt es zu einem Defekt der MMR-Proteine resultiert daraus eine Mikrosatelliteninstabilität.

Mikrosatelliten sind sich wiederholende DNA – (Desoxyribonukleinsäure) - Sequenzen, welche normalerweise in allen somatischen Zellen konstant sind. Diese DNA-Sequenzen sind anfällig für Replikationsfehler. Wenn die MMR-Proteine ihre regelrechte Funktion einbüßen, kommt es durch eine um das 10-100-fach gesteigerte Mutationsrate zu Fehlern bei der DNA-Replikation und es resultiert eine Mikrosatelliteninstabilität. Veränderungen der Länge der Mikrosatelliten führen zu Frame-Shift-Mutationen bzw. Punktmutationen und dadurch zu einer genomischen Instabilität. Dies wiederum fördert die Tumorentstehung, das Tumorstadium und die Tumordissemination (Cancer Genome Atlas Network 2012).

Das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität kann indirekt durch die Immunhistochemie der MMR-Proteine oder direkt mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) bzw. Next-Generation-Sequencing untersucht werden. Die immunhistochemische Diagnostik der MMR-Proteine stellt einen zuverlässigen (Sensitivität 92,3 % und Spezifität 100 %) indirekten Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität dar (Parc et al. 2004; Lindor et al. 2002). Wenn die Expression eines oder mehrere MMR-Proteine mittels Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden kann, wird dies als MSI-H/MMRD-Status bezeichnet.

Der Ausfall der MMR-Proteine wurde bezüglich der prognostischen und prädiktiven Wertigkeit beim Kolonkarzinom im Stadium II umfangreich untersucht. Der positive prognostische Wert des MSI-H/MMRD-Status auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben konnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden (Koenig et al. 2018; Böckelman et al. 2015; Klingbiel et al. 2015; Sargent et al. 2010). Zusätzlich ist der MSI-H/MMRD-Status ein negativer prädiktiver Marker. Die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie wird bei Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Status beim Kolonkarzinom im Stadium II nicht empfohlen, da hierdurch keine Verbesserung des 5-Jahres-Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte (Böckelman et al. 2015; Ribic et al. 2003; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom).

Gegensätzlich hierzu zeigt der MSI-H/MMRD-Status beim metastasierten Kolonkarzinom (Stadium IV) eine schlechte Prognose an (Venderbosch et al. 2014). Zusätzlich profitieren Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen und einem MSI-H/MMRD-Status von einer Therapie mit dem PD-1-Immunmodulator Pembrolizumab (André et al. 2020).

Zusammenfassend liegt der MSI-H/MMRD-Status bei etwa 15 % der kolorektalen Karzinome vor, geht beim Kolonkarzinom im Stadium II mit einer besseren Prognose einher und kann mit immunhistochemischen Methoden zuverlässig nachgewiesen werden.

4 Patienten, Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden für den Zeitraum von März 2007 bis September 2013, an einem Kolonkarzinom im Stadium II, operierte Patienten aus dem Diakonieklinikum Hamburg und dem Israelitischen Krankenhaus Hamburg, als potentielle Studienpatienten, identifiziert. Bei diesen Patienten erfolgte eine kurativ intendierte operative Entfernung eines Primärtumors im Bereich des Kolons. Alle durch die histopathologische Untersuchung als R0 reseziert und als Stadium II klassifizierte Patienten wurden in diese Studie eingeschlossen.

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war eine dreimalig dokumentierte Nachsorgeuntersuchung. Gleichzeitig war Tod oder Auftreten von einem Rezidiv ein Einschlusskriterium.

Ausschlusskriterien waren die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie (n=3), die histopathologische Untersuchung von weniger als 12 Lymphknoten (n =1). Weiterhin erfolgte der Ausschluss von Patienten, die im Zeitraum von 6 Monaten nach der Tumoroperation verstorben waren (n=1). Zudem erfolgte der Ausschluss von 5 weiteren Patienten aufgrund von einer unvollständigen klinischen oder pathologischen Datenlage. Die Auswahl des Patientenkollektivs wird in Abbildung 3 dargestellt.

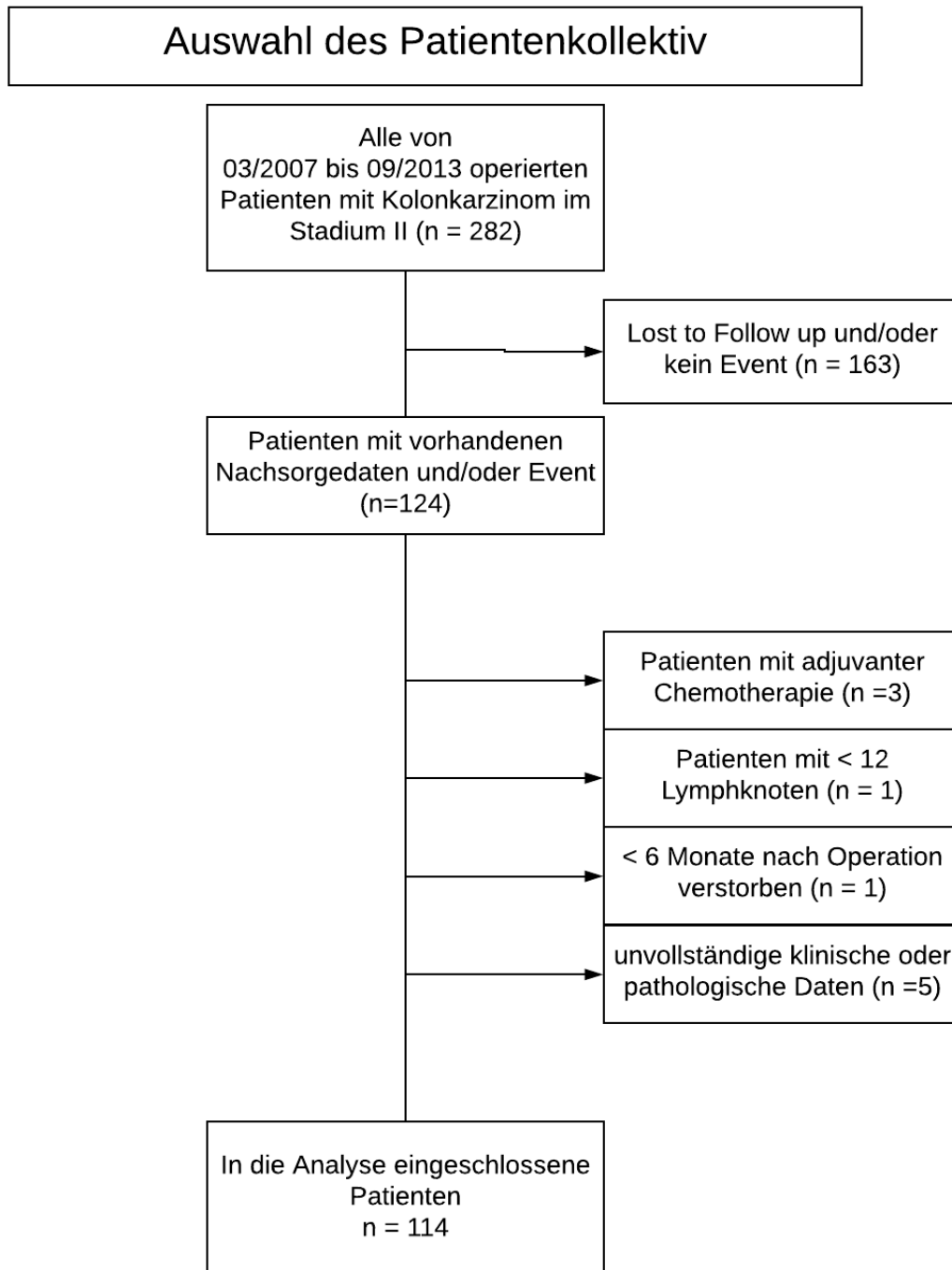


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Darstellung des Auswahlprozesses der Stichprobe von n = 114 Patienten, die in die Analyse eingeschlossen wurden.

Das Patientenkollektiv umfasste nur elektiv geplante Tumorresektionen. Das vorliegende Patientenkollektiv schließt somit keine Fälle mit ein, bei denen Notfalloperationen aufgrund von Tumorperforation oder aufgrund eines Ileus erfolgten. Alle Patienten hatten vor Einschluss in diese Studie der wissenschaftlichen Untersuchung des Tumorgewebes schriftlich zugestimmt. Es liegt ein Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg für die Verwendung der klinischen und pathologischen Parameter vor (Studennummer PV 5035).

4.2 Untersuchungsmaterial

Zunächst wurde ein geeigneter Tumorabschnitt des jeweiligen Kolonkarzinoms anhand eines Hämatoxylin-Eosin - (HE) - Schnittes in Zusammenarbeit mit einem erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. Schröder, Pathologie MVZ Lademannbogen) identifiziert. Wesentliche Selektionskriterien waren das Vorhandensein von nicht-tumoröser Schleimhaut und von vitalem Tumorgewebe. Zum einen sollte so gewährleistet sein, dass das im Tumorrand befindliche vitale Tumorgewebe für die Analyse vorhanden ist. Zum anderen stellt das angrenzende Normalgewebe die interne Positivkontrolle für die Immunhistochemie dar. In Abbildung 4 wird exemplarisch ein repräsentatives Tumorpräparat dargestellt.

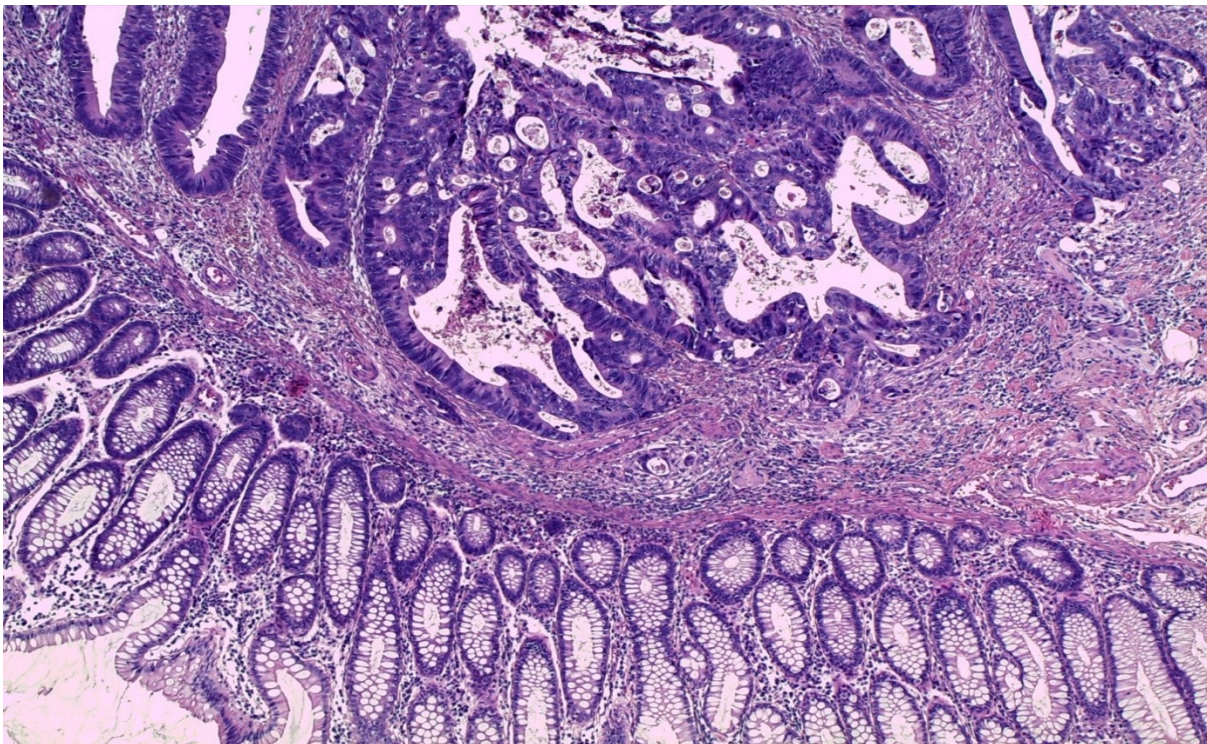


Abbildung 4: Beispiel für ein repräsentatives Tumorpräparat (HE-Färbung). Neben vitalem Tumorgewebe im Bereich des Tumorrandes zeigt sich ein Abschnitt mit intakter Schleimhaut. Die unauffällige Schleimhaut dient im Rahmen der Auswertung der Immunhistochemie als interne Positivkontrolle. 50-fache Vergrößerung.

4.3 Anfertigung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete- (FFPE) -Tumorsektionspräparate aus dem Archiv der Pathologie MVZ Lademannbogen.

Es erfolgte der Zuschnitt des jeweiligen Paraffinblockes auf 1-4 µm Schnitte. Die Schnitte für die Immunhistochemie wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Haftobjektträger aufgezogen.

Anschließend erfolgte das Paraffinabschmelzen im Schnellrockner über 40 Minuten bei 80°C. Nachfolgend wurde die Entparaffinierung mit Xylol (Einwirkzeit 10 Minuten) und Überführung in wässriges Milieu durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % - 95 % - 80 %) mit einer Einwirkzeit von jeweils einer Minute durchgeführt.

4.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter Verwendung von Standardverfahren durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung der MMR-Proteine und CDX2 erfolgte mit einem vollautomatisiertem Färbesystem (Ventana BenchMark XT/Roche). Hierbei handelt es sich um ein geschlossenes System, in dem alle Schritte von der Entparaffinierung bis zur Gegenfärbung innerhalb des Gerätes automatisch durchgeführt werden.

Für die Immunfärbung wurde das „UltraView Universal DAB Detection Kit“ verwendet. Dieses umfasst alle hierfür benötigten Substanzen (Diaminobenzidin - (DAB) - Inhibitor, Horseradish-Peroxidase – (HRP) -Multimer, DAB-Chromogen, DAB-Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Copper).

Im Folgenden werden die verwendeten Protokolle zur immunhistochemischen Färbung der MMR-Proteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) und von CDX2 in verkürzter Form dargestellt:

-zweiphasige Entparaffinierung mit 75 °C und 76 °C für jeweils 4 Minuten unter Verwendung von EZ Prep-Lösung (Ventana, Roche)

-hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Zellkonditionierungslösung (Cell Conditioner Nr. 1, Ventana, Roche) für 8 Minuten bei 95 °C

- 30 Minuten „Mild Conditioning“ mit Zellkonditionierungslösung (Cell Nr. 1, Ventana, Roche) inklusive 4 Minuten bei 100 °C

-bei MSH6- und PMS2-Färbung zusätzlich 60 Minuten „Standard Conditioning“ mit Zellkonditionierungslösung (Cell Conditioner Nr. 1, Ventana, Roche)

-Auftragen von 1 Tropfen UV-DAB-Inhibitor (UltraView Universal DAB Detection Kit, Ventana, Roche) zur Hemmung der endogenen Peroxidasen

- Auftragen von jeweils 100µl (1 Tropfen) Primärantikörper. Tabelle 4 zeigt die Details des jeweils verwendeten Antikörper-Klon, des Herstellers und der verwendeten Inkubationszeiten

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Antikörper, Menge pro Präparat und Inkubationszeiten für die Immunhistochemie der MMR-Proteine.

Antikörper	Antikörper-Klon	Hersteller	Menge (µl)	Zeit (Minuten)
MLH1-Antikörper	M1	Ventana Roche	1 Tropfen = 100µl	32
MSH2-Antikörper	G219-1129	Ventana Roche	1 Tropfen = 100µl	32
MSH6-Antikörper	SP93	Ventana Roche	1 Tropfen = 100µl	16
PMS2-Antikörper	A16-4	Ventana Roche	1 Tropfen = 100µl	60
CDX2-Antikörper	EPR 2764 Y	Ventana Roche	1 Tropfen = 100µl	32

-bei PMS2-Färbung zusätzlich verstärkender Einsatz von Amplifier A und B (Ventana, Roche)

-Auftragen von 1 Tropfen UV HRP UNIV MULT (UltraView Universal DAB Detection Kit), welches die Sekundärantikörper beinhaltet

-Auftragen von 1 Tropfen UV DAB und 1 Tropfen UV DAB H2O2 (UltraView Universal DAB Detection Kit) und anschließend Auftragen von 1 Tropfen UV COPPER (UltraView Universal DAB Detection Kit)

-Auftragen von 1 Tropfen Hämatoxylin zur Gegenfärbung

-Auftragen von 1 Tropfen Bluing Reagent

4.5 Auswertung der Immunhistochemie

4.5.1 Methodik der Bestimmung des CDX2-Status

Bei der Methodik der Bestimmung des CDX2-Status, in Bezug auf die prognostische Wertigkeit beim Kolonkarzinom, gibt es bisher keine festgelegten Standards. In dieser Arbeit wurden vollständige Schnitte der Kolonkarzinome ausgewertet.

Die Auswahl des Tumorabschnittes erfolgte so, dass eine interne Positivkontrolle eingeschlossen wurde. Hierzu dienen die Zellkerne der intakten Mukosa, da in diesem Bereich die gesuchten Marker regelrecht exprimiert werden und

immunhistologisch dargestellt werden können. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass es sich nicht um ein technisches Problem im Rahmen des immunhistochemischen Färbeprozesses handelte.

Zur Bestimmung des CDX2-Status wurde ein Tumorabschnitt mit vitalem Tumorgewebe in der Nachbarschaft der internen Positivkontrolle gewählt. Auf eine Bewertung im Bereich von Nekrosezonen des Tumors wurde in der Analyse bewusst verzichtet, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

Eine Tumorzelle wurde nur dann als negativ eingestuft, wenn im Vergleich zu den Zellkernen der internen Positivkontrolle, keinerlei immunhistochemische Reaktion im Bereich des Nukleus der Tumorzelle nachzuweisen war.

Um eine Differenzierung zwischen einem positiven CDX2-Status und einem negativen CDX2-Status zu ermöglichen, wurden eindeutige Kriterien erarbeitet und definiert:

Zunächst wurde eine Analyse durchgeführt, bei der ein negativer CDX2-Status als > 50 % CDX2-negativer Tumorzellen definiert war. Unter diesen Kriterien konnten nur 1,8 % der Tumoren als CDX2-negativ klassifiziert werden. Es erfolgte eine willkürliche Senkung der Threshold auf > 30 % CDX2-negativer Tumorzellen, um einen negativen CDX2-Status zu definieren. Dadurch sollte die hohe Sensitivität des verwendeten Antikörper-Clon (EPR 2764 Y (Ventana)) berücksichtigt werden. Zur Auswertung wurde ein binäres Auswertungssystem gewählt. Ein positiver CDX2-Status lag bei < 30 % CDX2-negative Tumorzellen und ein negativer CDX2-Status bei > 30 % CDX2-negative Tumorzellen vor.

Die Färbeintensität wurde bei der Unterscheidung eines positiven bzw. negativen CDX2-Status nicht berücksichtigt. Somit war der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen einziges Differenzierungskriterium.

4.5.2 Methodik der Bestimmung des MMR-Status

Die Evaluation des MSI/MMR-Status erfolgte nach etablierten Kriterien. Die Auswahl des entsprechenden Tumorabschnittes wurde im letzten Abschnitt bereits erläutert.

Ein MSS/MMRP-Status lag vor, wenn die immunhistochemische Zellkernfärbung bei allen MMR-Proteinen (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) nachweisbar war.

Konnte in mindestens einem Präparat der Immunhistochemie der vier MMR-Proteine (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) im Bereich der Tumorzellen keine immunhistochemische Anfärbung festgestellt werden, wurde der Tumor als MSI-H/MMRD eingestuft.

Eine Voraussetzung dieser Bewertung war allerdings, dass die interne Positivkontrolle im ganzen Präparat validiert werden konnte. War dies nicht der Fall, musste davon ausgegangen werden, dass die immunhistochemische

Färbung fehlerhaft war. In einem solchen Fall wurde das entsprechende Präparat neu gefärbt.

Zur internen Positivkontrolle dienten die Zellkerne der nicht-neoplastischen Kolonschleimhaut. Bei der Immunhistochemie der MMR-Proteine (im Gegensatz zu darmspezifischen CDX2-Immunhistochemie) wurden auch Lymphozyten zur internen Positivkontrolle herangezogen.

Eine Tumorzelle zeigte einen Ausfall des entsprechenden MMR-Proteins an, wenn im Vergleich zu den Zellkernen der internen Positivkontrolle, keine Immunhistochemische Reaktion im Bereich des Nukleus der Tumorzelle nachzuweisen war.

4.5.3 Evaluation der Immunhistochemie

Die Evaluation wurde durch zwei Untersucher (Prof. Dr. Günther, Pathologie MVZ Lademannbogen und C. Seevers, Autor) durchgeführt. In unklaren Fällen wurde durch erneute mikroskopische Observation und anschließende Diskussion ein Konsens erreicht. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte ohne Kenntnis der klinischen Endpunkte der jeweiligen Patienten. Ein Abgleich der klinischen Informationen mit den immunhistochemischen Ergebnissen erfolgte erst im Anschluß an die mikroskopische Diagnostik.

4.6 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung der Daten dieser Studie wurde das Programm „IBM® SPSS® Statistics“ (Version 25, Hersteller: IBM, USA) verwendet. Statistische Vorüberlegungen und Berechnungen wurden in beratender Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf und dem Autor getätigt.

Alle Daten wurden vor der Berechnung auf Vollständigkeit, Plausibilität und systematische Fehler überprüft.

Die Beschreibung der univariaten Daten erfolgte für kategorielle Variablen mittels Anzahl und Prozent und für metrische Variablen durch Angabe von Median und Spannweite. Die Beschreibung der bivariaten Daten erfolgte mittels Kreuztabellen. Zur graphischen Darstellung von Häufigkeiten wurden Balkendiagramme gewählt.

Um den Zusammenhang von molekularen Markern mit pathologischen Parametern zu untersuchen, wurden Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Es wurde vorab ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zudem wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Als Endpunkte wurden das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben festgelegt. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben wurde als Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der Operation und dem Tod, oder einer sonstigen Zensierung, innerhalb

des Nachverfolgungszeitraumes von 5 Jahren definiert. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben wurde als Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der Operation und dem Auftreten eines Rezidivs, oder einer sonstigen Zensierung, innerhalb des Nachverfolgungszeitraumes von 5 Jahren definiert. Patienten, die zum Ende des Nachverfolgungszeitraumes noch unter Beobachtung standen, wurden zensiert.

Zur Beschreibung der Endpunkte wurden Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Anhand der Kaplan-Meier-Kurven wurden die 5-Jahres-Überlebensraten geschätzt. Um Überlebenskurven zweier Stichproben miteinander zu vergleichen, wurde der Log-Rank-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auch hier vorab auf $\alpha = 0.05$ festgelegt.

Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als statistisch signifikant erachtet. Alle statistischen Tests sind als explorativ anzusehen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasst n=114 Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium II. In Tabelle 5 werden die klinischen und pathologischen Charakteristika des Patientenkollektivs beschrieben.

Tabelle 5: Übersicht über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach epidemiologischen, klinischen und pathologischen Charakteristika.

Charakteristikum	gesamt n = 114
Alter bei Diagnosestellung (Jahre) - Median (Spannweite)	70 (33-89)
Geschlecht - Anzahl (%)	
Männlich	63 (55,3 %)
Weiblich	51 (44,7 %)
Tumorlokalisation – Anzahl (%)	
rechtsseitig	63 (55,3 %)
linksseitig	51 (44,7 %)
UICC-Stadium - T-Stadium - Anzahl (%)	
IIA - T3	108 (94,7 %)
IIB - T4a	4 (3,5 %)
IIC – T4b	2 (1,8 %)
Tumorgrade - Anzahl (%)	
G1	1 (0,9 %)
G2	90 (78,9 %)
G3	23 (20,2 %)
G4	0 (0,0 %)
Low-Grade-Tumoren (G1-G2)	91 (79,8 %)
High-Grade-Tumoren (G3-G4)	23 (20,2 %)
Histologie – Anzahl (%)	
Adenokarzinom	93 (81,6 %)
Muzinöses Adenokarzinom	21 (18,4 %)
Untersuchte Lymphknoten (Anzahl) -Median (Spannweite)	24 (12-62)

Zusammenhang zwischen Prognose und TNM-Stadium

Im vorliegenden Patientenkollektiv ergab sich bezüglich des T-Stadiums folgende Verteilung. Bei 108 (94,7 %) der Patienten lag ein T3-Tumor und bei 6 (5,3 %) ein T4-Tumor vor.

In Abbildung 5 und 6 werden das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben abhängig vom T-Stadium dargestellt. Es zeigt sich, dass sich das 5-Jahres-Gesamtüberleben für Patienten mit einem T3-Tumor auf 90 % und für Patienten mit T4-Tumoren auf 83 % berechnet. In Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben ergab sich zwischen den Kaplan-Meier-Kurven von T3- und T4-Tumoren kein signifikanter Unterschied ($p = 0,849$; Log-Rank-Test).

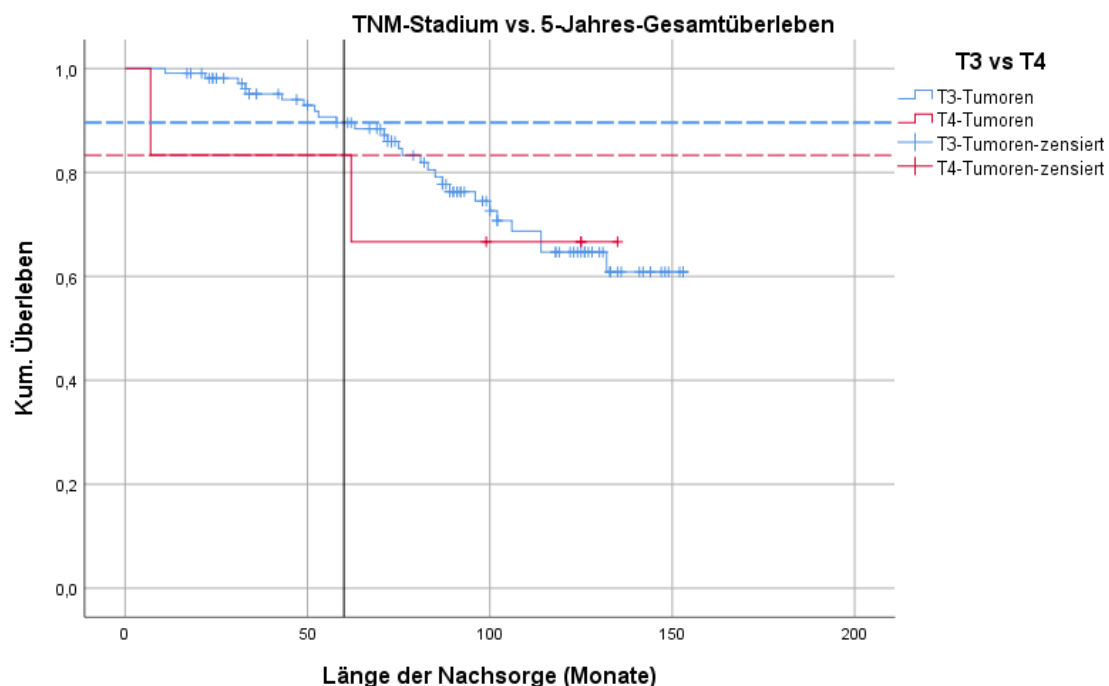


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen lokaler Tumorausdehnung und dem Gesamtüberleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Gesamtüberleben. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben lag für Patienten mit T3 Tumoren bei 90 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit T4-Tumoren ergab sich ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 83% (gestrichelte rote Linie). Der Vergleich der Überlebensverteilungen in Bezug auf das Tumorstadium mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,849$).

Beim 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben zeigte sich, dass Patienten mit einem T3-Tumor in 94 % der Fälle Rezidiv-frei blieben. Patienten mit T4-Tumoren blieben in 100 % der Fälle Rezidiv-frei. Die Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank-Test verglichen. In Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich zwischen

den Kaplan-Meier-Kurven von T3- und T4- Tumoren kein signifikanter Unterschied ($p = 0,579$; Log-Rank-Test).

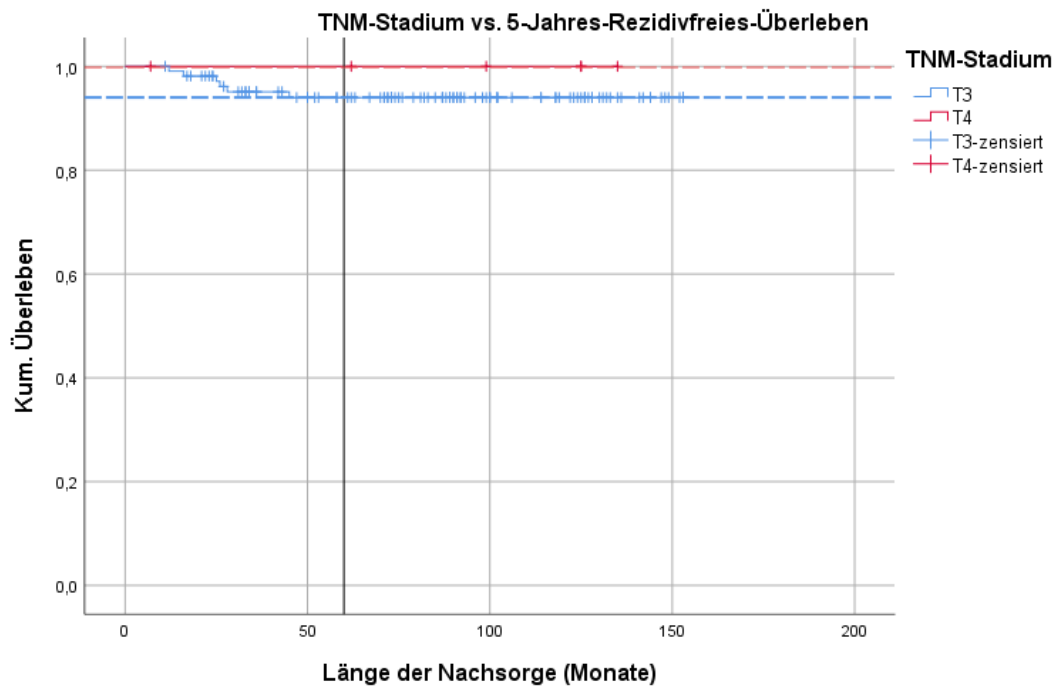


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen lokaler Tumorausdehnung und dem 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben lag für Patienten mit T3 Tumoren bei 94 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit T4-Tumoren ergab sich ein 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben von 100 % (gestrichelte rote Linie). Der Vergleich der Überlebensverteilungen in Bezug auf das Tumorstadium mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,579$).

Zusammenfassend lag bei T4-Tumoren eine schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens und bei T3-Tumoren eine schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben vor. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

5.2 5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben

Die mediane Dauer der Nachsorge der Patienten betrug 88,5 Monate (Spannweite 7-153 Monate). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Verteilungen der betrachteten Endpunkte über den gesamten Nachsorgezeitraum.

Tabelle 6: Endpunkte und Häufigkeit von 5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben während des gesamten Nachsorgezeitraumes.

Gesamtüberleben des vollständigen Nachsorgezeitraumes	
Tod jeglicher Ursache eingetreten	29 (25 %)
Tod jeglicher Ursache nicht eingetreten	85 (75 %)
Rezidivfreies-Überleben des vollständigen Nachsorgezeitraumes	
Rezidiv eingetreten	6 (5,3 %)
Rezidiv nicht eingetreten	108 (94,7 %)

Es erfolgte eine Berechnung der Prognose anhand der Kaplan-Meier-Methode für das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben. Dies wird in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

Hierbei errechnete sich das 5-Jahres-Gesamtüberleben im vorliegenden Patientenkollektiv auf 89 %.

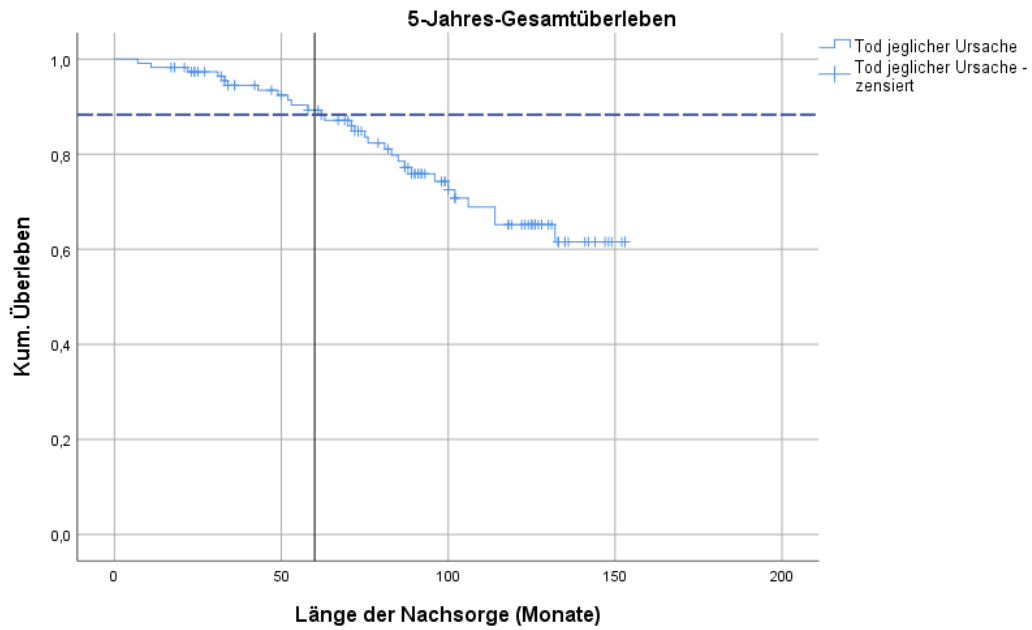


Abbildung 7: 5-Jahres-Gesamtüberleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium II. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben nach 60 Monaten wird auf 89 % berechnet (gestrichelte blaue Linie). Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Gesamtüberleben.

Für das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich, dass 94 % Rezidiv-frei waren.

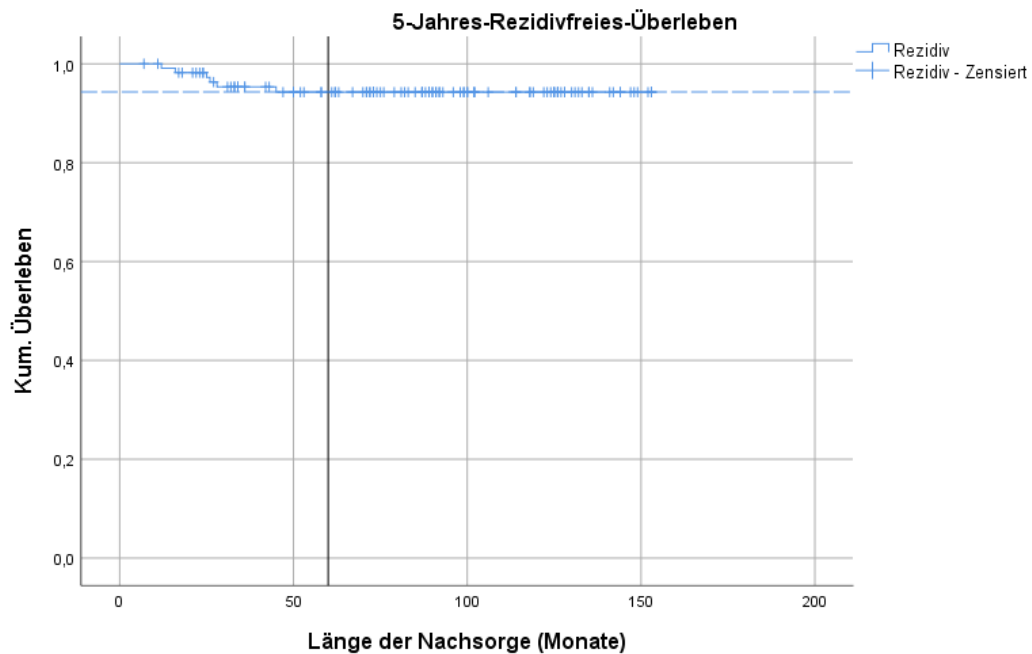


Abbildung 8: 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium II. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben nach 60 Monaten wird auf 94 % berechnet (gestrichelte blaue Linie). Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben.

5.3 Ergebnisse der Untersuchung des CDX2-Status

Es erfolgte eine lichtmikroskopische Diagnostik zur Einteilung der Tumoren in CDX2-negative und CDX2-positive Tumoren anhand der oben beschriebenen Threshold von 30 % CDX2-negativer Tumorzellen.

In der Abbildung 9 ist eine positive Anfärbung mit dem CDX2-Antikörper dargestellt. Alle Tumorareale dieses Schnittes zeigen eine deutliche nukleäre Anfärbung. Zudem sieht man eine positive Anfärbung der unauffälligen Kolonschleimhaut als interne Positivkontrolle. 94,7 % (108/114) der im vorliegenden Kollektiv untersuchten Tumoren zeigte ein entsprechendes Expressionsmuster.

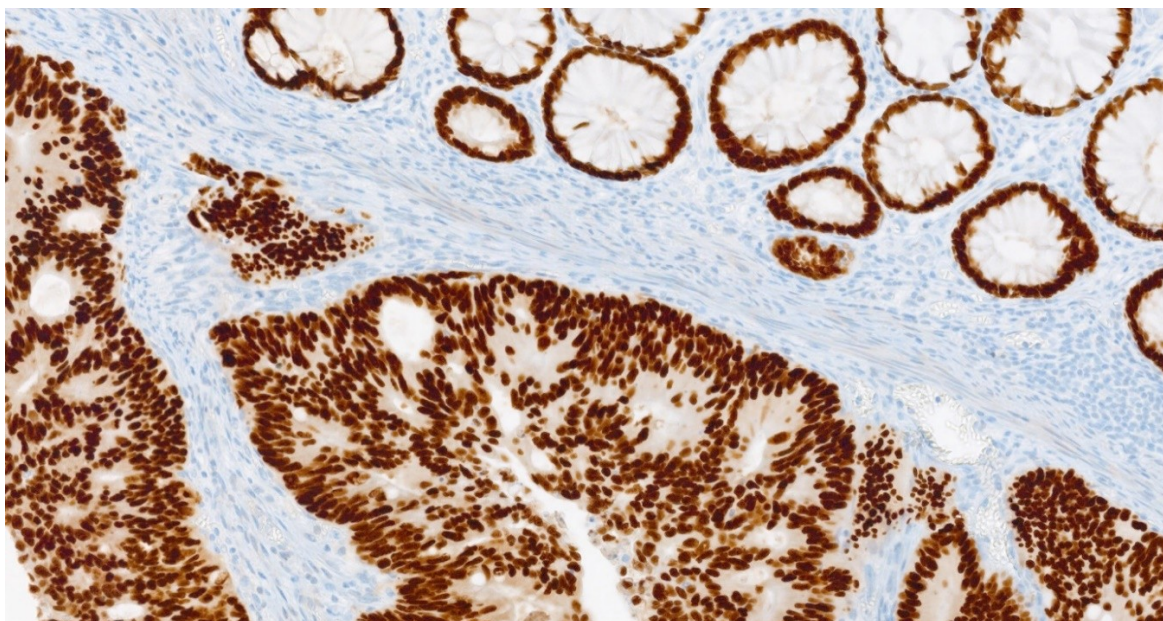


Abbildung 9: Kolonkarzinom nach immunhistochemischer Anfärbung auf CDX2. Die positive homogene Anfärbung der Tumorzellen spricht für eine regelrechte CDX2 Expression. Zusätzlich zeigt sich eine Anfärbung der intakten Kolonschleimhaut als interne Positivkontrolle. Zudem wird in dieser hohen Auflösung die immunhistochemische Anfärbung im Bereich des Zellkerns, als Ort der CDX2, Expression sichtbar. 200-fache Vergrößerung.

Eine heterogene Färbung zeigte sich als diffuse Heterogenität mit > 30 % vollständig CDX2-negativer Tumorzellen. Dieses Expressionsmuster war, nach eindeutig positiven Tumoren, das zweithäufigste Expressionsmuster (3,5 %). In Abbildung 10 ist ein heterogenes Expressionsmuster dargestellt.

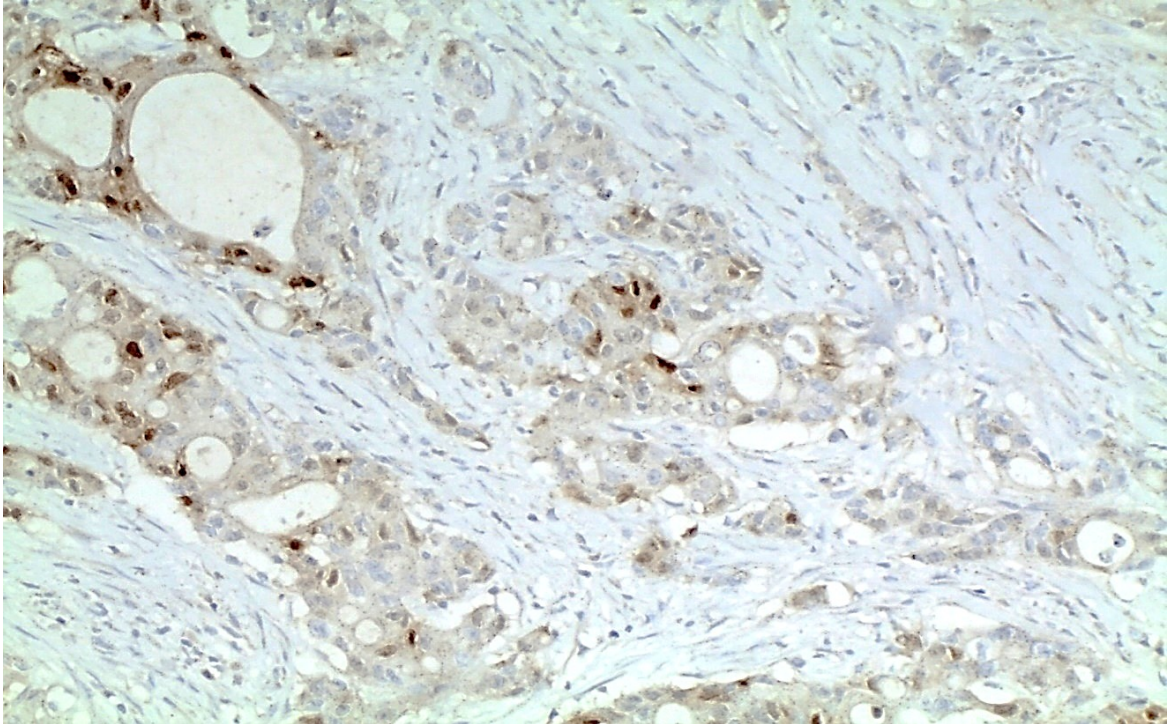


Abbildung 10: Heterogenes Expressionsmuster eines Kolonkarzinoms nach immunohistochemischer Anfärbung auf CDX2. In diesem Tumorabschnitt zeigen sich Zellkerne, in denen eine deutliche CDX2-Anfärbung erfolgt. Daneben zeigen sich jedoch > 30 % Tumorzellen, in denen keine Anfärbung auf CDX2 nachgewiesen werden kann. 200-fache Vergrößerung.

Eine negative Färbung zeigte sich als fehlende nukleare Anfärbung der gesamten, auf dem jeweiligen Objektträger vorhandenen Tumorareale. Dies wird in Abbildung 11 dargestellt. Hier zeigt sich eine vollständig fehlende nukleäre Anfärbung im Bereich des Tumors neben einer deutlich positiv angefärbten internen Kontrolle. Eine Färbung der Stromazellen liegt bei der CDX2 Färbung nicht vor, da diese spezifisch die Darmschleimhaut anfärbt. Eine fehlende CDX-2-Expression lag im hier vorliegenden Patientenkollektiv bei 1,8 % der Tumoren vor.

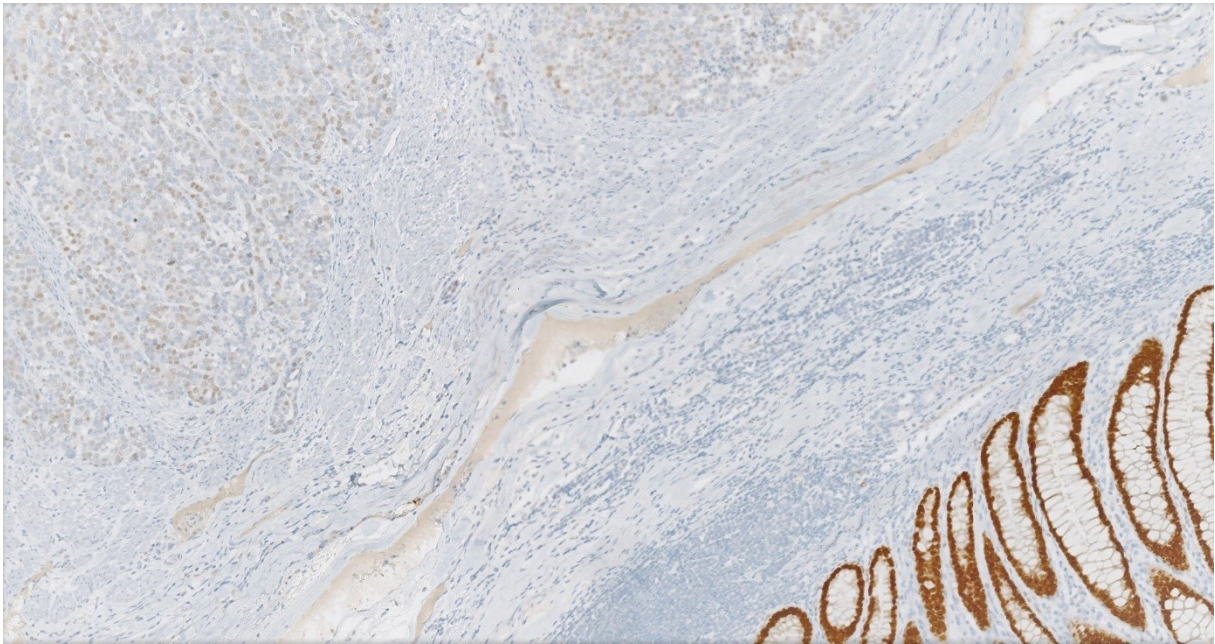


Abbildung 11: Kolonkarzinom nach immunhistochemischer Anfärbung auf CDX2. Die fehlende CDX2-Anfärbung des Kolonkarzinoms in den Tumorzellen spricht für eine ausgefallene CDX2-Expression. Zusätzlich zeigt sich eine Anfärbung der intakten Kolonschleimhaut als interne Positivkontrolle im rechten Bildabschnitt. 50-fache Vergrößerung.

Ergebnisse der Immunhistochemie von CDX2

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden 94,7 % (108/114) der Tumoren als CDX2 positiv und 5,3 % (6/114) der Tumoren als CDX2 negativ bewertet. Tumoren mit einer heterogenen Anfärbung mit > 30 % CDX2-negativen Nuklei der Tumorzellen wurden als CDX2-negativ klassifiziert. Einen Überblick über die Verteilung der Häufigkeiten gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung des CDX2-Status im vorliegenden Patientenkollektiv.

CDX2-Status – Anzahl (%) von n = 114	
CDX2 – fehlende Anfärbung	2 (1,8 %)
CDX2 – heterogen negative Anfärbung	4 (3,5 %)
CDX2 – homogen positive Anfärbung	108 (94,7 %)

5.3.1 Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und morphologischen/molekularen Tumoreigenschaften

Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und dem MSI/MMR-Status

Der Zusammenhang zwischen dem CDX2- und dem MSI-/MMR-Status ist für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung.

Im vorliegenden Patientenkollektiv lag bei 100 % (6/6) der Tumoren mit einem negativen CDX2-Status parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor. Es besteht somit ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status ($p = 0.005$; Chi-Quadrat-Test). Die Vierfeldertafel in Abbildung 12 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

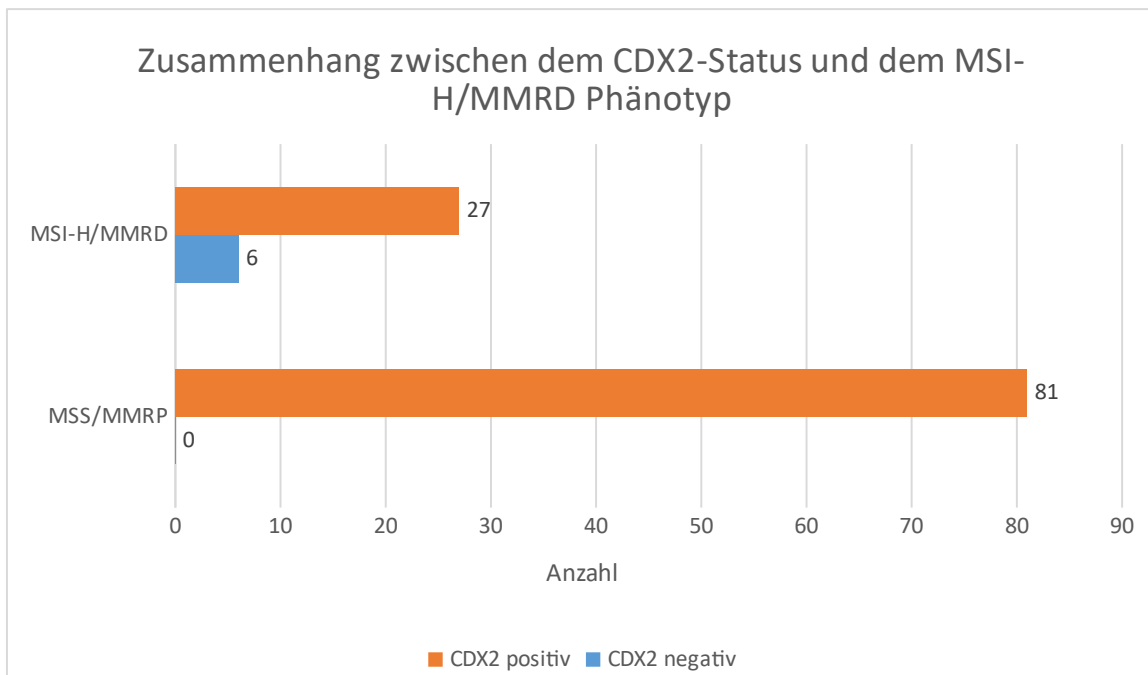


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und dem MSI-H/MMRD Phänotyp im untersuchten Patientenkollektiv ($n = 114$).

Es wurde zudem die Häufigkeit eines negativen CDX2-Status in der Gruppe der Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status berechnet. Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigten 18,2 % (6/33) Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status einen negativen CDX2-Status.

Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und dem Differenzierungsgrad

Im untersuchten Patientenkollektiv lag bei 66,6% (4/6) der CDX2-negativen Tumoren eine geringe Differenzierung (G3) vor. Im Vergleich hierzu lag nur bei 21,4 (19/89) der CDX2-positiven Tumoren eine geringe Differenzierung (G3) vor.

Im vorliegenden Patientenkollektiv besteht somit ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p = 0.004$; Chi-Quadrat-Test) zwischen einem negativen CDX2-Status und dem histologischen Differenzierungsgrad. Die Vierfeldertafel in Abbildung 13 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

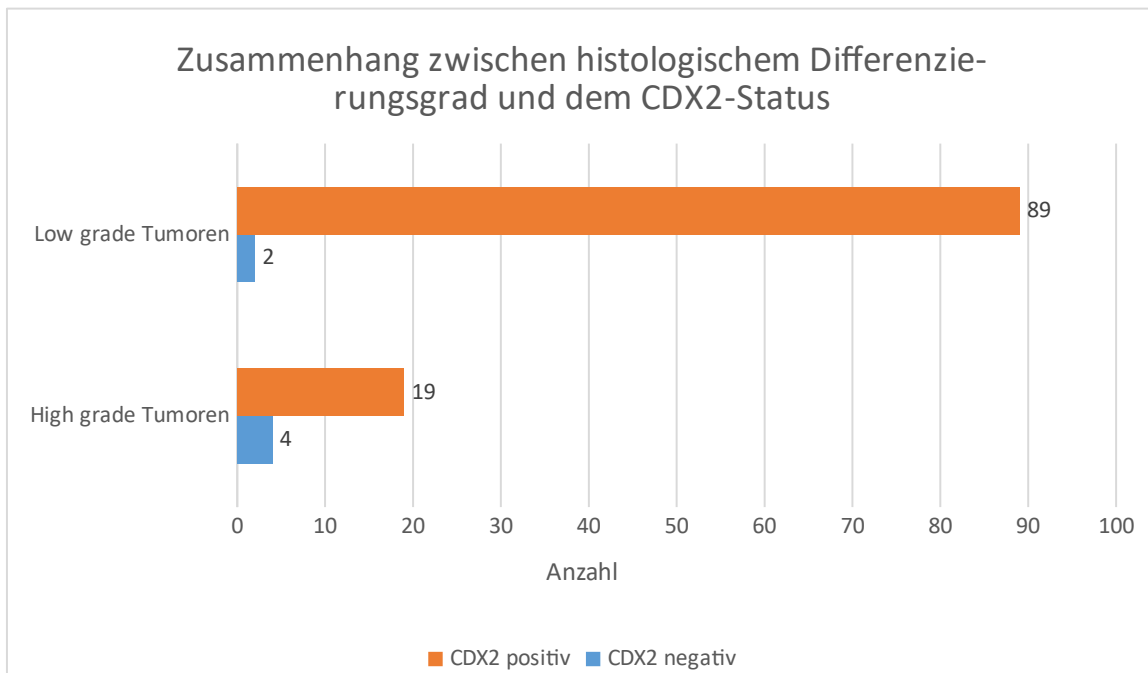


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen histologischem Differenzierungsgrad und dem CDX2-Status im untersuchten Patientenkollektiv ($n = 114$).

Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und der Tumorlokalisierung

Die Anzahl von Tumoren mit dem jeweiligen CDX2-Status in Bezug auf die Tumorlokalisierung wird in Abbildung 14 dargestellt. Der Ausfall des CDX2-Status war mit 83,3 % (5/6) im Bereich des proximalen bzw. rechtsseitigen Kolons deutlich häufiger als im distalen Kolon mit 16,6 % (1/6). Es besteht allerdings kein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p = 0,155$; Chi-Quadrat-Test) zwischen dem CDX2-Status und der Tumorlokalisierung. Die Vierfeldertafel in Abbildung 14 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

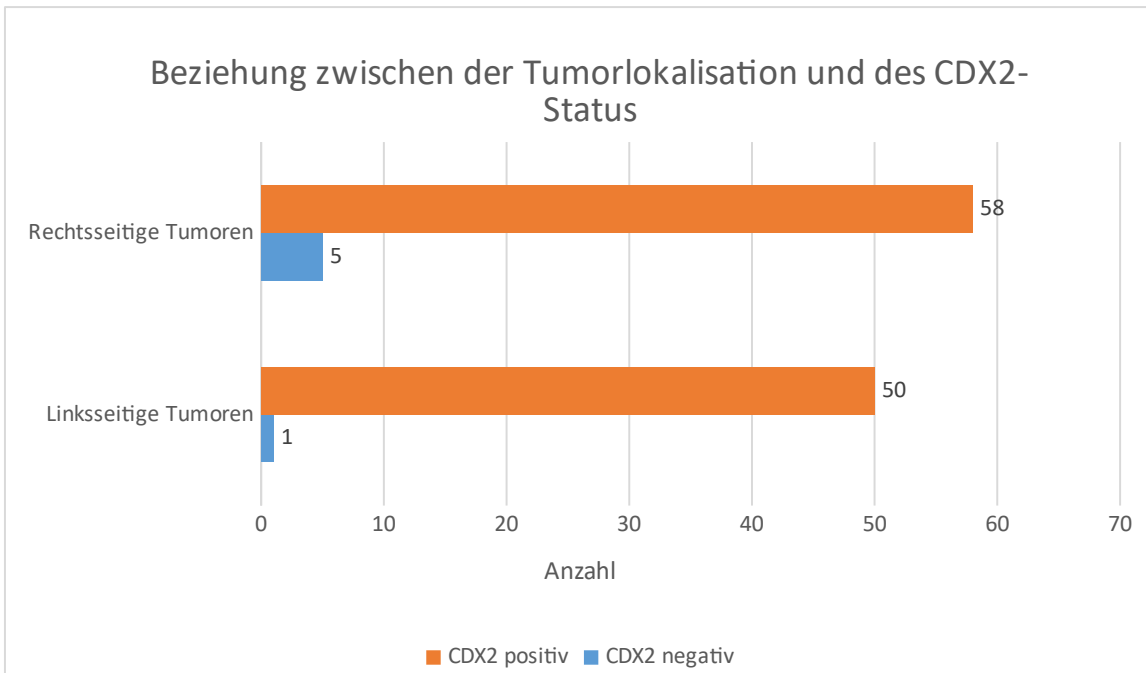


Abbildung 14: Beziehung zwischen der Tumorlokalisation und dem CDX2-Status im untersuchten Patientenkollektiv (n=114). Rechtsseitige Tumoren sind definitionsgemäß proximal der Flexura lienalis und linksseitige Tumoren distal der Flexura lienalis gelegen.

Zusammenfassend konnte im vorliegenden Patientenkollektiv ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem negativen CDX2-Status und dem MSI-H/MMRD-Status gezeigt werden. Zudem zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem negativen CDX2-Status und einer G3-Differenzierung.

Kein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem CDX2-Status und der Tumorlokalisation, dem TNM-Stadium, dem Geschlecht oder dem Vorliegen eines muzinösen Adenokarzinoms.

5.3.2 Korrelation zwischen negativem CDX2-Status und der Prognose

In Abbildung 15 und 16 wird das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben abhängig vom CDX2-Status dargestellt.

Es zeigt sich, dass sich das 5-Jahres-Gesamtüberleben für Patienten mit einem positiven CDX2-Status auf 89 % und für Patienten mit einem negativen CDX2-Status auf 80 % berechnete. In Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben ergab sich zwischen den Kaplan-Meier-Kurven vom positiven und negativen CDX2-Status kein signifikanter Unterschied ($p = 0,581$; Log-Rank-Test).

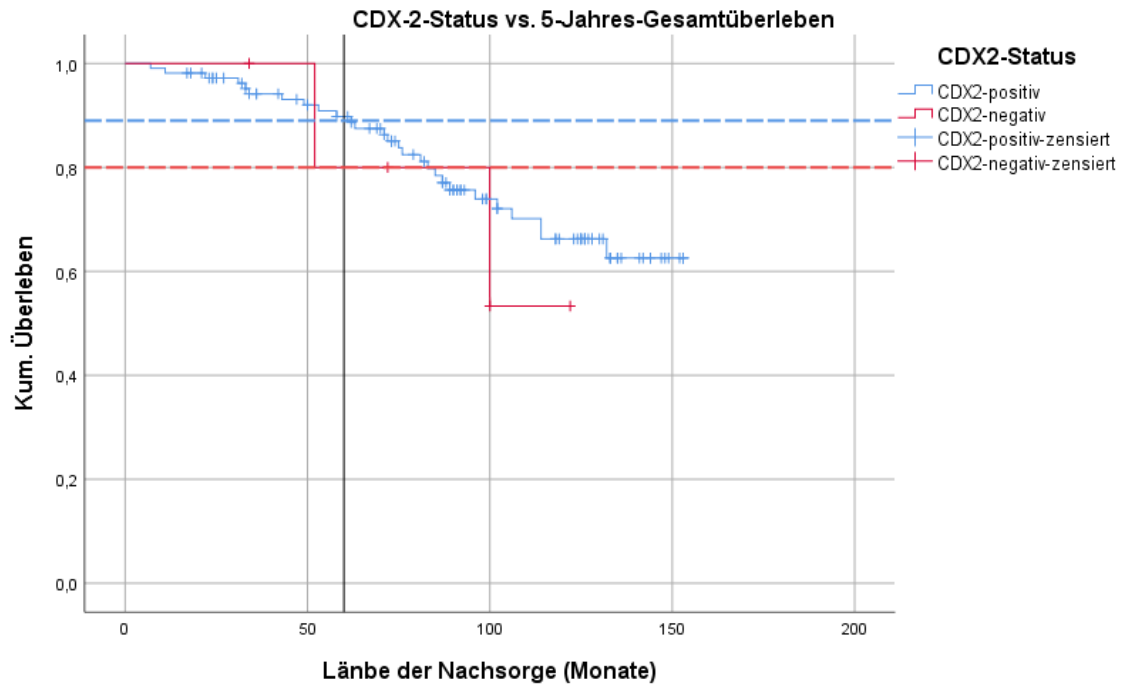


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen CDX2-Status und dem Gesamtüberleben des untersuchten Patientenkollektivs ($n = 114$) mit Kolonkarzinom im Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Gesamtüberleben. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben lag für Patienten mit einem positiven CDX2-Status bei 89 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit negativem CDX2-Status ergab sich ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 80 %. Der Vergleich der Überlebensverteilung in Bezug auf den CDX2-Status mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,581$).

Beim 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben zeigte sich, dass Patienten mit einem positiven CDX2-Status in 94 % der Fälle Rezidiv-frei blieben. Patienten mit einem negativen CDX2-Status blieben in 100 % der Fälle Rezidiv-frei. Die Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank-Test verglichen. In Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich zwischen den Kaplan-Meier-Kurven vom positiven und negativen CDX2-Status kein signifikanter Unterschied ($p = 0,548$; Log-Rank-Test).

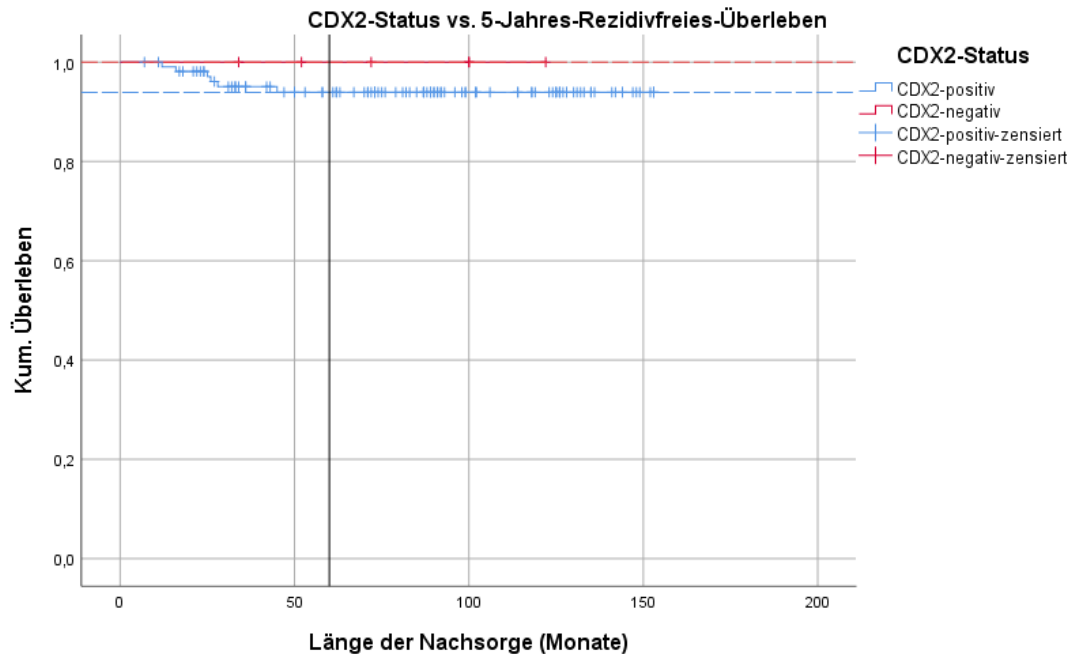


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen CDX2-Status und dem 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben des untersuchten Patientenkollektivs ($n = 114$) mit Kolonkarzinom im Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben lag für Patienten mit einem positiven CDX2-Status bei 94 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit negativem CDX2-Status ergab sich ein 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben von 100 %. Der Vergleich der Überlebensverteilung in Bezug auf den CDX2-Status mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,548$).

Zusammenfassend lag bei Tumoren mit einem negativen CDX2-Status eine schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberleben vor. In Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich für Tumoren mit einem negativen CDX2-Status eine bessere Prognose. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

5.4 Ergebnisse der Untersuchung des MSI/MMR-Status

In der vorliegenden Studie erfolgte für jeden eingeschlossenen Patienten eine immunhistochemische Untersuchung der Expression der Mismatch-Repair-Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2. Die folgenden Bilder veranschaulichen, am Beispiel von MLH1, die Unterschiede zwischen einer erhaltenen immunhistochemischen MMR-Anfärbung, d.h. dem MSS/MMRP-Status, und einem Ausfall der Expression der MMR-Proteine, d.h. dem MSI-H/MMRD-Status, mit fehlender immunhistochemischer Anfärbung der Nuklei der Tumorzellen.

Die Abbildung 17 zeigt eine positive immunhistochemische Anfärbung auf das Mismatch-Repair-Protein MLH1, es wird somit der MSS/MMRP-Status dargestellt.

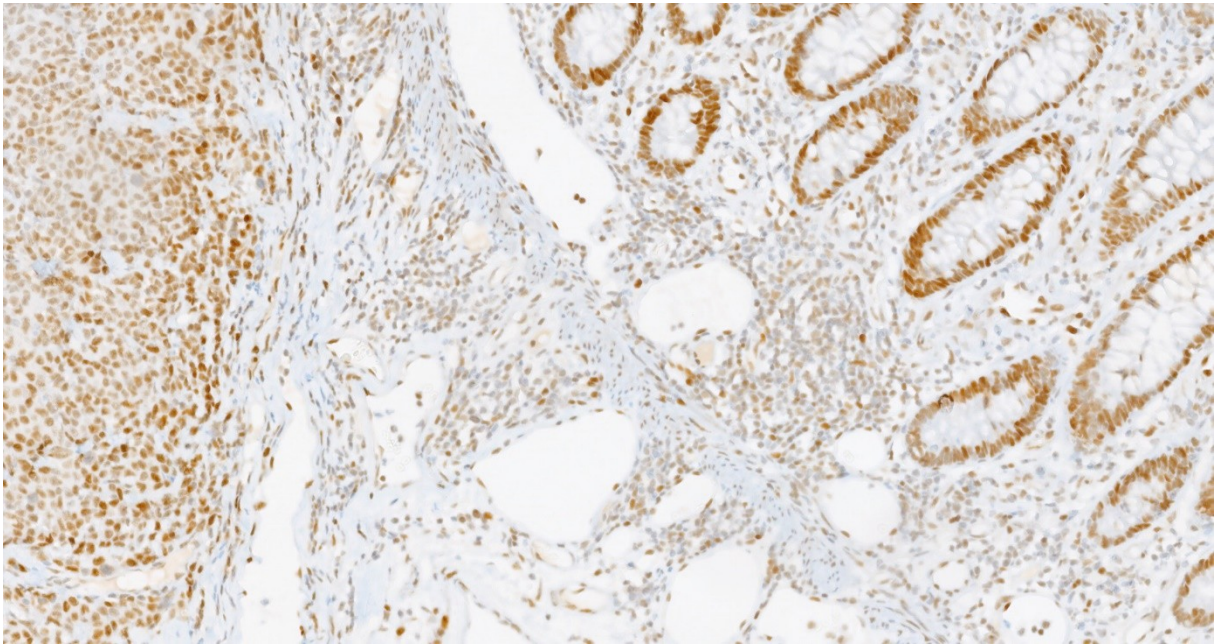


Abbildung 17: Kolonkarzinom nach immunhistochemischer Anfärbung auf MLH1. In dieser höheren Vergrößerung wird die immunhistochemische Anfärbung im Bereich des Zellkernes als Ort der MLH1 Expression sichtbar. 200-fache Vergrößerung.

Abbildung 18 veranschaulicht den MSI-H/MMRD-Status. Ein MSI-H/MMRD-Status zeigte sich als fehlende nukleäre Anfärbung der gesamten, auf dem jeweiligen Objektträger vorhandenen, Tumorareale. Es zeigt sich eine vollständig fehlende nukleäre Anfärbung im Bereich der Tumorzellen. Zudem zeigt sich eine regelrechte interne Positivkontrolle im Bereich der Nuclei der intakten Kolonschleimhaut.

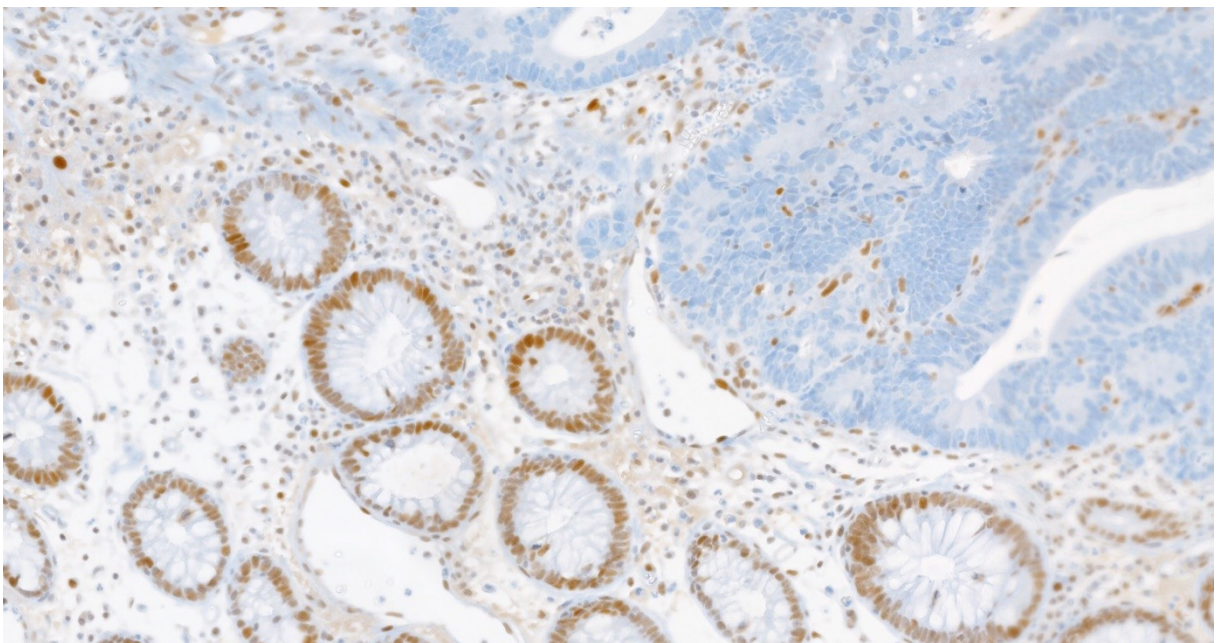


Abbildung 18: Kolonkarzinom nach immunhistochemischer Anfärbung auf MLH1. Die fehlende MLH1-Anfärbung der Nuclei der Tumorzellen des Kolonkarzinoms zeigt die ausgefallene MLH1-Expression. Als interne Positivkontrolle diente die nukleäre Anfärbung der intakten Kolonschleimhaut und Immunzellen. 200-fache Vergrößerung.

Häufigkeitsverteilung des MSI/MRR-Status

Die Häufigkeitsverteilung des MSI/MMR-Status bezogen auf das vorliegende Patientenkollektiv wird in Abbildung 19 dargestellt.

Im vorliegenden Patientenkollektiv lag bei 28,9 % (33/114) der Patienten ein MSI-H/MMRD-Status und 71,1 % (81/114) der Patienten ein MSS/MMRP-Status vor.

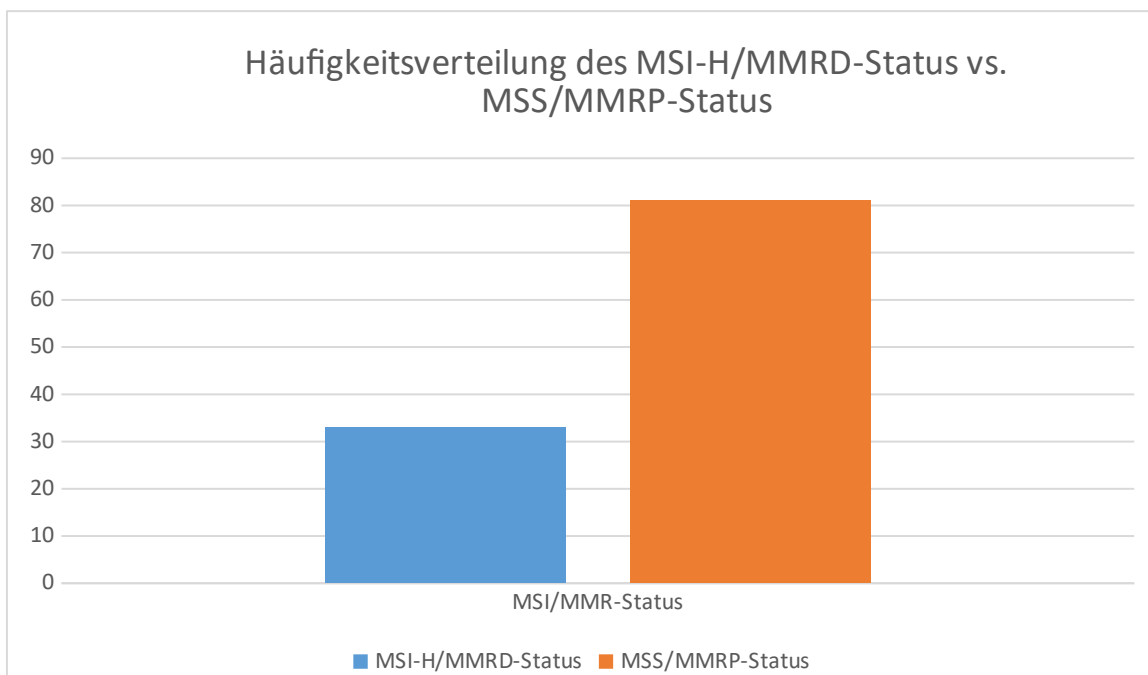


Abbildung 19: Folgendes Diagramm zeigt die Häufigkeitsverteilung des MSI/MMR-Status im vorliegenden Patientenkollektiv von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium II.

In Abbildung 20 wird dargestellt, dass es am häufigsten zu einem Ausfall von MLH1 ($n = 24$) und PMS2 ($n = 28$) kam. Der Ausfall von MSH2 ($n = 3$) und MSH6 ($n = 5$) ist betrachtet auf die vorliegende Studienpopulation ein deutlich selteneres Ereignis.

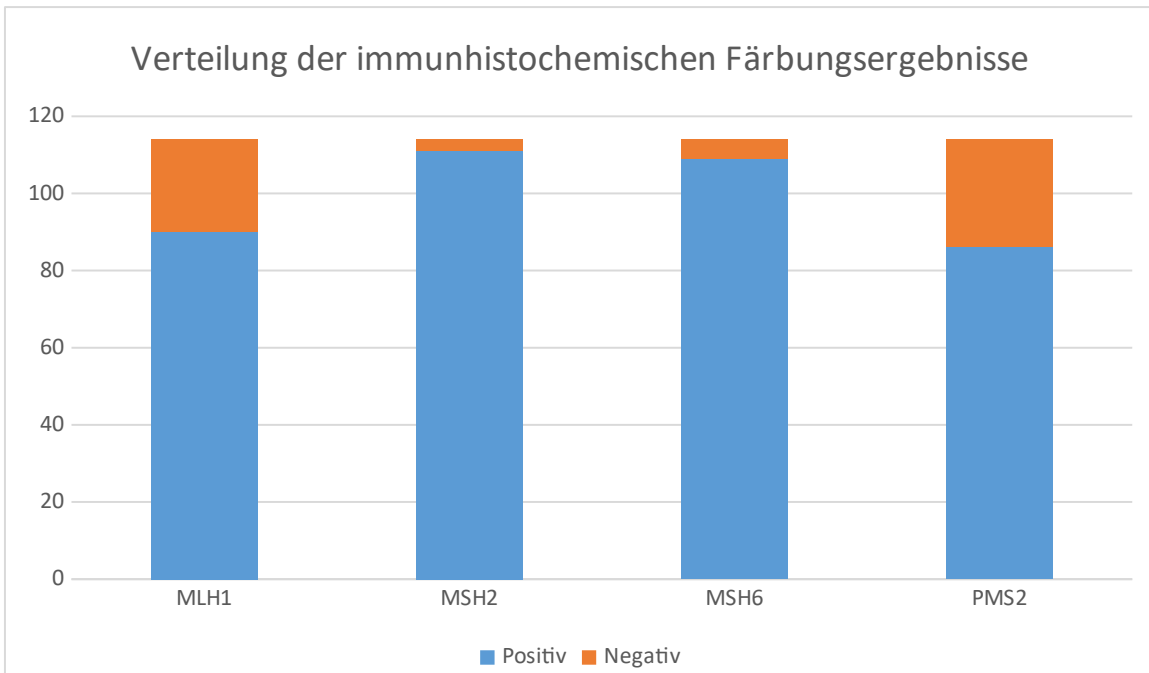


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung des positiven bzw. negativen Status der einzelnen MMR-Proteine (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2).

In Abbildung 21 wird die Häufigkeitsverteilung des Ausfalls der einzelnen MMR-Proteine innerhalb der Gruppe der MSI-H/MMRD-Tumoren dargestellt. Hier kann gezeigt werden, dass im vorliegenden Patientenkollektiv, die Bestimmung von PMS2 und MSH6 ausgereicht hätte um alle Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status zu identifizieren.

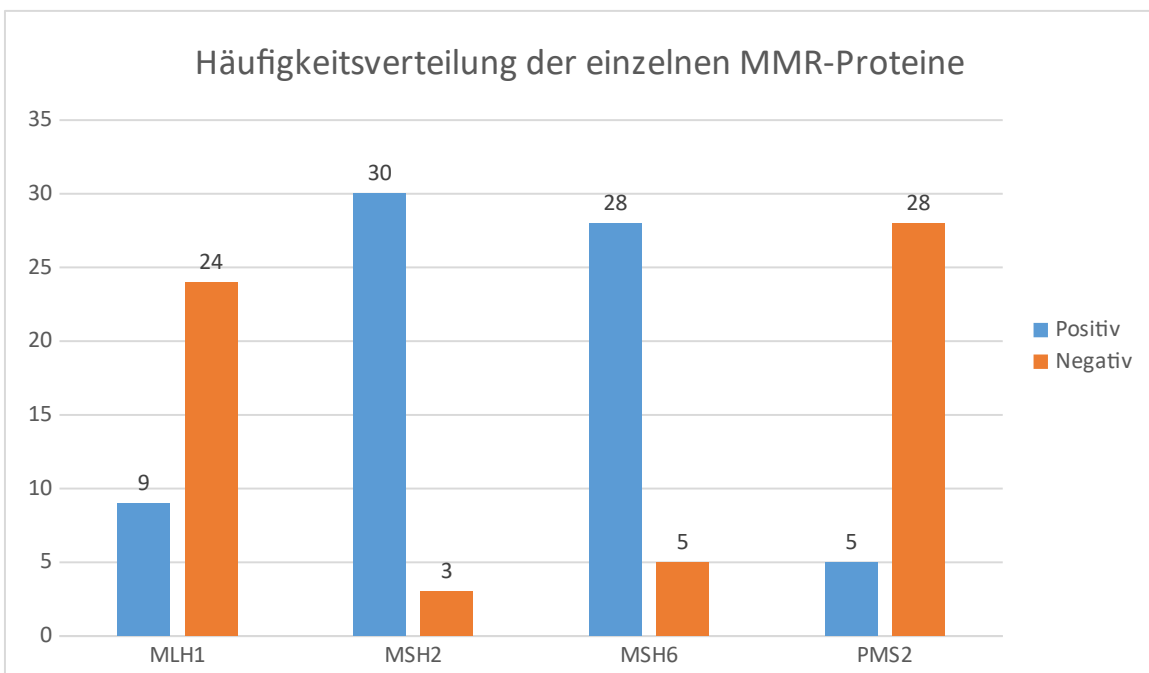


Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung des Ausfalles der einzelnen MMR-Proteine innerhalb der Gruppe der Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status.

5.4.1 Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und morphologischen/molekularen Tumoreigenschaften

Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und der Tumorlokalisierung

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und der Tumorlokalisierung. Der MSI-H/MMRD-Status war mit 44,4 % (28/63) im Bereich des rechtsseitigen Kolons signifikant häufiger nachzuweisen als im linksseitigen Kolon, wo nur 9,8 % (5/51) der Tumoren einen MSI-H/MMRD-Status zeigten. Der Zusammenhang zwischen MSI-H/MMRD-Status und der Tumorlokalisierung war statistisch signifikant ($p < 0.001$; Chi-Quadrat-Test). Die Vierfeldertafel in Abbildung 22 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

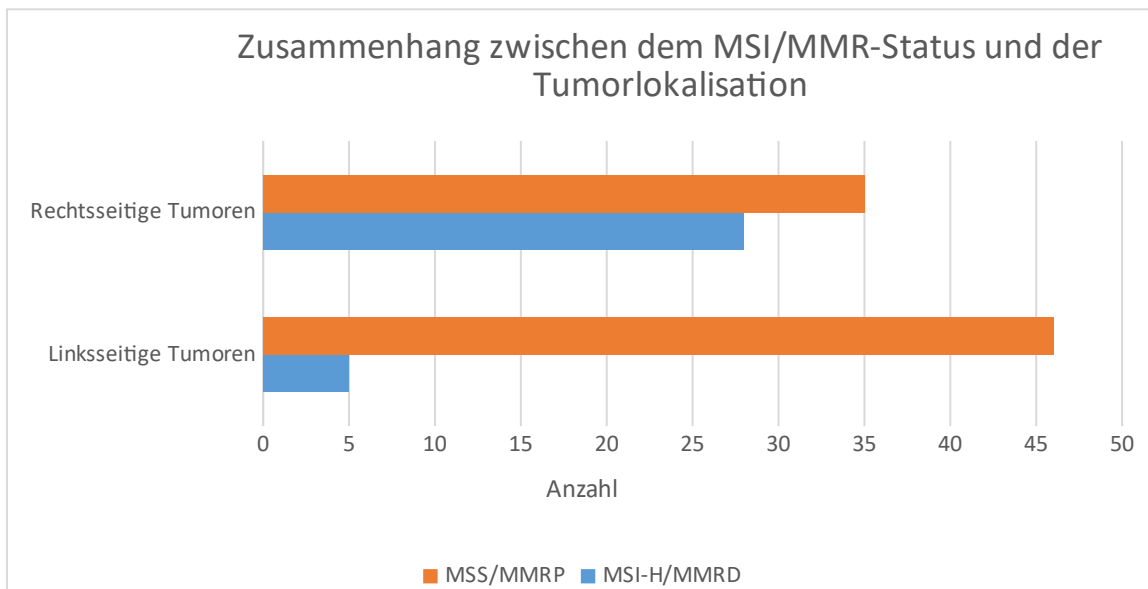


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und der Tumorlokalisierung im vorliegenden Patientenkollektiv von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II.

Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem Differenzierungsgrad

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem Grad der Differenzierung der Kolonkarzinome.

Bei 69,6 % (16/23) der schlecht differenzierten Tumoren (G3) zeigte sich parallel ein MSI-H/MMRD-Status. Im Gegensatz hierzu lag bei 81,3 % (74/91) der gut differenzierten Tumoren (G1-G2) ein MSS/MMRP-Status vor. Es besteht ein

statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Status und einem schlechten Differenzierungsgrad (G3) ($p < 0.001$; Chi-Quadrat-Test). Die Vierfeldertafel in Abbildung 23 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

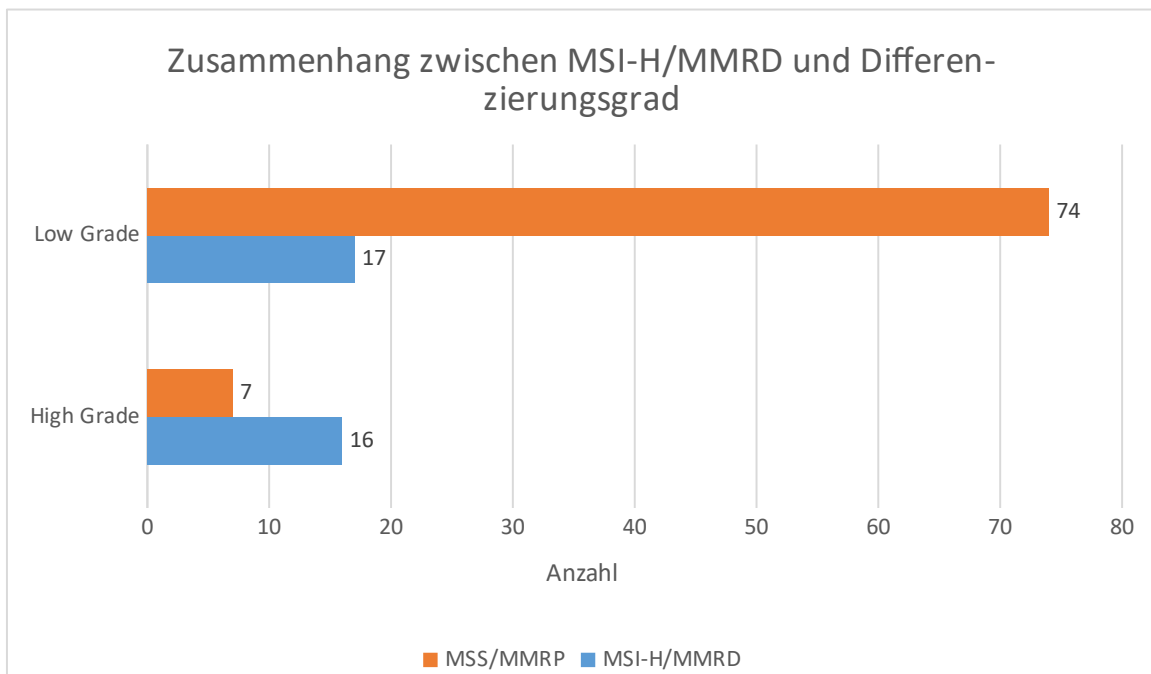


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen histologischem Differenzierungsgrad und dem MSI/MMR-Status im vorliegenden Patientenkollektiv von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II.

Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem histologischen Typ

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem histologischen Typ der Kolonkarzinome.

Bei 66,6 % (7/14) der muzinösen Adenokarzinome lag parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor. Im Gegensatz hierzu zeigten nur 20,4 % (19/93) der klassischen Adenokarzinome gleichzeitig einen MSI-H/MMRD-Status. Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant ($p < 0.001$; Chi-Quadrat-Test). Die Vierfeldertafel in Abbildung 24 diente als Grundlage für die Berechnung des Chi-Quadrat-Test.

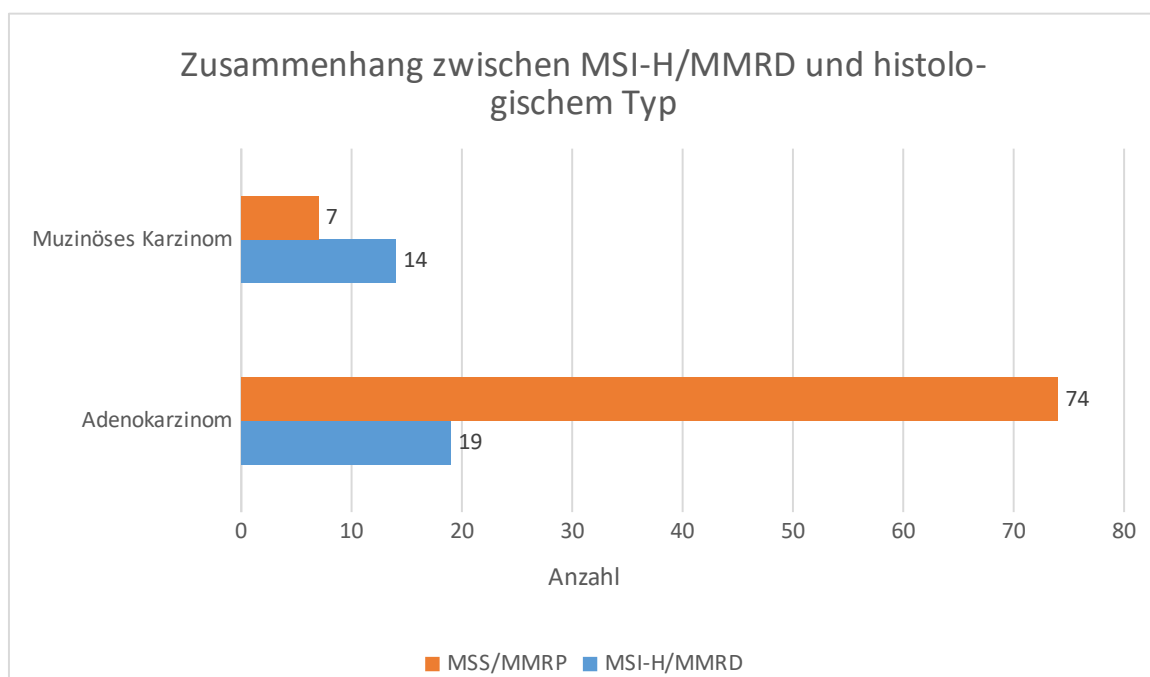


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem histologischen Typ im vorliegenden Patientenkollektiv von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II.

Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem MSI/MMR-Status

Im vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem MSI/MMR-Status.

Bei 37,3 % (19/51) der Frauen lag ein MSI-H/MMRD-Status vor. Im Vergleich dazu lag bei 22,2 % (14/63) der Männer ein MSI-H/MMRD-Status vor. Dieser Zusammenhang ist, bezogen auf das verwendete Signifikanzniveau, statistisch nicht signifikant ($p = 0,078$; Chi-Quadrat-Test). In Abbildung 25 wird der Zusammenhang zwischen Geschlecht und MSI/MMR-Status dargestellt.

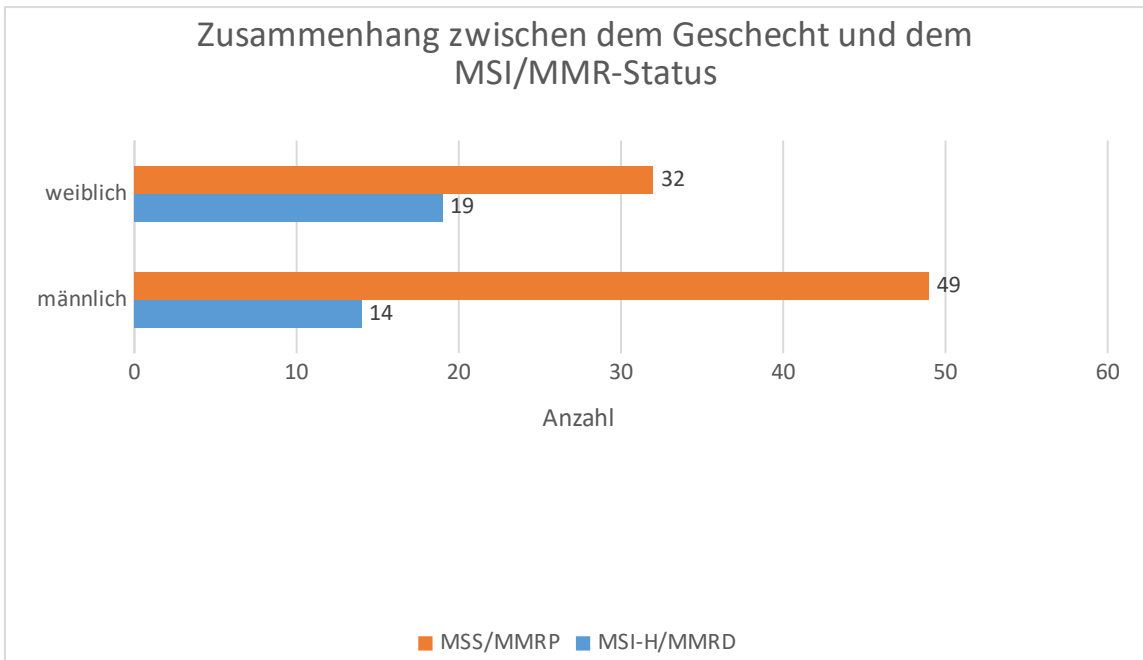


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem MSI/MMR-Status im vorliegenden Patientenkollektiv mit $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II.

Zusammenfassend konnten im vorliegenden Patientenkollektiv statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem MSI-H/MMRD-Status und rechtsseitigen Tumoren, schlecht differenzierten Tumoren (G3) und muzinösen Karzinomen gezeigt werden.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MSI/MMR-Status und dem Geschlecht oder dem T-Stadium konnte im vorliegenden Patientenkollektiv nicht gezeigt werden.

5.4.2 Korrelation zwischen dem MSI/MMR-Status und der Prognose

In Abbildung 26 und 27 wird das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben abhängig vom MSI/MMR-Status dargestellt.

Es zeigt sich, dass sich das 5-Jahres-Gesamtüberleben für Patienten mit einem MSS/MMRP-Status auf 90 % und für Patienten mit einem MSI-H/MMRD-Status auf 87 % berechnete. In Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben ergab sich zwischen den Kaplan-Meier-Kurven vom MSS/MMRP-Status und dem MSI-H/MMRD-Status kein signifikanter Unterschied ($p = 0,908$; Log-Rank-Test).

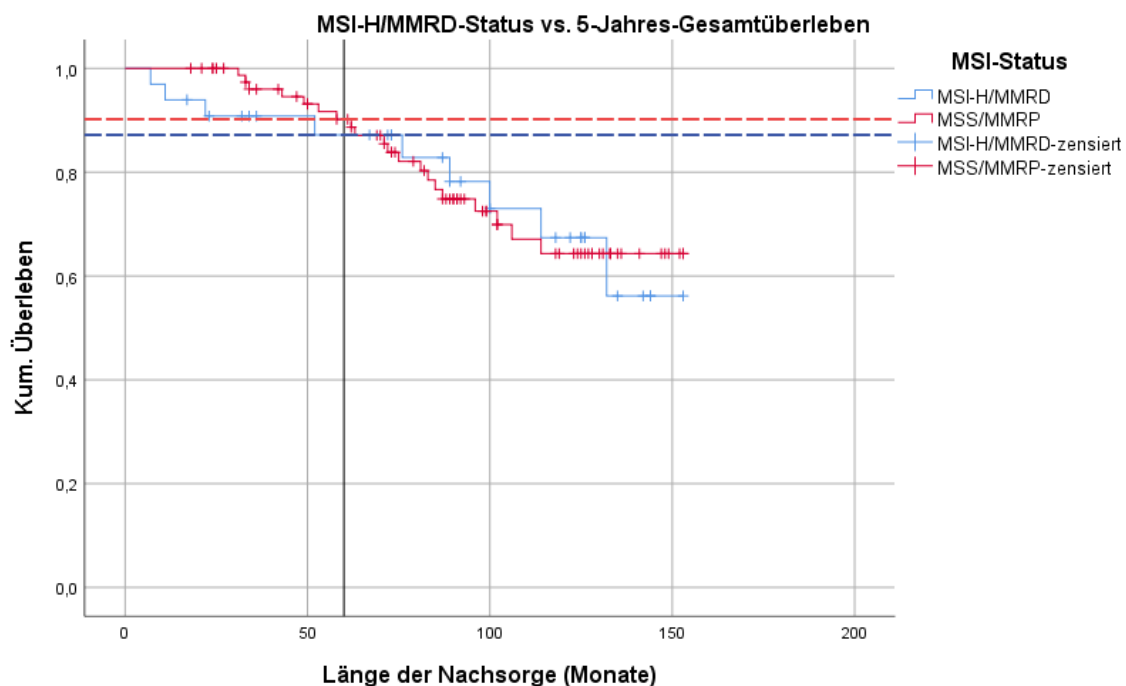


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen MMR-Status und dem Gesamtüberleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Gesamtüberleben. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben lag für Patienten mit MSI-H/MMRD-Status bei 87 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit MSS/MMRP-Status ergab sich ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 90 % (gestrichelte rote Linie). Der Vergleich der Überlebensverteilung in Bezug auf den MSI-H/MMRD-Status mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,908$).

Beim 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben zeigte sich, dass Patienten mit einem MSS/MMRP-Status in 92 % der Fälle kein Rezidiv entwickelten und Patienten mit einem MSI-H/MMRD-Status in 100 % der Fälle kein Rezidiv entwickelten. Die Überlebenskurven wurden mittels Log-Rank-Test verglichen. In Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich zwischen den Kaplan-Meier-Kurven vom MSS/MMRP und MSI-H/MMRD-Status kein signifikanter Unterschied ($p = 0,129$; Log-Rank-Test).

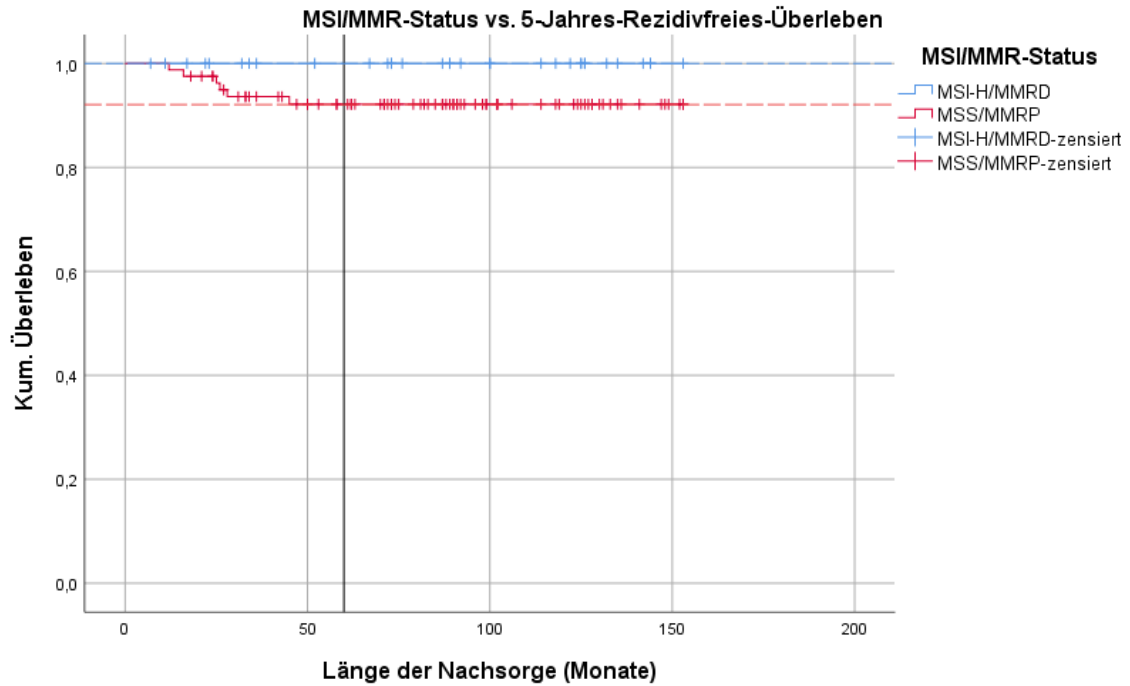


Abbildung 27: Zusammenhang zwischen MSI/MMR-Status und dem 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben von $n = 114$ Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium II. Die senkrechte Linie bei 60 Monaten kennzeichnet das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben lag für Patienten mit MSI-H/MMRD-Status bei 100 % (gestrichelte blaue Linie). Für Patienten mit MSS/MMRP-Status ergab sich ein 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben von 92 % (gestrichelte rote Linie). Der Vergleich der Überlebensverteilung in Bezug auf den MSI-H/MMRD-Status mittels Log-Rank-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,129$).

Zusammenfassend lag bei Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status eine schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberleben vor. In Bezug auf das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben ergab sich für Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status eine bessere Prognose. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Charakteristika und Prognose des Patientenkollektivs

6.1.1 Diskussion der klinisch-pathologischen und epidemiologischen Eigenschaften des vorliegenden Patientenkollektivs

Das vorliegende Patientenkollektiv zeigte Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede bezüglich relevanter klinisch-pathologischer und epidemiologischer Faktoren im Vergleich zu internationalen Studien, die das Kolonkarzinom im Stadium II im Hinblick auf eine ähnliche Fragestellung untersuchten (Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018; Slik et al. 2019).

Das Tumorstaging und damit die Festlegung der anatomischen Ausdehnung mittels TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung in UICC-Stadien, hat bei der Prognoseabschätzung und bei der weiteren Therapieentscheidung nach wie vor eine Schlüsselrolle. Das T-Stadium ist beim Kolonkarzinom im Stadium II, innerhalb der TNM-Klassifikation, der entscheidende Faktor, da sich in diesem Stadium definitionsgemäß weder eine Lymphknotenmetastasierung noch eine Fernmetastasierung nachweisen lässt. Lokal fortgeschrittene T4-Tumoren könnten mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Böckelman et al. 2015). Im hier untersuchten Patientenkollektiv lag nur bei 5,3 % der Patienten ein T4-Stadium (T4a = 3,5 % und T4b = 1,8 %) vor. Damit sind Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren in unserem Patientenkollektiv vermutlich unterrepräsentiert. In vergleichbaren Studien war der Anteil mit ca. 12 % wesentlich höher (Hansen et al. 2018; Cecchini et al. 2019).

Eine verlässliche Aussage über einen repräsentativen Anteil an High-Grade Tumoren kann für diese Studie nur eingeschränkt gemacht werden. Der wesentliche Grund hierfür ist die Verwendung verschiedener Definitionen. Einerseits empfehlen deutsche und US-amerikanische Leitlinien, dass G3/G4-Tumoren bei denen parallel ein MSI-H/MMRD-Status vorliegt als Low-Grade-Tumoren klassifiziert werden (NCCN Guidelines - Colon Cancer 2020; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Andererseits findet der MSI-H/MMRD-Status in der aktuellen WHO-Klassifikation bei der Einstufung des Tumorgradings keine Berücksichtigung (Nagtegaal 2019). In dieser Studie lagen nach der aktuellen Definition der WHO 20,2 % High-Grade Tumoren vor. In vergleichbaren Studien lag der Anteil bei 15,6 % bzw. 24,6 % (Koenig et al. 2018; Slik et al. 2019). Der Vergleich mit weiteren Studien war dadurch limitiert, dass keine Angaben darüber gemacht wurde, welche der beiden Definitionen verwendet wurde (Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018). Nach Klassifikation der deutschen und US-amerikanischen Leitlinien wurden im vorliegenden Patientenkollektiv 6,1 % der Tumoren als High-Grade-Tumoren klassifiziert.

Die Anzahl der durch den Pathologen untersuchten Lymphknoten gilt bei beim Kolonkarzinom im Stadium II und III als unabhängiger Risikofaktor. Für ein adäquates Staging müssen mindestens 12 Lymphknoten untersucht werden, da

die Zahl der entfernten und untersuchten Lymphknoten als Surrogatmarker für die chirurgische und pathologische Qualität gilt (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom; NCCN Guidelines - Colon Cancer 2020). Anzustreben ist, über die Anzahl von 12 Lymphknoten hinaus, möglichst viele Lymphknoten zu untersuchen, da dies die Prognose des Patienten verbessert (Le Voyer et al. 2003). Im vorliegenden Patientenkollektiv wurden bei jedem Patienten mindestens 12 Lymphknoten pathologisch untersucht. Die Anzahl untersuchter Lymphknoten lag im Median bei 24 (Spannweite 12-62). Dies unterscheidet sich von aktuellen Publikationen in deren Analyse auch Patienten mit weniger als 12 Lymphknoten eingeschlossen wurden (Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018; Slik et al. 2019).

Patienten, die im Rahmen einer Notfalloperation, aufgrund einer Tumorperforation, eines Tumoreinriss oder dem Vorliegen eines Ileus, behandelt werden müssen, haben ein schlechteres tumorspezifisches Langzeitüberleben (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom). Im vorliegenden Patientenkollektiv wurden keine Patienten eingeschlossen, die unter Notfallbedingungen aufgrund oben beschriebener Komplikationen behandelt wurden, da es sich stets um elektive Eingriffe handelte. Dies unterscheidet sich von vergleichbaren Publikationen, die häufig Patienten einschlossen, die unter Notfallbedingungen operiert wurden (Slik et al. 2019; Hansen et al. 2018).

Im vorliegenden Patientenkollektiv fanden sich 55,3 % rechtsseitige und 44,7 % linksseitige Kolonkarzinome. Der prozentualer Anteil von links- und rechtsseitigen Tumoren war in Patientenkollektiven, die analog zum hier untersuchten Patientenkollektiv keine Rektumkarzinome in die Analyse mit einschlossen, vergleichbar (Hansen et al. 2018; Ulanja et al. 2019).

6.1.2 Diskussion der Prognose im vorliegenden Patientenkollektiv

Im vorliegenden Patientenkollektiv lag das 5-Jahres-Gesamtüberleben bei 89 % und das das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben bei 94%. Im Vergleich zu Publikationen mit ähnlichen Rekrutierungszeiträumen (2005-2012 bzw. 2010-2013) hatten die hier untersuchten Patienten eine um 9-12% bessere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens und ca. 7 % bessere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Rezidivfreien-Überlebens (Slik et al. 2019; Koenig et al. 2018).

Die insgesamt bessere Prognose könnte folgende Gründe haben:

Erstens ist es wahrscheinlich, dass die niedrige Anzahl von T4-Tumoren (5,3 %) für die fehlende prognostische Bedeutung der TNM-Klassifikation im hier untersuchten Patientenkollektiv verantwortlich ist.

Zweitens wurden in der vorliegenden Studie keine Patienten eingeschlossen, die sich einer notfallmäßigen Tumoroperation aufgrund von Obstruktion oder Perforation unterziehen mussten. Dieser Anteil lag bei vergleichbaren Studienpopulationen bei 3-24 % (Slik et al. 2019; Hansen et al. 2018).

Drittens wurden keine Patienten eingeschlossen, bei denen weniger als <12 Lymphknoten pathohistologisch untersucht wurden. In vergleichbaren Patientenkollektiven betrug der Anteil an Tumoren mit < 12 untersuchten Lymphknoten 8-61 % (Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018; Slik et al. 2019).

Das vorliegende Patientenkollektiv hat aus oben genannten Gründen ein geringeres Risikoprofil. Dies erklärt vermutlich die wesentlich bessere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben. Die insgesamt bessere Prognose war möglicherweise auch für die fehlende prognostische Aussagekraft der untersuchten molekularen Marker verantwortlich.

6.2 Diskussion der Ergebnisse der CDX2 Immunhistochemie

6.2.1 Diskussion der Methodik der CDX2 Immunhistochemie

Für molekulare Marker gilt, dass eine gute prognostische Aussagekraft nur ohne wesentliche Ungenauigkeiten in Bezug auf die Methodik möglich ist. Für diverse Marker konnte gezeigt werden, dass eine unterschiedliche Methodik zu Ergebnissen führte, die sich erheblich voneinander unterschieden. Die Reproduzierbarkeit der Untersuchung ist also in erheblichem Maße von der Methodik abhängig (McShane et al. 2005).

Die Methodik für die Bestimmung des CDX2-Status ist, in Bezug auf die prognostische Bedeutung beim Kolonkarzinom im Stadium II, nicht einheitlich.

Dies wird unter anderem bei der Betrachtung einer Metaanalyse von Tomasello et al. deutlich. In diese Metaanalyse wurden insgesamt 14 Studien eingeschlossen, die ein immunhistochemisches Analyseverfahren nutzten. Unter diesen 14 Studien gab es mindestens sechs verschiedene Definitionen für die Abgrenzung von CDX2-positiven zu CDX2-negativen Tumoren, die teilweise zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen in der Häufigkeit der CDX2-Expression kamen. Die Anzahl an Patienten mit einem negativen CDX2-Status variierte in dieser Metaanalyse zwischen 5 % und 43 %. (Tomasello et al. 2018).

Da es kein einheitliches Vorgehen zur Bestimmung von CDX2 als Prognosefaktor beim Kolonkarzinom im Stadium II gibt, wurde in dieser Arbeit ein neues, auf den verwendeten Antikörper angepasstes, Vorgehen etabliert. Es erfolgte, wie oben beschrieben, die Festlegung einer Threshold bei 30 % CDX2-negativer Tumorzellen, um einen negativen CDX2-Status zu definieren. Die Etablierung einer Threshold wurde gewählt, um die Trennschärfe zwischen positiven und negativen Befunden zu erhöhen. Auf Kriterien mit niedriger Differenzierungsfähigkeit wie die Färbeintensität wurde wie empfohlen verzichtet (Zlobec et al. 2007).

Unter Anwendung dieser Methodik hatten im vorliegenden Patientenkollektiv 5,3 % der Tumoren einen negativen CDX2-Status.

Die Anzahl an CDX2-negativen Tumoren ist im vorliegenden Patientenkollektiv im Vergleich zu anderen Publikationen gering. Die Häufigkeit der CDX2-Negativität lag in den bisher durchgeführten Studien zum Kolonkarzinom im Stadium II bei ca. 7-16 % (Dalerba et al. 2016; Pilati et al. 2017; Olsen et al. 2014; Cecchini et al. 2019; Hansen et al. 2018). Die Häufigkeit bei Dalerba et al. wurde, in der klinischen Kohorte mit 669 Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II, mit 7 % angegeben. In einer der Validationsstudien lag die Häufigkeit der CDX2-Negativität bei 15,6 % (Pilati et al. 2017).

Am häufigsten wird derzeit das methodische Vorgehen von Dalerba et. al eingesetzt. Nach der, in dieser Studie verwendeten, Definition gilt ein Tumor als CDX2-negativ, wenn die Minderheit (also < 50 %) der Tumorzellen eine schwache nukleäre Anfärbung zeigt und die übrigen Tumorzellen keine Anfärbung zeigen (Dalerba et al. 2016). Unter Einsatz dieser Definition hätten in dem hier untersuchten Patientenkollektiv lediglich 1,8 % (n=2) der Tumoren einen negativen CDX2-Status gezeigt. Da sich dieser Anteil im Vergleich zu anderen Studien deutlich unterschied, erfolgte die Senkung der Threshold auf < 30 % negativer Tumorzellen. Nach Senkung der Threshold ergab sich, in der erneut durchgeführten mikroskopischen Untersuchung, ein prozentualer Anteil von 5,3 % CDX-negativer Tumoren.

Der im Vergleich zu anderen Publikationen niedrige Anteil von Tumoren mit negativem CDX2-Status könnte mehrere Gründe haben.

Zum einen hat der im vorliegenden Patientenkollektiv verwendete Antikörper-Clon EPR 2764 Y (Ventana, Roche) eine deutlich höherer Sensitivität, als der von Dalerba et al. verwendete Antikörper-Clon ‚CDX2-88‘ (Dalerba et al. 2016; Borriholt et al. 2013). Hätte man im vorliegenden Patientenkollektiv den Antikörperklon ‚CDX‘-88 verwendet, wäre der Anteil von CDX2-negativ klassifizierten Tumoren möglicherweise entsprechend höher gewesen.

Zum anderen könnte die, in der vorliegenden Studie verwendete Threshold von 30% noch zu hoch angesetzt sein, um alle CDX2-negativen Tumoren zu identifizieren. Es ist allerdings auch zu vermuten, dass in anderen Publikationen ein Anteil von falsch CDX2-negativen Tumoren vorlag.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die CDX2-Expression in topographisch unterschiedlichen Bereichen des Tumors heterogen ausfallen kann. Im Bereich der Invasionsfront und in „tumor-budds“ könnte durch einen CDX2-Ausfall ein lokal aggressives Tumorgebiet geschaffen werden (Olsen et al. 2014). In einem Großteil der Studien, die CDX2 als Prognosefaktor beim Kolonkarzinom im Stadium II untersucht haben, wurde die Bestimmung des CDX2-Status auf Tissue-Microarrays durchgeführt (Dalerba et al. 2016; Slik et al. 2019; Nolte et al. 2017). Hierbei wurden nur sehr kleine Tumorareale berücksichtigt. Auch wenn mit Hilfe der HE-Schnitte eine sehr genaue Vorauswahl der Tumorareale erfolgte, welche in die Analyse von CDX2 eingeschlossen werden sollen, wird dies der Heterogenität der CDX2-Expression vermutlich nicht gerecht.

Besonders deutlich beschrieben wurde diese Problematik in einer kürzlich erschienenen Publikation (Cecchini et al. 2019). Hierbei wurde die Expression von

CDX2 aus drei verschiedenen Tumorarealen untersucht. Die drei „whole-section“-Tumorschnitte aus den jeweiligen Blöcken wurden auf die Expression von CDX2 untersucht. Auf verschiedenen Ebenen zeigten sich Unregelmäßigkeiten im Expressionsmuster von CDX2. Mitunter zeigte sich ein heterogenes Expressionsmuster, aber auch Areale, in denen die CDX2-Expression gänzlich fehlte. Diese heterogene CDX2-Expression fand sich sowohl innerhalb des untersuchten Tumorblockes, als auch zwischen den drei untersuchten Tumorblöcken (Cecchini et al. 2019).

Zusammenfassend ist die Bestimmung des CDX2-Status, als prognostischer Marker beim Kolonkarzinom im Stadium II, durch eine fehlende Standardisierung der Auswertung und durch die divergierende Sensitivität verschiedener Antikörper, nicht präzise möglich. Zudem wird die Bestimmung des CDX2-Status durch topographische Unterschiede des Expressionsmusters innerhalb der Tumoren erschwert.

6.2.2 Diskussion von CDX2 und klinisch-pathologischen Assoziationen

Eine fehlende CDX2-Expression ist beim Kolonkarzinom häufig mit dem Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Phänotyp, einer schlechten histologischen Differenzierung und mit einer proximalen Tumorlokalisation assoziiert (Dalerba et al. 2016). Insbesondere der Zusammenhang zwischen dem CDX2-Status und dem MSI-/MMR-Status ist für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung und wird im Folgenden näher erläutert.

Im hier untersuchten Patientenkollektiv ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status. Bei allen der hier untersuchten Tumoren mit einem negativen CDX2-Status lag parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor. Die Kombination aus einem negativen CDX2-Status und einem MSS/MMRP-Status lag bei keinem Tumor vor.

Der enge Zusammenhang zwischen Tumoren mit einem negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status wird in einer aktuellen Publikation beschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. In der Publikation von Slik et. al zeigte sich bei 76 % der CDX2-negativen Tumoren parallel ein MSI-H/MMRD-Status (Slik et al. 2019). In einer älteren Publikation konnte der Zusammenhang zwischen einem negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status allerdings nicht gezeigt werden (Baba et al. 2009).

6.2.3 Diskussion von CDX2 als Prognosefaktor

Der CDX2-Status gilt nach derzeitigen Kenntnissen als vielversprechender Prognosefaktor beim Kolonkarzinom im Stadium II (Dalerba et al. 2016; Hansen et al. 2018; Pilati et al. 2017). Ein negativer CDX2-Status gilt als Marker, welcher eine schlechte Prognose beim Kolonkarzinom im Stadium II anzeigt (Dalerba et al. 2016; Hansen et al. 2018).

Der CDX2-Status ist als Prognosefaktor im wesentlichen durch eine Studie von Dalerba et al. aus dem Jahr 2016 in den Fokus der aktuellen Forschung beim Kolonkarzinom im Stadium II gerückt. Die Studie von Dalerba et al. diente als wesentliche Grundlage für die Initiierung der vorliegenden Studie. Eine fehlende CDX2-Expression war bei Dalerba et al. mit einer signifikant schlechteren Prognose, sowohl in Bezug auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben als auch auf das 5-Jahres-Krankheitsfreie-Überleben assoziiert. Es wurden zwei getrennte Kohorten analysiert und Patienten mit CDX2-negativen Tumoren hatten, unabhängig von klinisch-pathologischen Risikofaktoren, eine um 30 % schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberlebens sowie eine um 29-38 % schlechtere Prognose bezüglich des 5-Jahres-Krankheitsfreien-Überlebens (Dalerba et al. 2016).

Eine Validierung dieser Ergebnisse erfolgte in Studien von Pilati et al. und Hansen et al.. In beiden Publikationen bestätigte sich der prognostische Wert eines negativen CDX2-Status (Pilati et al. 2017; Hansen et al. 2018). Allerdings war bei Hansen et al. der prognostische Wert des CDX2-Status deutlich geringer. Der Unterschied bezüglich des 5-Jahres-Krankheitsfreien-Überlebens betrug dort nur 8-13 % (Hansen et al. 2018).

Im vorliegenden Patientenkollektiv hatte der CDX2-Status keine prognostische Bedeutung. Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen einem negativen CDX2-Status und dem 5-Jahres-Gesamtüberleben oder dem 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben. Dies steht somit im Gegensatz zu einer Vielzahl an Publikationen, die den CDX2-Status als negativen molekularen Marker identifiziert haben (Dalerba et al. 2016; Hansen et al. 2018; Pilati et al. 2017).

Allerdings ergaben nachfolgende Studienergebnisse, dass ein negativer CDX2-Status keine prognostische Bedeutung hat, wenn parallel ein MSI-H/MMRD Status vorliegt (Slik et al. 2019). Dieser Zusammenhang war bereits in der Publikation von Pilati et al. aufgefallen, welche in der Regel als Validationsstudie für die prognostische Wertigkeit eines negativen CDX2-Status zitiert wird. Hierbei zeigte sich, dass ein negativer CDX2-Status im Zusammenhang mit einem MSI-H/MMRD-Status, nicht mit einer schlechteren Prognose einherging (Pilati et al. 2017).

In einer Studie mit n = 232 Patienten, wurde ähnlich wie in der vorliegenden Studie, der CDX2-Status in Verbindung mit dem MSI-H/MMRD-Status untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus einem CDX2-negativ-/MSI-H/MMRD-Status keine prognostische Wertigkeit hatte. Ein negativer CDX2-Status hatte somit nur in der seltenen Kombination mit einem

MMS/MMRP-Status eine prognostische Relevanz. Wie oben bereits beschrieben ergab sich im vorliegenden Patientenkollektiv eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen eines negativen CDX2-Status und dem MSI-H/MMRD-Status. Bei allen Patienten mit negativem CDX2-Status lag parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor. Dass ein negativer CDX2-Status häufig mit einem MSI-H/MMRD-Status assoziiert ist, ist aus der Literatur bekannt. Zum Beispiel zeigte sich in der Validationskohorte von Pilati et al. eine ähnlich enge Assoziation zwischen CDX2-Status und MSI-H/MMRD-Status. Dort hatten 87 % (7 von 8) der Tumoren mit negativem CDX2-Status parallel einen MSI-H/MMRD-Status (Pilati et al. 2017). Auch in der Studie von Slik et al. zeigte sich, dass ein Großteil (76 %) der Tumoren mit einem negativen CDX2-Status zusätzlich einen MSI-H/MMRD-Status aufwies (Slik et al. 2019).

In einer weiteren Studie mit n = 210 Patienten kamen die Autoren, unabhängig von der Bestimmung des MSI/MMR-Status, zu dem Ergebnis, dass von einem negativen CDX2-Status keine prognostische Bedeutung ausging. Diese Autoren warnen vor der Verwendung von CDX2 als isolierten Prognosefaktor (Cecchini et al. 2019).

Einiges scheint dafür zu sprechen, dass Tumoren mit einem negativen CDX2-Status nur dann eine schlechte Prognose haben, wenn parallel ein MSS/MMRP-Status vorliegt. Der Grund dafür, dass im vorliegenden Patientenkollektiv von einem negativen CDX2-Status keine prognostische Bedeutung ausging, könnte somit darauf zurückzuführen sein, dass in allen Fällen simultan ein MSI-H/MMRD-Status vorlag. Die Bestimmung des CDX2-Status hätte somit bei keinem, der hier untersuchten Patienten, eine prognostische Bedeutung gehabt.

Zu einem abweichenden Ergebnis bezüglich der Kombination eines negativen CDX2-Status und eines MSI-H/MMRD-Status kommen Hansen et al.. Dort hatten auch Tumoren mit einem negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status eine schlechtere Prognose als Tumoren mit einem positiven CDX2-Status. Dieser Unterschied war mit ca. 6 % allerdings relativ gering und vermutlich nur messbar, weil in den analysierten Kollektiven deutlich höhere Fallzahlen verwendet wurden als im vorliegenden Patientenkollektiv (Hansen et al. 2018).

Zusammenfassend geht in dem hier untersuchten Patientenkollektiv von der Bestimmung des CDX2-Status keine prognostische Bedeutung aus. Dies könnte durch die strenge Assoziation zu dem MSI-H/MMRD-Status bedingt sein.

6.3 Diskussion der Immunhistochemie des MSI/MMR-Status

6.3.1 Diskussion der Methodik der MSI/MMR-Statusbestimmung

Die Bestimmung des MSI/MMR-Status mit immunhistochemischen Methoden hat durch die lange Erfahrung in der Auswertung, der Qualitätssicherung und der Verbesserung der verwendeten Clone ein hohes Maß an Präzision (Dietmaier et al. 2019). Es hat sich als vergleichbar genaues Verfahren mit einer hohen Übereinstimmungsrate mit dem Gold-Standard des Genotypings etabliert, ist aber kostengünstiger, weniger zeitintensiv und weniger arbeitsintensiv (Guastadisegni et al. 2010). In einer Metaanalyse von 16 Studien mit mehr als 3.400 Patienten zeigte sich, dass die Präzision der immunhistochemischen Untersuchung der MMR-Proteine annähernd gleichwertig mit der mittels PCR durchgeführten MSI-Bestimmung war (Rigau et al. 2003). Diese Ergebnisse wurden durch eine Studie mit Tumoren von fast 6000 Patienten bestätigt (Cicek et al. 2011). Dies steht, wie oben beschrieben, im deutlichen Gegensatz zu der immunhistochemischen Bestimmung des CDX2-Status, bei der ein einheitlicher Standard, in Bezug auf das Kolonkarzinom im Stadium II, fehlt.

Im vorliegenden Patientenkollektiv lag bei 33 (28,9 %) der Patienten eine MSI-H/MMRD-Status und bei 81 (71,1 %) der Patienten ein MSS/MMRP-Status vor.

Die Häufigkeit des MSI-H/MMRD-Status in beim Kolonkarzinom abhängig vom jeweiligen Tumorstadium. Das Vorliegen von Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status ist in den früheren Stadien des Kolonkarzinom höher. Während im Stadium II der Anteil von MSI-H/MMRD-Tumoren bei ca. 20 % liegt, findet sich im Stadium III nur noch ein Anteil von ca. 12 % und im Stadium IV ein Anteil von ca. 4 % (Roth et al. 2010; Gkekas et al. 2017).

Der MSI-H/MMRD-Status war im vorliegenden Patientenkollektiv mit 28,9 % relativ häufig. In vergleichbaren Patientenkollektiven, in denen ausschließlich Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II untersucht wurden, zeigten sich mit 27 % bzw. 30 % allerdings ähnliche Häufigkeiten des MSI-H/MMRD-Status (Toucheffeu et al. 2016; Hansen et al. 2018). In Untersuchungen, in denen auch Rektumkarzinome mit eingeschlossen wurden, lag der Anteil an Patienten mit einem MSI-H/MMRD-Status deutlich niedriger, was durch die Assoziation des MSI-H/MMRD-Status mit einer rechtsseitigen Tumorlokalisierung zu erklären ist (Fountzilias et al. 2019; Mouradov et al. 2013).

6.3.2 Diskussion des MSI/MMR-Status und klinisch-pathologischen Assoziationen

Tumoren mit einem MSI-H/MMRD-Status haben häufig charakteristische klinisch-pathologische Eigenschaften. Dazu gehören eine rechtsseitige Tumorlokalisierung,

eine schlechte Differenzierung, eine muzinöse Histologie und das weibliche Geschlecht (Dietmaier et al. 2019; Guastadisegni et al. 2010; Popat et al. 2005).

Diese Assoziationen konnten im vorliegenden Patientenkollektiv zum Großteil reproduziert werden. Der MSI-H/MMRD-Status war im Bereich des rechtsseitigen Kolons (44%) signifikant häufiger als im linksseitigen Kolon (9,8 %) nachweisbar. Bei 69,6 % der schlecht differenzierten Tumoren (G3) zeigte sich parallel ein MSI-H/MMRD-Status und bei 66,6 % der muzinösen Adenokarzinome lag parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor. Diese Zusammenhänge waren alle statistisch signifikant. Nur ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem MSI-H/MMRD-Status und dem weiblichen Geschlecht konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

Die Reproduzierbarkeit der Assoziationen zwischen dem MSI-H/MMRD-Status und den oben beschriebenen klinisch-pathologischen Faktoren spricht für die Validität der Methodik der immunhistochemischen Bestimmung des MSI-H/MMRD-Status.

6.3.3 Der MSI/MMR-Status als Prognosefaktor

Insgesamt konnte die Mehrzahl der Studien beim Vorliegen eines MSI-H/MMRD-Status nachweisen, dass dies einen positiven Einfluss auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben und das 5-Jahres-Krankheitsfreie-Überleben beim Kolonkarzinom hat (Guastadisegni et al. 2010; Klingbiel et al. 2015; Popat et al. 2005; Roth et al. 2010; Koenig et al. 2018; Böckelman et al. 2015).

In Bezug auf das Kolonkarzinom im UICC-Stadium II ist die Studienlage, trotz einer Vielzahl von verfügbaren retrospektiven Studien, weiterhin nicht eindeutig (Gkekas et al. 2017).

Bezüglich des Endpunktes 5-Jahres-Gesamtüberleben ergab sich in Assoziation mit dem MSI-H/MMRD-Status im hier untersuchten Patientenkollektiv kein Überlebensvorteil. Bezüglich des Endpunktes 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben ergab sich beim Vorliegen des MSI-H/MMRD-Status lediglich ein nicht signifikanter Überlebensvorteil. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben berechnete sich bei Tumoren mit MSI-H/MMRD-Status auf 91 %. Im Gegensatz dazu errechnete sich das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben bei Tumoren mit einem MSS/MMRP-Status auf 80 %.

In einer Metaanalyse von Popat et al. wurden Patienten mit Kolonkarzinomen aller Stadien (I-IV) auf die Assoziation des MSI-H/MMRD-Status mit der Prognose untersucht. Bezüglich der Endpunkte Gesamtüberleben und Progressionsfreies-Überleben zeigte sich bei Patienten mit einem MSI-H/MMRD-Status eine insgesamt bessere Prognose. Allerdings fehlt in dieser Metaanalyse eine isolierte Subgruppenanalyse für das Stadium II (Popat et al. 2005). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Guastadisegni et al. in einer weiteren Metaanalyse. Es konnte erneut eine Assoziation zwischen dem MSI-H/MMRD-Status und einer besseren Prognose bezüglich des 5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-

Krankheitsfreien-Überleben gezeigt werden. Allerdings erfolgte auch in dieser Studie keine getrennte Subgruppenanalyse für das Stadium II. Bei einer genaueren Betrachtung der, in die beiden Metaanalysen von Popat et al. und Guastadisegni et al., eingeschlossenen Studien zeigt sich, dass der ‚protektive Effekt‘ des MSI-H/MMRD-Status, wenn vorhanden, eher schwach ausgeprägt ist (Ryan et al. 2017).

In einer weiteren Publikation wurden 6964 Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II bezüglich des prognostischen Wertes des MSI/MMR-Status untersucht. Der MSI-H/MMRD-Status war in dieser Studie, unabhängig von anderen Faktoren mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert (HR 0,69; 95% CI 0,54-0,89; $p = 0,004$) (Koenig et al. 2018).

Das Ergebnis der Überlebenszeitanalyse im hier untersuchten Patientenkollektiv spiegelt wieder, dass der Nutzen einer Bestimmung vom MSI/MMR-Status beim Kolonkarzinom im Stadium II eingeschränkt ist.

Erstens ist die Interpretation der aktuellen Studienlage für die prognostische Bedeutung des MSI/MMR-Status beim Kolonkarzinom mit Einschränkungen verbunden. Es werden, wie oben bereits beschrieben, häufig Tumoren im Stadium II und Stadium III gemeinsam untersucht. Um den Stellenwert des MSI-H/MMRD-Status im Stadium II des Kolonkarzinoms genauer zu untersuchen führten Ggekas et al. eine weitere Metaanalyse durch (Ggekas et al. 2017). In diese Analyse wurden nur Studien eingeschlossen, die eine getrennte Analyse mit Patienten mit Kolonkarzinomen im Stadium II aufzeigten. Die Auswertung von Ggekas et al. schloss rund 6000 Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II ein. Hierbei konnte keine signifikante Assoziation zwischen MSI-Status und den Endpunkten Gesamtüberleben oder Krankheitsfreiem-Überleben gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Metaanalyse sind allerdings nur eingeschränkt repräsentativ, da ein hoher Anteil adjuvant therapierter Patienten in die Analyse eingeschlossen wurde. Durch die Gabe einer adjuvanten Chemotherapie könnte der prognostische Effekt von MSI-H/MMRD abgemildert worden sein, da Patienten mit einem MSS/MMRP-Status von der adjuvanten Therapie profitiert haben könnten, während Patienten mit MSI-H/MMRD-Status durch die adjuvante Chemotherapie nicht profitierten.

Zweitens stellt der MSI-H/MMRD-Status beim Kolonkarzinom im Stadium II einen relativ schwachen Prognosemarker dar (Ryan et al. 2017). Für die alleinige Fragestellung ob von der Bestimmung des MSI-H/MMRD-Status eine prognostische Bedeutung ausgeht, wären also deutlich höhere Fallzahlen notwendig gewesen. Allerdings war dies auch nicht die zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie, da hierbei die kombinierte Bestimmung des CDX2-Status und des MSI-H/MMRD-Status im Fokus stand. Die Aufarbeitung der Fragestellung, ob der MSI-H/MMRD-Status weiterhin als prognostischer Marker beim Kolonkarzinom im Stadium II Berücksichtigung finden sollte, wird nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten sein.

7 Gesamtergebnis

Die Hypothese dieser Studie lautete: „Ein negativer CDX2-Status ist beim Kolonkarzinom im Stadium II ein molekularer Marker für eine schlechte Prognose. Das parallele Vorliegen eines negativen CDX2- und MSS/MMRP-Status kann eine schlechte Prognose beim Kolonkarzinom im Stadium II noch besser antizipieren.“

Anhand der Ergebnisse des untersuchten Patientenkollektivs ist die isolierte Bestimmung des CDX2-Status als unabhängiger negativer prognostischer Biomarker nicht zu empfehlen. In der vorliegenden Studie konnte von n = 114 Patienten kein Patient mit der Kombination aus negativem CDX2-Status und MSS/MMRP-Status identifiziert werden. Eine Aussage, ob diese Kombination mit einer schlechteren Prognose einhergeht, kann somit nicht getroffen werden. In der vorliegenden Studie lag bei allen Tumoren mit einem negativen CDX2-Status gleichzeitig ein MSI-H/MMRD-Status vor.

Die Studienergebnisse bezüglich der prognostischen Wertigkeit eines negativen CDX2-Status beim Kolonkarzinom im Stadium II aus vorangegangenen Studien, u.a. von Dalerba et al., stellen sich sehr überzeugend dar (Dalerba et al. 2016). Die Ergebnisse der Studie von Dalerba et al., konnten jedoch in der vorgelegten Untersuchung nicht bestätigt werden.

Im Gegenteil bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie eher aktuelle Studien von Slik et al. und Ceccini et al, in denen ein negativer CDX2-Status nicht oder nur in Verbindung mit einem MSS/MMRP-Status von prognostischer Bedeutung war (Cecchini et al. 2019; Slik et al. 2019).

Um die Hypothese dieser Studie zu beantworten sind aus Sicht des Autors somit weitere, wenn möglich, größere, prospektiv angelegte Studien notwendig, welche die Kombination aus dem CDX2-Status und dem MSI/MMR-Status untersuchen.

Allerdings ist dies, ohne ein standardisiertes Vorgehen zur Bestimmung des CDX2-Status, aus Sicht des Autors dieser Studie, nicht sinnvoll. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Evaluation der Bestimmung des CDX2-Status wie oben beschrieben durch ein hohes Maß an Subjektivität geprägt. Zusätzlich ist die Bewertung bei heterogenen Expressionsmustern des CDX2-Status, welche in der vorliegenden Analyse den Großteil der CDX2-negativen Tumoren ausmachten, schwer zu objektivieren.

Der Autor dieser Studie sieht, unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage, in der Bestimmung des CDX2-Status, auch in Kombination mit dem MSI/MMR-Status keinen Zugewinn für Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II. Es ist davon auszugehen, dass zukünftige Studien, welche die prognostische Bedeutung des negativen CDX2-Status untersuchen, nur dann zu validen Ergebnissen kommen können, wenn es gelingt, die Standardisierung der Methodik zu verbessern. Dies betrifft, wie oben beschrieben, multiple Aspekte. Hiervon ist der

Umgang mit heterogenen Färbeergebnissen von zentraler Bedeutung. Weitere Aspekte bezüglich der Standardisierung der Untersuchung des CDX2-Status sind die Auswahl des Antikörper-Clon und der Umfang des untersuchten Tumormaterials.

8 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Identifizierung von Kolonkarzinom-Patienten im Stadium II mit hohem Rezidivrisiko ist ein bis dato ungelöstes Problem. Ein negativer CDX2-Status gilt beim Kolonkarzinom im Stadium II als wichtiger Marker für eine schlechte Prognose, während ein Ausfall der MMR-Proteine (MSI-H/MMRD-Status) als validierter positiver Prognosefaktor gilt. Der Nutzen einer kombinierten Bestimmung des CDX2-Status und des MSI/MMR-Status zur Einschätzung der Prognose beim Kolonkarzinom im Stadium II wurde bisher nicht ausreichend validiert.

Methodik: In der vorliegenden retrospektiven Studie wurden 114 Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II eingeschlossen. Der CDX2-Status und der Status der MMR-Proteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) wurde immunhistochemisch an den vorliegenden OP-Präparaten untersucht. Die Auswertung hinsichtlich des CDX2-Status erfolgte nach einem für die vorliegende Studie entworfenen binären Auswertungsschema. Für einen negativen CDX2-Status wurde eine Threshold von > 30 % negativer Tumorzellen festgelegt. In einer explorativen, retrospektiven Analyse wurden die Ergebnisse der Immunhistochemie klinisch-pathologischen Parametern und einer Überlebenszeitanalyse, mit den Endpunkten 5-Jahres-Gesamtüberleben und 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben, gegenübergestellt.

Ergebnisse: In die Analyse wurden 114 Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II eingeschlossen. Die mediane Dauer der Nachsorge betrug 88,5 Monate. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben im untersuchten Patientenkollektiv lag bei 89 %. Das 5-Jahres-Rezidivfreie-Überleben lag bei 94 %. Ein negativer CDX2-Status zeigte sich in 5,3 % (6/114) der Fälle. Ein negativer CDX2-Status war in der vorliegenden Studie nicht mit einem signifikant schlechteren 5-Jahres-Gesamtüberleben (CDX2-positiv = 89 % vs. CDX2-negativ 80%; $p = 0,581$) oder einem schlechteren 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben (CDX2-positiv = 94 % vs. CDX2-negativ 100 %; $p = 0,548$) assoziiert. Ein MSI-H/MMRD-Status zeigte sich in 28,9 % (33/114) der Fälle. Ein MSI-H/MMRD-Status war in der vorliegenden Studie nicht mit einem besseren 5-Jahres-Gesamtüberleben (MSI-H/MMRD = 87% vs. MSS/MMRP = 90 %; $p = 0,908$) oder einem signifikant besseren 5-Jahres-Rezidivfreien-Überleben (MSI-H/MMRD = 100 % vs. MSS/MMRP = 92 %; $p = 0,129$) assoziiert. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines negativen CDX2-Status und einem MSI-H/MMRD-Status ($p = 0,005$). Bei allen Tumoren mit einem negativen CDX2-Status lag parallel ein MSI-H/MMRD-Status vor.

Schlussfolgerung: Für Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II hatte die Bestimmung des CDX2-Status in der vorliegenden Studie keine prognostische Bedeutung. Auch die Kombination aus CDX2- und MSI/MMR-Status hatte in der

vorliegenden Studie keine signifikante prognostische Bedeutung. Um die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zu validieren sind weitere, wenn möglich prospektiv angelegte Studien notwendig. Bei zukünftigen Untersuchungen ist ein standardisiertes Vorgehen bei der Bestimmung des CDX2-Status unerlässlich.

9 Summary

BACKGROUND: The identification of stage II colon cancer patients with a high risk of recurrence is a problem that has not yet been solved. A negative CDX2 status is considered as a marker for a poor prognosis in stage II colon cancer, while a defect of the MMR proteins (MSI-H/MMRD) is a validated positive prognostic factor. The benefits of a combined determination of the MSI/MMR status and the CDX2 status to assess the prognosis for stage II colon cancer have not been sufficiently validated.

METHODS: In the present retrospective study, 114 patients with stage II colon cancer were included. The CDX2 status and the status of the MMR proteins (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) were examined immunohistochemically on the present surgical specimens. The CDX2 status was evaluated according to a binary evaluation scheme designed for the present study. A threshold of > 30 % negative tumor cells was defined for a negative CDX2 status. In an exploratory, retrospective analysis, the results of immunohistochemistry were correlated to the clinical and pathological parameters and a survival analysis with the endpoints 5-year-overall-survival (OS) and 5-year-recurrence-free-survival (RFS) was conducted.

Results: 114 patients with stage II colon cancer were included in the analysis. The median follow-up was 88.5 months. The OS in the examined patient population was 89 % while the DFS was 94 %.

The CDX2 status was negative in 5.3 % (6/114) of cases. A negative CDX2 status was not associated with a significantly worse OS (CDX2-positive = 89 % vs. CDX2-negative 80 %; $p = 0.581$) or a worse RFS (CDX2-positive = 94 % vs. CDX2-negative 100 %; $p = 0.548$) in the present study.

The MSI-H/MMRD status was seen in 28.9 % (33/114) of cases. An MSI-H/MMRD status was not associated with a better OS (MSI-H/MMRD = 87 % vs. MSS/MMRP = 90 %; $p = 0.908$) or a significantly better DFS (MSI-H/MMRD = 100 % vs. MSS/MMRP = 92 %; $p = 0.129$) in the present study. There was a statistically significant association between a negative CDX2 status and an MSI-H/MMRD status ($p = 0.005$). All tumors with a negative CDX2 status showed an MSI-H/MMRD status in parallel.

Conclusion: In the present study the determination of the CDX2 status was of no prognostic relevance for patients with stage II colon cancer. In the present study the combination of CDX2 and MSI/MMR also had no significant prognostic relevance. Further, if possible, prospective studies are necessary to validate these

results. A standardized procedure for determining the CDX2 status is essential for future examinations.

10 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
BRAF	proto-oncogene B-Raf- oder v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1- Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CDX2	Caudaltype-Homebox-Transcription-Factor 2
DAB	Diaminobenzidin
DFS	Desease Free Survival
FFPE	Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete
H2O2	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
MLH1	MutL-homolog-1
MMR	Mismatch-Repair
MMRD	Mismatch-Repair-Deficient
MMRP	Mismatch-Repair-Proficient
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität-High
MSS	Mikrosatelliten-Stabil
OS	Overall Survival
PMS2	Postmeiotic-Segregation-Increased 2
PNI	perineurale Invasion

PCR	Polymerase Chain Reaction
RKI	Robert Koch-Institut
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultra View
WHO	World Health Organization

11 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: TNM-KLASSIFIKATION KOLONKARZINOM (WITTEKIND 2017).....	6
TABELLE 2: STADIENEINTEILUNG KOLONKARZINOM NACH UICC 8. AUFLAGE (WITTEKIND 2017).....	8
TABELLE 3: GRADING KOLOREKTALER ADENOKARZINOME (WITTEKIND 2017).....	10
TABELLE 4: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ANTIKÖRPER, MENGE PRO PRÄPARAT UND INKUBATIONSZEITEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE DER MMR-PROTEINE.....	18
TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS NACH EPIDEMIOLOGISCHEN, KLINISCHEN UND PATHOLOGISCHEN CHARAKTERISTIKA.....	22
TABELLE 6: ENDPUNKTE UND HÄUFIGKEIT VON 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN UND 5-JAHRES-REZIDIVFREIES-ÜBERLEBEN WÄHREND DES GESAMTEN NACHSORGEZEITRAUMES.....	25
TABELLE 7: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES CDX2-STATUS IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV.....	28

12 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: HE-PRÄPARAT MIT DARSTELLUNG DES KOLONKARZINOM IM OBEREN BILDABSCHNITT. DIFFERENZIERUNGSGRAD G2. IM UNTEREN BILDABSCHNITT IST EIN ABSCHNITT NORMALER KOLONSCHEIMHAUT ABGEBILDET. 50-FACHE VERGRÖSSERUNG. (QUELLE: PROF. DR. GÜNTHER, PATHOLOGIE MVZ LADEMANNBOGEN).....	5
ABBILDUNG 2: MAKROSKOPISCHE DARSTELLUNG EINES KOLONKARZINOMS. DAS AUSMASS DER INFILTRATION ENTSPRICHT HIER EINEM T3-STADIUM (QUELLE: PROF. DR. GÜNTHER, PATHOLOGIE MVZ LADEMANNBOGEN).....	7
ABBILDUNG 3: FLUSSDIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DES AUSWAHLPROZESSES DER STICHPROBE VON N = 114 PATIENTEN, DIE IN DIE ANALYSE EINGESCHLOSSEN WURDEN.....	15
ABBILDUNG 4: BEISPIEL FÜR EIN REPRÄSENTATIVES TUMORPRÄPARAT (HE-FÄRBUNG). NEBEN VITALEM TUMORGEWEBE IM BEREICH DES TUMORRANDES ZEIGT SICH EIN ABSCHNITT MIT INTAKTER SCHLEIMHAUT. DIE UNAUFFÄLLIGE SCHLEIMHAUT DIENT IM RAHMEN DER AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE ALS INTERNE POSITIVKONTROLLE. 50-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	16
ABBILDUNG 5: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN LOKALER TUMORAUSSDEHNUNG UND DEM GESAMTÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT T3 TUMOREN BEI 90 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT T4-TUMOREN ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN VON 83% (GESTRICHELTE ROTE LINIE). DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNGEN IN BEZUG AUF DAS TUMORSTADIUM MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,849).....	23
ABBILDUNG 6: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN LOKALER TUMORAUSSDEHNUNG UND DEM 5-JAHRES-REZIDIVFREIEN-ÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT T3 TUMOREN BEI 94 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT T4-TUMOREN ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-REZIDIVFREIES-ÜBERLEBEN VON 100 % (GESTRICHELTE ROTE LINIE). DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNGEN IN BEZUG AUF DAS TUMORSTADIUM MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,579).....	24
ABBILDUNG 7: 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM UICC-STADIUM II. DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN NACH 60 MONATEN WIRD AUF 89 % BERECHNET (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN.....	25
ABBILDUNG 8: 5-JAHRES-REZIDIVFREIES-ÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM UICC-STADIUM II. DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN NACH 60 MONATEN WIRD AUF 94 % BERECHNET (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN.....	26
ABBILDUNG 9: KOLONKARZINOM NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER ANFÄRBUNG AUF CDX2. DIE POSITIVE HOMOGENE ANFÄRBUNG DER TUMORZELLEN SPRICHT FÜR EINE REGELRECHTE CDX2 EXPRESSION. ZUSÄTZLICH ZEIGT SICH EINE ANFÄRBUNG DER INTAKTEN KOLONSCHEIMHAUT ALS INTERNE POSITIVKONTROLLE. ZUDEM WIRD IN DIESER HOHEN AUFLÖSUNG DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANFÄRBUNG IM BEREICH DES ZELLKERNES, ALS ORT DER CDX2, EXPRESSION SICHTBAR. 200-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	27
ABBILDUNG 10: HETEROGENES EXPRESSIONSMUSTER EINES KOLONKARZINOMS NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER ANFÄRBUNG AUF CDX2. IN DIESEM TUMORABSCHNITT	

ZEIGEN SICH ZELLKERNE, IN DENEN EINE DEUTLICHE CDX2-ANFÄRBUNG ERFOLGT. DANEBEN ZEIGEN SICH JEDOCH > 30 % TUMORZELLEN, IN DENEN KEINE ANFÄRBUNG AUF CDX2 NACHGEWIESEN WERDEN KANN. 200-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	27
ABBILDUNG 11: KOLONKARZINOM NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER ANFÄRBUNG AUF CDX2. DIE FEHLENDE CDX2-ANFÄRBUNG DES KOLONKARZINOMS IN DEN TUMORZELLEN SPRICHT FÜR EINE AUSGEFALLENE CDX2-EXPRESSION. ZUSÄTZLICH ZEIGT SICH EINE ANFÄRBUNG DER INTAKTEN KOLONSCHLEIMHAUT ALS INTERNE POSITIVKONTROLLE IM RECHTEN BILDABSCHNITT. 50-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	28
ABBILDUNG 12: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM CDX2-STATUS UND DEM MSI-H/MMRD PHÄNOTYP IM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV (N = 114).....	29
ABBILDUNG 13: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HISTOLOGISCHEM DIFFERENZIERUNGSGRAD UND DEM CDX2-STATUS IM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV (N = 114).....	30
ABBILDUNG 14: BEZIEHUNG ZWISCHEN DER TUMORLOKALISATION UND DEM CDX2-STATUS IM UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIV (N=114). RECHTSSEITIGE TUMOREN SIND DEFINITIONSGEMÄSS PROXIMAL DER FLEXURA LIENALIS UND LINKSSEITIGE TUMOREN DISTAL DER FLEXURA LIENALIS GELEGEN.....	31
ABBILDUNG 15: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CDX2-STATUS UND DEM GESAMTÜBERLEBEN DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS (N =114) MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT EINEM POSITIVEM CDX2-STATUS BEI 89 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT NEGATIVEM CDX2-STATUS ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN VON 80 %. DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNG IN BEZUG AUF DEN CDX2-STATUS MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,581).....	32
ABBILDUNG 16: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CDX2-STATUS UND DEM 5-JAHRES-REZIDIVFREIEN-ÜBERLEBEN DES UNTERSUCHTEN PATIENTENKOLLEKTIVS (N = 114) MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT EINEM POSITIVEM CDX2-STATUS BEI 94 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT NEGATIVEM CDX2-STATUS ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-REZIDIVFREIES-ÜBERLEBEN VON 100 %. DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNG IN BEZUG AUF DEN CDX2-STATUS MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,548).	33
ABBILDUNG 17: KOLONKARZINOM NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER ANFÄRBUNG AUF MLH1. IN DIESER HÖHEREN VERGRÖSSERUNG WIRD DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANFÄRBUNG IM BEREICH DES ZELLKERNES ALS ORT DER MLH1 EXPRESSION SICHTBAR. 200-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	34
ABBILDUNG 18: KOLONKARZINOM NACH IMMUNHISTOCHEMISCHER ANFÄRBUNG AUF MLH1. DIE FEHLENDE MLH1-ANFÄRBUNG DER NUKLEI DER TUMORZELLEN DES KOLONKARZINOMS ZEIGT DIE AUSGEFALLENE MLH1-EXPRESSION. ALS INTERNE POSITIVKONTROLLE DIENTE DIE NUKLEÄRE ANFÄRBUNG DER INTAKTEN KOLONSCHLEIMHAUT UND IMMUNZELLEN. 200-FACHE VERGRÖSSERUNG.....	34
ABBILDUNG 19: FOLGENDES DIAGRAMM ZEIGT DIE HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES MSI/MMR-STATUS IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM UICC-STADIUM II.....	35
ABBILDUNG 20: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES POSITIVEN BZW. NEGATIVEN STATUS DER EINZELNEN MMR-PROTEINE (MLH1, MSH2, MSH6 UND PMS2).....	36
ABBILDUNG 21: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES AUSFALLES DER EINZELNEN MMR-PROTEINE INNERHALB DER GRUPPE DER TUMOREN MIT EINEM MSI-H/MMRD-STATUS.....	36

ABBILDUNG 22: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM MSI/MMR-STATUS UND DER TUMORLOKALISATION IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV VON N =114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II.....	37
ABBILDUNG 23: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HISTOLOGISCHEM DIFFERENZIERUNGSGRAD UND DEM MSI/MMR-STATUS IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II.	38
ABBILDUNG 24: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM MSI/MMR-STATUS UND DEM HISTOLOGISCHEN TYP IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II.....	39
ABBILDUNG 25: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM GESCHLECHT UND DEM MSI/MMR-STATUS IM VORLIEGENDEN PATIENTENKOLLEKTIV MIT N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM STADIUM II.....	40
ABBILDUNG 26: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MMR-STATUS UND DEM GESAMTÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM UICC-STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT MSI-H/MMRD-STATUS BEI 87 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT MSS/MMRP-STATUS ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-GESAMTÜBERLEBEN VON 90 % (GESTRICHELTE ROTE LINIE). DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNG IN BEZUG AUF DEN MSI-H/MMRD-STATUS MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,908).....	41
ABBILDUNG 27: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MSI/MMR-STATUS UND DEM 5-JAHRES-REZIDIVFREIEN-ÜBERLEBEN VON N = 114 PATIENTEN MIT KOLONKARZINOM IM UICC-STADIUM II. DIE SENKRECHTE LINIE BEI 60 MONATEN KENNZEICHNET DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN. DAS 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN LAG FÜR PATIENTEN MIT MSI-H/MMRD-STATUS BEI 100 % (GESTRICHELTE BLAUE LINIE). FÜR PATIENTEN MIT MSS/MMRP-STATUS ERGAB SICH EIN 5-JAHRES-REZIDIVFREIE-ÜBERLEBEN VON 92 % (GESTRICHELTE ROTE LINIE). DER VERGLEICH DER ÜBERLEBENSVERTEILUNG IN BEZUG AUF DEN MSI-H/MMRD-STATUS MITTELS LOG-RANK-TEST ERGAB KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (P = 0,129).....	42

13 Literaturverzeichnis

André, Thierry; Boni, Corrado; Mounedji-Boudiaf, Lamia; Navarro, Matilde; Tabernero, Josep; Hickish, Tamas et al. (2004): Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. In: *The New England journal of medicine* 350 (23), S. 2343–2351.

André, Thierry; Boni, Corrado; Navarro, Matilde; Tabernero, Josep; Hickish, Tamas; Topham, Clare et al. (2009): Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (19), S. 3109–3116.

André, Thierry; Gramont, Armand de; Vernerey, Dewi; Chibaudel, Benoist; Bonnetain, Franck; Tijeras-Raballand, Annemiläi et al. (2015): Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (35), S. 4176–4187.

André, Thierry; Shiu, Kai-Keen; Kim, Tae Won; Jensen, Benny Vittrup; Jensen, Lars Henrik; Punt, Cornelis et al. (2020): Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. In: *The New England journal of medicine* 383 (23), S. 2207–2218.

Baba, Yoshifumi; Noshō, Katsuhiko; Shima, Kaori; Freed, Ellen; Irahara, Natsumi; Philips, Juliet et al. (2009): Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (14), S. 4665–4673.

Bae, Jeong Mo; Lee, Tae Hun; Cho, Nam-Yun; Kim, Tae-You; Kang, Gyeong Hoon (2015): Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. In: *World journal of gastroenterology* 21 (5), S. 1457–1467.

Barbareschi, M.; Murer, B.; Colby, T. V.; Chilosi, M.; Macri, E.; Loda, M.; Doglioni, C. (2003): CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. In: *The American journal of surgical pathology* 27 (2), S. 141–149.

Beck, Felix; Stringer, Emma J. (2010): The role of Cdx genes in the gut and in axial development. In: *Biochemical Society transactions* 38 (2), S. 353–357.

Benson, Al B.; Schrag, Deborah; Somerfield, Mark R.; Cohen, Alfred M.; Figueredo, Alvaro T.; Flynn, Patrick J. et al. (2004): American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (16), S. 3408–3419.

Benvenuti, Silvia; Sartore-Bianchi, Andrea; Di Nicolantonio, Federica; Zanon, Carlo; Moroni, Mauro; Veronese, Silvio et al. (2007): Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. In: *Cancer research* 67 (6), S. 2643–2648.

Böckelman, Camilla; Engelmann, Bodil E.; Kaprio, Tuomas; Hansen, Torben F.; Glimelius, Bengt (2015): Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III. A systematic review and meta-analysis of recent literature. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 54 (1), S. 5–16.

Boland, C. Richard; Koi, Minoru; Chang, Dong K.; Carethers, John M. (2008): The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome. From bench to bedside. In: *Familial cancer* 7 (1), S. 41–52.

Borrisholt, Martine; Nielsen, Søren; Vyberg, Mogens (2013): Demonstration of CDX2 is highly antibody dependant. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 21 (1), S. 64–72.

Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer (2012). In: *Nature* 487 (7407), S. 330–337.

Cecchini, Matthew J.; Walsh, Joanna C.; Parfitt, Jeremy; Chakrabarti, Subrata; Correa, Rohann J.; MacKenzie, Mary J.; Driman, David K. (2019): CDX2 and Muc2 immunohistochemistry as prognostic markers in stage II colon cancer. In: *Human pathology* 90, S. 70–79.

Cicek, Mine S.; Lindor, Noralane M.; Gallinger, Steven; Bapat, Bharati; Hopper, John L.; Jenkins, Mark A. et al. (2011): Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 13 (3), S. 271–281.

Compton, C. C. (1999): Pathology report in colon cancer. What is prognostically important? In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 17 (2), S. 67–79.

Cuyle, Pieter-Jan; Prenen, Hans (2017): Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer. In: *Acta clinica Belgica* 72 (2), S. 103–115.

Dalerba, Piero; Sahoo, Debashis; Paik, Soonmyung; Guo, Xiangqian; Yothers, Greg; Song, Nan et al. (2016): CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. In: *The New England journal of medicine* 374 (3), S. 211–222.

Deutsches Krebsforschungszentrum (2020). Online verfügbar unter: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/was-ist-darmkrebs.php>. abgerufen: 04.12.2020.

Dietmaier, W.; Büttner, R.; Rüschoff, J. (2019): Mikrosatelliteninstabilität : Aktueller Überblick über Methoden und Anwendungen. In: *Der Pathologe* 40 (3), S. 313–327.

Douillard, Jean-Yves; Oliner, Kelly S.; Siena, Salvatore; Tabernero, Josep; Burkes, Ronald; Barugel, Mario et al. (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. In: *The New England journal of medicine* 369 (11), S. 1023–1034.

Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J. W. W.; Comber, H. et al. (2013): Cancer incidence and mortality patterns in Europe. Estimates for 40 countries in 2012. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (6), S. 1374–1403.

Fielding, L. P.; Arsenault, P. A.; Chapuis, P. H.; Dent, O.; Gathright, B.; Hardcastle, J. D. et al. (1991): Clinicopathological staging for colorectal cancer. An International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 6 (4), S. 325–344.

- Fountzilas, Elena; Kotoula, Vassiliki; Pentheroudakis, George; Manousou, Kyriaki; Polychronidou, Genovefa; Vrettou, Eleni et al. (2019): Prognostic implications of mismatch repair deficiency in patients with nonmetastatic colorectal and endometrial cancer. In: *ESMO open* 4 (2), e000474.
- Gill, Sharlene; Loprinzi, Charles L.; Sargent, Daniel J.; Thomé, Stephan D.; Alberts, Steven R.; Haller, Daniel G. et al. (2004): Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer. Who benefits and by how much? In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22 (10), S. 1797–1806.
- Gkekas, Ioannis; Novotny, Jan; Pecen, Ladislav; Strigård, Karin; Palmqvist, Richard; Gunnarsson, Ulf (2017): Microsatellite Instability as a Prognostic Factor in Stage II Colon Cancer Patients, a Meta-Analysis of Published Literature. In: *Anticancer research* 37 (12), S. 6563–6574.
- Guastadisegni, Cecilia; Colafranceschi, Mauro; Ottini, Laura; Dogliotti, Eugenia (2010): Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy. A meta-analysis of colorectal cancer survival data. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 46 (15), S. 2788–2798.
- Guinney, Justin; Dienstmann, Rodrigo; Wang, Xin; Reyniès, Aurélien de; Schlicker, Andreas; Soneson, Charlotte et al. (2015): The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. In: *Nature medicine* 21 (11), S. 1350–1356.
- Guo, Rong-Jun; Suh, Eun Ran; Lynch, John P. (2004): The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. In: *Cancer biology & therapy* 3 (7), S. 593–601.
- Hanna, Diana L.; Lenz, Heinz-Josef (2020): How we treat left-sided vs right-sided colon cancer. In: *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 18 (5), S. 253–257.
- Hansen, Torben Frøstrup; Kjær-Frifeldt, Sanne; Eriksen, Ann Christina; Lindebjerg, Jan; Jensen, Lars Henrik; Sørensen, Flemming Brandt; Jakobsen, Anders (2018): Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer. Results from two nationwide cohorts. In: *British journal of cancer* 119 (11), S. 1367–1373.
- Heervä, Eetu; Carpelan, Anu; Kurki, Samu; Sundström, Jari; Huhtinen, Heikki; Rantala, Arto et al. (2018): Trends in presentation, treatment and survival of 1777 patients with colorectal cancer over a decade: a Biobank study. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 57 (6), S. 735–742.
- Jestin, P.; Nilsson, J.; Heurgren, M.; Pålman, L.; Glimelius, B.; Gunnarsson, U. (2005): Emergency surgery for colonic cancer in a defined population. In: *The British journal of surgery* 92 (1), S. 94–100.
- Klingbiel, D.; Saridaki, Z.; Roth, A. D.; Bosman, F. T.; Delorenzi, M.; Tejpar, S. (2015): Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status. Results of the PETACC-3 trial. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 (1), S. 126–132.
- Aust, D; Baretton, G (2013). Sporadische Tumoren des Kolorektums. In: Pathologie. Verdauungstrakt und Peritoneum. 3., neubearb. Auflage. Klöppel, G; Kreipe, H.H; Remmele, W; Stolte, M; Rüschoff, J (2013). Berlin: Springer. S. 625.
- Koenig, Julie L.; Lin, Albert Y.; Pollom, Erqi L.; Chang, Daniel Tandel (2018): Microsatellite instability and adjuvant chemotherapy in stage II colon cancer. In: *JCO* 36 (4_suppl), S. 767.
- Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G. D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D. (2013): Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-

up. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 Suppl 6, S. 64-72.

Le Voyer, T. E.; Sigurdson, E. R.; Hanlon, A. L.; Mayer, R. J.; Macdonald, J. S.; Catalano, P. J.; Haller, D. G. (2003): Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed. A secondary survey of intergroup trial INT-0089. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (15), S. 2912–2919.

Li, Melissa K.; Folpe, Andrew L. (2004): CDX-2, a new marker for adenocarcinoma of gastrointestinal origin. In: *Advances in anatomic pathology* 11 (2), S. 101–105.

Liebig, Catherine; Ayala, Gustavo; Wilks, Jonathan; Verstovsek, Gordana; Liu, Hao; Agarwal, Neeti et al. (2009): Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (31), S. 5131–5137.

Lindor, Noralane M.; Burgart, Lawrence J.; Leontovich, Olga; Goldberg, Richard M.; Cunningham, Julie M.; Sargent, Daniel J. et al. (2002): Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (4), S. 1043–1048.

Mamounas, E.; Wieand, S.; Wolmark, N.; Bear, H. D.; Atkins, J. N.; Song, K. et al. (1999): Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer. Results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (5), S. 1349–1355.

Mayer, R; Modest, D; Stintzing, S (2020). Teil 04: Maligne Tumoren des unteren Gastrointestinaltraktes. In: *Harrisons Innere Medizin*, Suttorp, N; Möckel, M; Siegmund, B; Diemel, M; 20. Auflage, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2020. S. 709-716

McArdle, C. S.; McMillan, D. C.; Hole, D. J. (2006): The impact of blood loss, obstruction and perforation on survival in patients undergoing curative resection for colon cancer. In: *The British journal of surgery* 93 (4), S. 483–488.

McShane, L. M.; Altman, D. G.; Sauerbrei, W.; Taube, S. E.; Gion, M.; Clark, G. M. (2005): REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). In: *British journal of cancer* 93 (4), S. 387–391.

Messmann, H; Schnoy, E (2021). Kapitel 59 Kolorektales Karzinom. In: *Klinische Gastroenterologie*, 2. Auflage. Messmann, H. Georg Thieme Verlag KG. S. 509.

Mirkin, Katelin A.; Hollenbeak, Christopher S.; Mohamed, Ali; Jia, Yuxia; El-Deiry, Wafik S.; Messaris, Evangelos (2017): Impact of perineural invasion on survival in node negative colon cancer. In: *Cancer biology & therapy* 18 (9), S. 740–745.

Mouradov, Dmitri; Domingo, Enric; Gibbs, Peter; Jorissen, Robert N.; Li, Shan; Soo, Pik Ying et al. (2013): Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. In: *The American journal of gastroenterology* 108 (11), S. 1785–1793.

Nagtegaal, ID; Arends, MJ; Salto-Tellez, M (2019). Colorectal Adenokarcinoma. In: *WHO classification of tumours*. 5th Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer. S. 177-187.

NCCN Guidelines - Colon Cancer (2020): NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Colon Cancer - Version 4.2020 - June 15, 2020. Online verfügbar unter: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf (abgerufen am 14.11.2020).

NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer (1990). In: *JAMA* 264 (11), S. 1444–1450.

Nolte, Sarah; Zlobec, Inti; Lugli, Alessandro; Hohenberger, Werner; Croner, Roland; Merkel, Susanne et al. (2017): Construction and analysis of tissue microarrays in the era of digital pathology: a pilot study targeting CDX1 and CDX2 in a colon cancer cohort of 612 patients. In: *The journal of pathology. Clinical research* 3 (1), S. 58–70.

O'Connell, Jessica B.; Maggard, Melinda A.; Ko, Clifford Y. (2004): Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. In: *Journal of the National Cancer Institute* 96 (19), S. 1420–1425.

O'Connor, Erin S.; Greenblatt, David Yu; LoConte, Noelle K.; Gangnon, Ronald E.; Liou, Jinn-Ing; Heise, Charles P.; Smith, Maureen A. (2011): Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (25), S. 3381–3388.

Olsen, J.; Espersen, M. L. M.; Jess, P.; Kirkeby, L. T.; Troelsen, J. T. (2014): The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer. A qualitative systematic review. In: *Surgical oncology* 23 (3), S. 167–176.

Parc, Y.; Gueroult, S.; Mourra, N.; Serfaty, L.; Fléjou, J-F; Tiret, E.; Parc, R. (2004): Prognostic significance of microsatellite instability determined by immunohistochemical staining of MSH2 and MLH1 in sporadic T3N0M0 colon cancer. In: *Gut* 53 (3), S. 371–375.

Petrelli, Fausto; Tomasello, Gianluca; Borgonovo, Karen; Ghidini, Michele; Turati, Luca; Dallera, Pierpaolo et al. (2017): Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis. In: *JAMA oncology* 3 (2), S. 211–219.

Pietrantonio, Filippo; Petrelli, Fausto; Coinu, Andrea; Di Bartolomeo, Maria; Borgonovo, Karen; Maggi, Claudia et al. (2015): Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab. A meta-analysis. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 51 (5), S. 587–594.

Pilati, C.; Taieb, J.; Balogoun, R.; Marisa, L.; Reyniès, A. de; Laurent-Puig, P. (2017): CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (5), S. 1032–1035.

Popat, S.; Hubner, R.; Houlston, R. S. (2005): Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (3), S. 609–618.

Puccini, Alberto; Berger, Martin D.; Zhang, Wu; Lenz, Heinz-Josef (2017): What We Know About Stage II and III Colon Cancer. It's Still Not Enough. In: *Targeted oncology* 12 (3), S. 265–275.

QUASAR Collaborative (2007): Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer. A randomised study. In: *The Lancet* 370 (9604), S. 2020–2029.

Ribic, Christine M.; Sargent, Daniel J.; Moore, Malcolm J.; Thibodeau, Stephen N.; French, Amy J.; Goldberg, Richard M. et al. (2003): Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. In: *The New England journal of medicine* 349 (3), S. 247–257.

Rigau, Valérie; Sebbagh, Nicole; Olschwang, Sylviane; Paraf, François; Mourra, Najat; Parc, Yann; Flejou, Jean-François (2003): Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 correction of hMLH6 immunostaining. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 127 (6), S. 694–700.

Robert Koch-Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016. Hg. v. Robert Koch-Institut 2016. Online verfügbar unter: www.krebsdaten.de/krebsbericht. [abgerufen am: 25.02.2017].

Robert Koch-Institut (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2019. S.17 und S. 38

Roth, Arnaud D.; Tejpar, Sabine; Delorenzi, Mauro; Yan, Pu; Fiocca, Roberto; Klingbiel, Dirk et al. (2010): Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer. Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (3), S. 466–474.

Ryan, E.; Sheahan, K.; Creavin, B.; Mohan, H. M.; Winter, D. C. (2017): The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer. A rationale for routine testing. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 116, S. 38–57.

S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. Online verfügbar unter: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 25.02.2021].

Sargent, Daniel J.; Marsoni, Silvia; Monges, Genevieve; Thibodeau, Stephen N.; Labianca, Roberto; Hamilton, Stanley R. et al. (2010): Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (20), S. 3219–3226.

Skandcke, Matthew; Arnott, Suzanne M.; Amdur, Richard L.; Siegel, Robert S.; Obias, Vincent J.; Umapathi, Bindu A. (2019): Lymphovascular Invasion and Perineural Invasion Negatively Impact Overall Survival for Stage II Adenocarcinoma of the Colon. In: *Diseases of the colon and rectum* 62 (2), S. 181–188.

Slik, Khadija; Turkki, Riku; Carpén, Olli; Kurki, Samu; Korkeila, Eija; Sundström, Jari; Pellinen, Teijo (2019): CDX2 Loss With Microsatellite Stable Phenotype Predicts Poor Clinical Outcome in Stage II Colorectal Carcinoma. In: *The American journal of surgical pathology* 43 (11), S. 1473–1482.

Søreide, Odd; Norstein, Jarle; Fielding, L. Peter; Silen, William (1997): International Standardization and Documentation of the Treatment of Rectal Cancer. In: O. Søreide und Jarle Norstein (Hg.): *Rectal cancer surgery. Optimisation, standardisation, documentation*. Berlin, New York: Springer, S. 405–445.

Tomasello, Gianluca; Barni, Sandro; Turati, Luca; Ghidini, Michele; Pezzica, Ezio; Passalacqua, Rodolfo; Petrelli, Fausto (2018): Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *Clinical colorectal cancer* 17 (2), S. 97–103.

Touchefeu, Yann; Provost-Dewitte, Marie; Lecomte, Thierry; Morel, Alain; Valo, Isabelle; Mosnier, Jean-François et al. (2016): Clinical, histological, and molecular risk factors for cancer recurrence in patients with stage II colon cancer. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 28 (12), S. 1394–1399.

Ulanja, Mark B.; Rishi, Mohit; Beutler, Bryce D.; Sharma, Mokshya; Patterson, Darryll R.; Gullapalli, Nageshwara; Ambika, Santhosh (2019): Colon Cancer Sidedness, Presentation, and Survival at Different Stages. In: *Journal of oncology* 2019, S. 4315032.

Umar, Asad; Boland, C. Richard; Terdiman, Jonathan P.; Syngal, Sapna; La Chapelle, Albert de; Rüschoff, Josef et al. (2004): Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. In: *Journal of the National Cancer Institute* 96 (4), S. 261–268.

van Wyk, H. C.; Going, James; Horgan, Paul; McMillan, Donald C. (2017): The role of perineural invasion in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 112, S. 11–20.

Venderbosch, Sabine; Nagtegaal, Iris D.; Maughan, Tim S.; Smith, Christopher G.; Cheadle, Jeremy P.; Fisher, David et al. (2014): Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (20), S. 5322–5330.

Wittekind, C (2017). Kolon- und Rektum. In: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim. S. 97-102.

Zagrapan, Branislav; Offner, Felix A. (2020): Spontane, hereditäre und CED-assoziierte Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. In: *J. Gastroenterol. Hepatol. Erkr.* 18 (2), S. 39–48.

Zlobec, Inti; Terracciano, Luigi; Jass, Jeremy R.; Lugli, Alessandro (2007): Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 451 (4), S. 763–769.

14 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Andreas de Weerth danke ich für die Möglichkeit, die hier vorgelegte Arbeit an der Klinik für Innere Medizin des Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg durchzuführen und die ziel- und lösungsorientierte Unterstützung während der gesamten Zeit.

Prof. Dr. Thomas Günther und Prof. Dr. Sören Schröder (Pathologie MVZ Lademannbogen) gilt mein Dank für die Mitgestaltung und intensive Diskussion der Fragestellungen. Insbesondere Prof. Dr. Thomas Günther hat mich während der Erstellung der Histopathologien angeleitet. Ich danke ihm besonders für die zeitaufwändige Hilfe bei der Entwicklung der Auswertungskriterien und der Auswertung der immunhistochemischen Präparate selbst. Die abschließende Diskussion und die konstruktive Kritik bei der Ausarbeitung der Dissertation war sehr fruchtbar. Auch dafür gilt ihm mein besonderer Dank.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen und Herrn Daniel Wagener der Pathologie MVZ Lademannbogen danke ich für die Kooperation, technische Assistenz und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Materials.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Juhl, Frau Dr. Frauke Koch, Frau Kerstin Linden, Herrn Dr. Ronald Carter und Frau Dr. Susanne Arbogast von der Firma Indivumed danke ich für die immerwährende Unterstützung hinsichtlich der Korrelation der pathologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten.

Besonders danke ich hier Frau Alexandra Höller vom Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Prof. Dr. Karsten Zornig (Chirurgische Klinik des Isreatisches Krankenhaus, Hamburg) und Herr PD Dr. Uwe Roblick (Chirurgische Klinik des Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg) haben die Arbeit durch Erlaubnis der Verwendung der klinischen Daten Ihrer Patienten unterstützt. Ihnen gilt mein besonderer Dank.

Ich danke meinen Eltern und speziell meinem Vater Henning dafür, dass er diese Arbeit von Beginn an beratend begleitet hat. Abschließend möchte ich von ganzem Herzen meiner Ehefrau Katja danken. Nur durch Deine moralische und motivierende Unterstützung ist es mir möglich gewesen diese Arbeit zu vollenden.

15 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

16 Eidesstattliche Versicherung

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: