

**Regulation der humanen Leukozytenantigen-A Expression durch den
Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg im Kolonkarzinom**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jacqueline Geist

geboren am 08.08.1995 in Mainz

Betreuer: Prof. Dr. Christoph Michalski

Gutachter: PD Dr. S. Krug

Prof. Dr. I. E. Demir, München

14.09.2021

13.10.2022

Referat

Im Jahr 2016 wurde bei 32.300 Männern und 25.990 Frauen in Deutschland die Diagnose kolorektales Karzinom gestellt. Es ist damit die zweithäufigste maligne Erkrankung bei Männern, die dritthäufigste bei Frauen und allgemein die achthäufigste Krebserkrankung in Deutschland (Robert Koch-Institut 2016). Die Diagnose kolorektales Karzinom wird im Laufe des Lebens bei einem von 17 Männern und einer von 20 Frauen gestellt, wobei etwa zwei Drittel der Tumore im Kolon und ein Drittel im Rektum lokalisiert sind.

Die meisten bösartigen Merkmale von Tumorzellen werden durch aktivierte Onkogene und den Verlust von Tumorsuppressoren aufgrund von Mutationen oder epigenetischer Inaktivierung ausgelöst. Doch auch Mechanismen der Erkennung und Elimination von Zellen durch das Immunsystem werden immer häufiger diskutiert. Das Immunsystem ist in der Lage, nicht nur Krankheitserreger, sondern auch pathogene Körperzellen wie Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Doch oft können Tumorzellen das Immunsystem umgehen. Als Folge wachsen und proliferieren sie ungestört weiter und es entsteht ein Tumor.

Es gibt immer mehr Beweise dafür, dass eine Tumorprogression nicht aufgrund eines Defekts oder einer Verschlechterung des Immunsystems auftritt, sondern dass Tumorzellen vielmehr verschiedene Strategien entwickeln, um der Immunerkennung zu entkommen. MHC-Antigene sind Moleküle, die auf die Kommunikation mit dem T-Zellrezeptor, einem Teil des spezifischen Immunsystems, und NK-Liganden, einem Teil des unspezifischen Immunsystems, spezialisiert sind. Jede Änderung des MHC-Profiles kann daher einen starken Einfluss auf die Immunerkennung und die Immunreaktion gegenüber Tumorzellen haben.

In dieser Arbeit wird der Fragestellung nachgegangen, ob der MAPK-Signalweg einen Einfluss auf die Exprimierung von MHC-Klasse-I-Molekülen von Tumorzellen in Kolonkarzinomgeweben des Menschen hat.

Teilt man das Kolon auf Grundlage des embryologischen Ursprungs in einen rechten und einen linken Teil, so fallen unterschiedliche physiologische Merkmale auf. In neuesten Studien wurde von Unterschieden in klinischen, pathologischen und genetischen Merkmalen des Kolonkarzinoms berichtet. Die aktuelle Datenlage erlaubt jedoch weder Rückschlüsse auf etwaige Ursachen der unterschiedlichen Verteilung klinischer und histopathologischer Merkmale zwischen rechter und linker Seite, noch auf Hintergründe der unterschiedlichen Prognose rechtsseitiger und linksseitiger Kolonkarzinome (Jung u. a. 2017). Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die Unterschiede zwischen rechts- und linksseitigem Kolonkarzinom in Bezug auf die HLA-Exprimierung und den MAPK-Signalweg zu analysieren.

Geist, Jacqueline: Regulation der humanen Leukozytenantigen-A Expression durch den Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weg im Kolonkarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 66 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Kolorektales Karzinom	1
1.1.1. Definition und anatomischer Aufbau	1
1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie	2
1.1.3. Risikofaktoren	3
1.1.4. Klassifikation und klinische Pathologie	3
1.1.5. Histologie	5
1.1.6. Vorsorge/ Früherkennung	6
1.1.7. Diagnose	6
1.1.7.1. Übersicht	6
1.1.7.2. Molekularbiologische Diagnostik	7
1.1.8. Therapie	7
1.2. Aspekte der molekularen Karzinogenese	9
1.2.1. Aktivierung von Protoonkogenen	9
1.2.2. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen	10
1.2.3. Mikrosatelliteninstabilität als Resultat defizienter Reparaturgene	11
1.2.4. Cycline als Zellzyklus-regulierende Protoonkogene	11
1.3. Differenzierung von rechts- und linksseitig-lokalisierten Tumoren	12
1.4. Allgemeine Informationen zu HNPCC	13
1.5. MAPK-Weg	14
1.6. HLA	16
2. Zielstellung	19
3. Material und Methoden	21
3.1. Materialien	21
3.1.1. Antikörper	21
3.1.2. Chemikalien	21
3.1.3. Gewebeschnitte	22
3.1.4. Klassifikation	22
3.1.5. Objektträger	23
3.1.6. Färbekits	23
3.1.7. Geräte	24
3.2. Erarbeitung der Färbeprotokolle	24
3.3. Präparation der Paraffinschnitte	24

3.3.1.	Zuschnitt	24
3.3.2.	Entparaffinierung und Rehydratisierung	24
3.4.	Vorbehandlung des histologischen Materials	25
3.5.	Färbeprotokolle	25
3.5.1.	LSAB-Methode	25
3.5.2.	Färbeprotokoll p-Erk nach der LSAB – Methode	26
3.5.3.	Färbeprotokoll HLA-A nach der LSAB-Methode	27
3.6.	Histologische Auswertung	28
3.7.	Statistische Auswertung	29
3.8.	Patientendaten	29
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	31
4.1.1.	Übersicht	31
4.1.2.	HLA	32
4.1.3.	p-Erk	33
4.1.4.	Positivkontrollen	33
4.2.	Patientenkollektiv	34
4.3.	Zusammengefasst	37
4.4.	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	38
5.	Diskussion	52
5.1.	Beurteilung der Methodik	52
5.1.1.	Beurteilung des Materials	52
5.1.2.	Beurteilung der qualitativen Färbeergebnisse	52
5.1.3.	Beurteilung der quantitativen Auswertung	53
5.1.4.	Beurteilung der statistischen Auswertung	53
5.2.	Beurteilung der Ergebnisse	53
5.3.	Ausblick	54
5.4.	Niereninsuffizienz als Risikofaktor für das kolorektale Karzinom anhand aktueller Studienlage	55
5.5.	Einfluss einer positiven Familienanamnese auf die HLA-A- Exprimierung von Tumorzellen des Darmkrebses	56
5.6.	Korrelation zwischen dem MAPK-Signalweg und der HLA-A- Exprimierung	57

6.	Zusammenfassung	59
7.	Literaturverzeichnis	60
8.	Thesen	65

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Englische Bezeichnungen sind *kursiv* gedruckt.

Abb.	Abbildung
AFAP	attenuierter familiäre adenomatöse Polyposis
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
APC	Antigen- präsentierende Zelle
art.	arteriell
BMI	<i>body mass index</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEA	carcinoembryonales Antigen
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FOLFOX	Therapie-Regime aus Fluorouracil (FU), Folinsäure (FS) und Oxaliplatin
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin- Eosin
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HNPCC	hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
HRP	Peroxidase gewonnen aus dem Meerrettich
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
ILT4	<i>Immunoglobulin like transcript 4</i>
Inkl.	inklusive
Exkl.	exklusive
engl.	englisch
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Protein (MAP) – Kinase
HLA	humane Leukozytenantigen
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
IRS	Immunreaktive Score
K-Ras	<i>Kirstin rat sarcoma</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	<i>Natural Killer</i>

Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
MEK 1/2	MAPK/Erk-Kinase
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
p-Erk	phosphorylierte extrazellulär signalregulierte Kinase
pos.	positiv
KHK	koronare Herzerkrankung
LK	Lymphknoten
LSAB-Methode	<i>Labeled (Strept) Avidin- Biotin- Methode</i>
MMR- Gen	<i>Mismatch- Repair- Gen</i>
Neg.	negativ
o.n.A.	ohne nähere Angabe[n]
o.	oder
d.h.	das heißt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
NaCl	Natriumchlorid
HCl	Salzsäure
l	Liter
ml	Milliliter
pRb	Retinoblastom- Protein
Rb	Retinoblastom
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
sog.	Sogenannt
TIA	transitorische ischämische Attacke
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

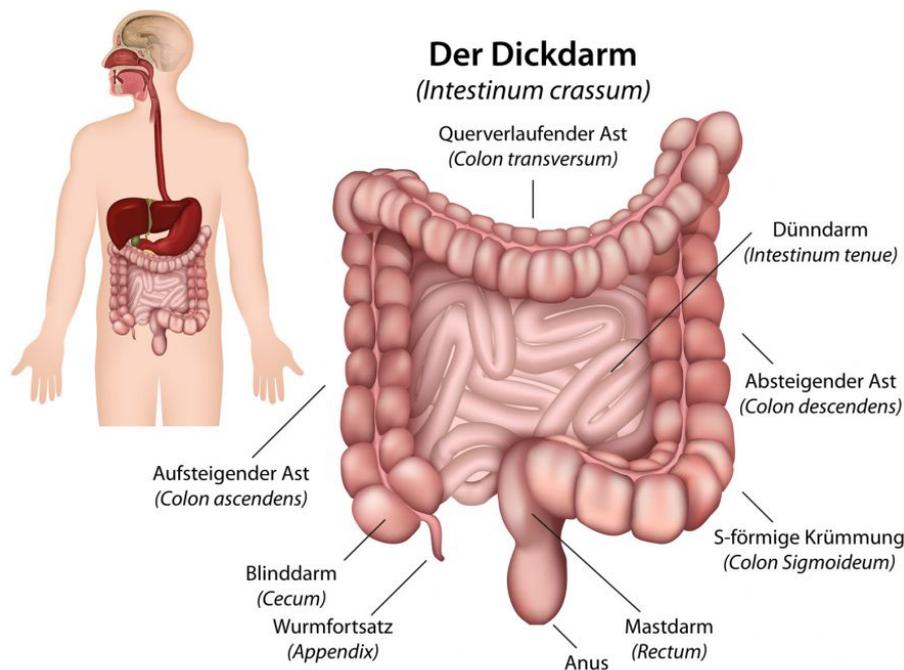


Abbildung 1: Darstellung des Kolons (Quelle: ©bbilderzweg/Fotolia, <https://www.leading-medicine-guide.de/Innere-Organ/Enddarmkrebs>, 05/2020)

1.1. Kolorektales Karzinom

1.1.1. Definition und anatomischer Aufbau

Das Kolon lässt sich mit einer Länge von 1,50 m makroskopisch, von oral nach aboral betrachtet, in Zäkum, Kolon ascendens, Kolon transversum, Kolon descendens und Kolon sigmoideum unterteilen. Die Flexura coli dextra befindet sich am Übergang von Colon ascendens zu Kolon transversum und die Flexura coli sinistra am Übergang vom Kolon transversum zum absteigenden Kolon. Diese Grenzen sind von anatomischer Bedeutung.

Für das Kolon charakteristische Merkmale sind die Taenia libera, Taenia mesocolica und Taenia omentalis, welche Verdickungen in der äußeren Längsmuskelschicht sind und an denen Fettanhängsel, sogenannte Appendices epiploicae, hängen. Zudem treten im Inneren des Darmlumens zirkuläre Plicae semilunares auf, zwischen denen Aussackungen, sogenannte Haustren, zu erkennen sind (Aumüller 2007).

Der Dickdarm hat hauptsächlich die Funktion, den Speisebrei durch Rückresorption von Wasser und Elektrolyten einzudicken, wohingegen der Dünndarm Nährstoffe aufspaltet und resorbiert.

Außerdem produziert das Kolon Mukus, welcher den Speisebrei gleitfähig macht. Das Kolon weist die größte Bakteriendichte innerhalb des menschlichen Körpers auf.

Der Darminhalt wird durch Kontraktionen der Muskelschichten erreicht, insbesondere durch propulsive Bewegungen, welche eine von oral nach aboral gerichtete Defäkation erlauben.

Laut Union Internationale contre le cancer (UICC) werden Kolonkarzinome als Tumore definiert, welche zwischen der Ileozökalklappe und dem Rektum lokalisiert sind. Rektumkarzinome werden als Tumore definiert, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist (Wittekind und Oberschmid 2010).

Die große Mehrzahl der Kolonkarzinome gehen von den Drüsenzellen der Tunica mucosa aus und werden daher als Adenokarzinome bezeichnet (Robert Koch-Institut 2016).

1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Das Kolonkarzinom ist bei Frauen der zweit- und bei Männern der dritthäufigste maligne Tumor in den deutschsprachigen Ländern. Jährlich werden bei etwa 32.300 Männern und 25.990 Frauen in Deutschland ein kolorektales Karzinom diagnostiziert (Robert Koch-Institut 2016). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 70-75 Jahren. Das mediane Sterbealter liegt bei 76 Jahren (Männer) bzw. 81 Jahren (Frauen) (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019). Etwa zwei Drittel aller kolorektalen Karzinome betreffen das Kolon. Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 52% angegeben, die relative Überlebensrate, welche die Sterblichkeit in der Allgemeinbevölkerung berücksichtigt, liegt bei 63% (the GEKID Cancer Survival Working Group u. a. 2012).

Seit etwa 2003 ist ein Rückgang der Erkrankungsrate im Kolon descendens und Rektum zu erkennen. Für das Kolon ascendens und Kolon transversum haben sich die Erkrankungsrate nach vorhergehendem Anstieg jedoch stabilisiert (Robert Koch-Institut 2016).

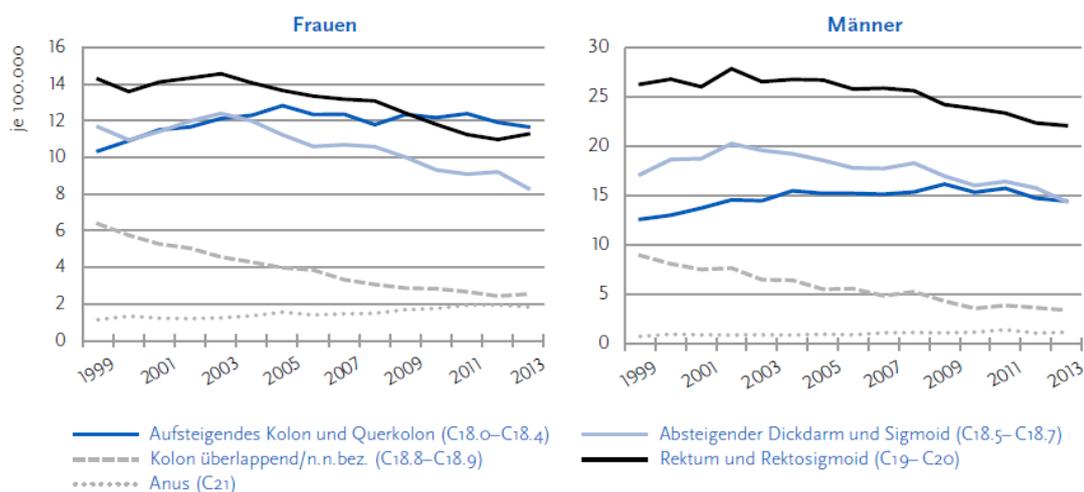


Abbildung 2: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten, Darmkrebs (ICD-10 C18 – C20) nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland (ausgewählte Register). 1999-2013. (Robert Koch-Institut 2016)

1.1.3. Risikofaktoren

Folgende Faktoren erhöhen das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken:

1. definierte genetische Krankheitsbilder, z.B.:
 - das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC, Lynch Syndrom)
 - Adenomatöse Polyposis-Syndrome (Patienten mit klassischer familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), Patienten mit attenuierter familiärer adenomatöser Polyposis (AFAP), Patienten mit MUTYH-assoziiierter Polyposis (MAP)) (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).
2. anamnestisch genetische Belastung (Verwandte ersten Grades von Patienten, bei denen ein kolorektales Karzinom oder ein kolorektales Adenom vor dem 50. Lebensjahr nachgewiesen wurde) (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).
3. kolorektale Adenome als Vorläufer sporadischer Karzinome (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).
4. chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa) (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).
5. Toxika wie Rauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum (Bertz, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, und Robert-Koch-Institut 2006).
6. Ernährung (ballaststoffarm, fettreich, hoher Anteil an rotem Fleisch) (Bertz, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, und Robert-Koch-Institut 2006).
7. Lebensstil (Adipositas, Bewegungsmangel) (Bertz, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, und Robert-Koch-Institut 2006).

1.1.4. Klassifikation und klinische Pathologie

Die Klassifikation des Primärtumors erfolgt laut der UICC (Stand 2017) auf Basis der TNM-Kriterien. Tabelle 1 fasst diese Einteilung zusammen. Das T-Stadium beschreibt dabei die Größe bzw. Infiltrationstiefe des Primärtumors, das N-Stadium klassifiziert den Befall der Lymphknoten und das M-Stadium gibt Auskunft über das Vorhandensein von Fernmetastasen. Dabei sind die T-Stadien so definiert, dass bei T1 der Tumor die Submukosa infiltriert, bei T2 die Muscularis propria, bei T3 die Subserosa oder das perikolische bzw. perirektale Fettgewebe und bei T4 das viszerale Peritoneum (T4a) oder andere Organe/ Strukturen (T4b) infiltriert.

Tabelle 1: Übersicht über Stadien der TNM-Klassifikation

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1,T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-2	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIB	T3-4	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
	T2-3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T1-2	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
IIIC	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3-T4a	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T4b	N1-2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ o. einer Lokalisation ohne Peritonealbefall)
IVB	jedes T	jedes N	M1b (Fernmetastasen in zwei o. mehr Organen o. Lokalisationen ohne Peritonealbefall)
IVC	jedes T	jedes N	M1c (Peritonealbefall mit o. ohne Fernmetastasen in anderen Organen o. Lokalisationen)

In Hinblick auf weitere therapeutische Konsequenzen bei komplett entfernten pT1-Karzinomen wird eine zusammenfassende Klassifikation in „Low-risk“ (G1, G2 und keine Lymphgefäßeinbrüche) oder „High-risk“ (G3, G4, und/ oder Lymphgefäßeinbrüche (L1)) durchgeführt.

95% der kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome, die sich vor allem aus Adenomen, aber auch aus Epitheldysplasien entwickeln. Zwischen dem Beginn der Adenomentstehung und der karzinomatösen Entartung liegen meist 10 Jahre. Für die Entwicklung vom Normalgewebe über das Adenom und die intraepitheliale Dysplasie bis hin zum Karzinom (Adenom-Karzinom-Sequenz) sind mehrere genetische Veränderungen notwendig (Ackermann 2014).

80% der Adenokarzinome sind Low-Grade-Karzinome (G1, G2) mit histologisch tubulären, azinären, kribriformen oder papillären Strukturen. Zu den High-Grade-Karzinomen (G3, G4)

zählen das muzinöse Adenokarzinom, das Siegelringkarzinom und das undifferenzierte Adenokarzinom.

Die restlichen 5% der kolorektalen Karzinome sind Plattenepithelkarzinome, Leiomyosarkome, maligne Karzinoide, maligne Melanome und intestinale Kaposi-Sarkome (Ackermann 2014).

1.1.5. Histologie

Die Dickdarmschleimhaut lässt sich histologisch in mehrere Schichten unterteilen. Die Tunica mucosa, bestehend aus zahlreichen, dicht nebeneinanderstehenden Krypten mit vielen Enterozyten und schleimbildenden Becherzellen, liegt dem Lumen am nächsten. Direkt danach kommt eine dünne Muscularis mucosae, gefolgt von einer Tela submucosa mit zahlreichen Lymphfollikeln. Zuletzt gibt es die Muscularis externa, bestehend aus dem Stratum circulare und Stratum longitudinale.

Neben dem normalen Epithel und der zahlreichen Becherzellen gibt es sogenannte Kolonozyten, welche kurze Mikrovilli besitzen und NaCl und Wasser resorbieren.

Kolonkarzinome lassen sich auf histologischer Ebene in mehrere Subtypen unterteilen (Aaltonen u. a. 2000):

- Klassisches Adenokarzinom
- Muzinöses Adenokarzinom
- Siegelringzellkarzinom
- Medulläres Karzinom
- Adenosquamöses Karzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Kleinzelliges Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom

Die klassischen Adenokarzinome machen mit rund 90% die Mehrheit der Kolonkarzinome aus. Sie zeigen eine typisch drüsige Konfiguration und sind charakterisiert durch die Karzinominvasion durch die Muskelmukosa in die Submukosa. Muzinöse Adenokarzinome sind charakterisiert durch eine hohe extrazelluläre Schleimsekretion mit einem muzinösen Anteil von mehr als 50%. Siegelringzellkarzinome sind gekennzeichnet durch intrazelluläre Schleimproduktion mit einem Anteil von mehr als 50% Siegelringzellen. Das seltene medulläre Karzinom zeichnet sich aus durch seine prominenten Nukleolen und reichlich vorhandenem Zytoplasma, welches von intraepithelialen Lymphozyten infiltriert ist. Das adenosquamöse Karzinom zeigt sowohl Merkmale des Plattenepithelkarzinoms als auch des Adenokarzinoms, entweder getrennt oder gemischt (Aaltonen u. a. 2000).

1.1.6. Vorsorge / Früherkennung

Mit der Darmkrebsvorsorge/ -Früherkennung für die asymptomatische Bevölkerung sollte ab dem Alter von 50 Jahren begonnen werden. Dabei besitzt eine komplette Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von Karzinomen und Adenomen. Bei unauffälligem Befund sollte diese nach 10 Jahren wiederholt werden. Bei Personen mit durchschnittlichem Darmkrebsrisiko, die keine Koloskopie wünschen, sollte jährlich ein fäkaler okkultur Bluttest durchgeführt werden. Ein positives Ergebnis macht die endoskopische Untersuchung des gesamten Dickdarms erforderlich.

Radiologische Verfahren wie die CT-Kolonographie und die MR-Kolonographie sollten nur bei inkompletter Koloskopie und fortbestehendem Wunsch der Patienten auf komplette Kolonbeurteilung erfolgen (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

Verwandte ersten Grades von Patienten mit kolorektalem Karzinom sollten in einem Lebensalter, das 10 Jahre vor dem Alterszeitpunkt des Auftretens des Karzinoms beim Indexpatienten liegt, erstmals komplett koloskopiert werden, spätestens im Alter von 40-45 Jahren.

1.1.7. Diagnose

1.1.7.1. Übersicht

Obligatorer Bestandteil der präoperativen Ausbreitungsdiagnostik beim kolorektalen Karzinom ist die digital-rektale Untersuchung und die komplette Koloskopie mit Biopsie.

Die Ultraschalluntersuchung des Abdomens und die konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax in 2 Ebenen erfolgt als Basisuntersuchung. Nur im Falle eines unklaren Befundes oder des Verdachtes auf Fernmetastasen oder Infiltration von Nachbarorganen wird ein Mehrzeilen-CT des Abdomens und Beckens bzw. im Falle des Verdachtes auf Lungenmetastasen ein CT des Thorax durchgeführt (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

Sowohl beim Kolonkarzinom als auch beim Rektumkarzinom sollte außerdem der CEA-Wert bestimmt werden. CEA, das carcinoembryonale Antigen, ist ein Tumormarker, der vor allem zur Verlaufs- und Therapiekontrolle von wichtiger Bedeutung sein kann.

Tabelle 2 fasst die wichtigsten präoperativen Ausbreitungsdiagnostiken zusammen.

Tabelle 2: Staging beim kolorektalen Karzinom (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019)

Untersuchung	Kolonkarzinom	Rektumkarzinom
komplette Koloskopie	x	x
Bestimmung des Tumormarkers CEA	x	x
Abdomensonographie	x	x
Röntgen-Thorax	x	x
Starre Rektoskopie		x
MR (CT)-Becken		x
Rektale Endosonographie bei lokal begrenztem Tumor		x

1.1.7.2. Molekularbiologische Diagnostik

Die molekularpathologische Charakterisierung der Erkrankung dient der prognostischen Einschätzung, sowie der Gewinnung prädiktiver Informationen hinsichtlich der Therapieauswahl. Die Untersuchungen umfassen u.a. eine Analyse des Mutationszustandes der RAS-Gene KRAS und NRAS (hotspot-Regionen der Exone 2, 3, und 4), des BRAF-Gens (hotspot region im Exon 15) sowie des Status der Mikrosatelliteninstabilität.

1.1.8. Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie kolorektaler Karzinome sollte grundsätzlich auf Basis einer histologischen Untersuchung geplant werden. Als Karzinome gelten Veränderungen, bei denen atypische epitheliale Formationen in die Submukosa infiltrieren (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

Zur kurativen Therapie des Kolonkarzinoms erfolgt in der Regel primär die möglichst vollständige operative Resektion des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand im Gesunden und En-bloc-Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes. Dabei sollen 12 und mehr Lymphknoten entfernt und untersucht werden (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019). Trotz initial kurativer Intention kommt es allerdings häufig, in Abhängigkeit vom Tumorstadium, zu Lokalrezidiven oder Fernmetastasen und damit zu einer hohen Mortalität.

Die Therapie unterscheidet sich zwischen dem Kolon- und dem Rektum-Karzinom:

Bei Patienten mit Rektumkarzinom unterscheidet man hinsichtlich der Therapie zwischen den einzelnen UICC-Stadien: Bei UICC 0 – I grenzt man nochmals Tis bis T1 von T2, N0, M0 ab. Bei Ersterem, Tis bis T1, bevorzugt man in einer Low-Risk-Situation und Karzinomen unter 3cm die lokale Tumorexzision und in einer High-Risk-Situation die komplette Rektumresektion. Bei Letzerem, T2, N0, M0, behandelt man ebenfalls mit einer Rektumresektion. Allgemein verzichtet man meistens im UICC-Stadium 0 – I auf eine neoadjuvante Therapie.

Im UICC-Stadium II bis III behandelt man Tumoren im mittleren und unteren Drittel in der Regel mit einer Rektumresektion verbunden mit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie. Die neoadjuvante Radiochemotherapie kann dabei das Tumolvolumen reduzieren und dadurch die

Operabilität verbessern (Downstaging). Tumoren im oberen Drittel werden hingegen meistens mit einer Rektumresektion verbunden mit einer adjuvanten Chemotherapie therapiert. Eine adjuvante Chemotherapie im Anschluss an die Operation soll verbliebene Tumorzellen töten und somit Rezidive verhindern.

Die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms sollte die komplette mesokolische Exzision beinhalten. Eine adjuvante Chemotherapie wird bei Kolonkarzinomen ab T4 bzw. bei jedem Lymphknotenbefall durchgeführt. (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019)

So werden Rektumkarzinome des oberen Drittels in der Regel wie Kolonkarzinome behandelt: Primäre Operation mit einer adjuvanten Chemotherapie.

Einen Überblick über die Therapie des Rektumkarzinoms gibt Tabelle 3:

Tabelle 3: Therapie Rektumkarzinom

UICC-Stadium	TNM	Leitliniengerechte Therapieempfehlung
0 - I	Tis bis T1	- Low-Risk-Situation und Karzinom <3 cm: Lokale Exzision - High-Risk-Situation : Rektumresektion/Rektumexstirpation - Keine neoadjuvante Therapie
	T2, N0, M0	Rektumresektion/Rektumexstirpation Keine neoadjuvante Therapie
II	bis T4, N0, M0	Tumoren im mittleren und unteren Drittel - Rektumresektion/Rektumexstirpation - I.d.R. neoadjuvante Radiochemotherapie oder Radiotherapie
		Tumoren im oberen Drittel - I.d.R. Rektumresektion - Adjuvante Chemotherapie - Bei hohem Risiko für inkomplette Resektion: Neoadjuvante Radiochemotherapie oder Radiotherapie und Rektumresektion
III	jedes T, N1, M0	
IV	jedes T, Jedes N, M1	individuelles Vorgehen je nach Befund

Einen Überblick über die Therapie des Kolonkarzinoms gibt Tabelle 4:

Tabelle 4: Therapie Kolonkarzinom

UICC-Stadium	TNM	Leitliniengerechte Therapieempfehlung
0 - I	Tis bis T1	- Endoskopische Resektion - Keine adjuvante Chemotherapie
	T2, N0, M0	- Radikale chirurgische Resektion - Keine adjuvante Chemotherapie
II	bis T4, N0, M0	- Radikale chirurgische Resektion - Adjuvante Chemotherapie individuell erwägen

III	jedes T, N1, M0	- Radikale chirurgische Resektion - Adjuvante Chemotherapie
IV	jedes T, Jedes N, M1	individuelles Vorgehen je nach Befund

Voraussetzung für eine adjuvante Therapie bei Kolonkarzinomen ist die R0-Resektion des Primärtumors. Das Grundprinzip in der optimalen Behandlung des kolorektalen Karzinoms besteht darin, in Abhängigkeit von patientenabhängigen Faktoren (wie Motivation und Toxizitätsprofil) und den tumorerkrankungsunabhängigen Faktoren (wie dem Allgemeinzustand des Patienten, Komorbidität, etc.), die effektivste Primärtherapie auszuwählen. Entsprechend der aktuell verfügbaren Erkenntnisse ist dies auf dem Boden der Lokalisation und der Molekularpathologie des Primärtumors möglich.

Bei gutem Allgemeinzustand und hoher Motivation sollten in erster Linie Fluoropyrimidin-basierte Kombinationsregime mit infusionaler Verabreichung von 5-Fluorouracil, wie FOLFOX, eingesetzt werden. Das Therapieschema FOLFOX setzt sich zusammen aus Folsäure, 5-FU (5-Fluoruracil) und Oxaliplatin (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

In metastasierten Tumorstadien kann bei R0-resektablen Metastasen ebenfalls chirurgisch vorgegangen werden. Bei nicht mehr resektablen Metastasen ist eine palliative Chemotherapie ebenfalls mit FOLFOX Therapie der Wahl.

Des Weiteren kann bei Nachweis eines all-RAS-Wildtyps im Tumor die Chemotherapie mit Anti-EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab oder Panitumumab kombiniert werden, welche eine signifikante Effektivitätssteigerung der Chemotherapie bewirken.

1.2. Aspekte der molekularen Karzinogenese

Die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der sowohl von genetischen Faktoren als auch von Umweltfaktoren abhängig ist. Onkogene, Tumorsuppressorgene und Gene, die an der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, spielen dabei eine große Rolle. Ein Einblick in die molekularen Pfade, die an der Entwicklung von Darmkrebs beteiligt sind, ist für die Entwicklung innovativer individualisierter Krebsbehandlungsstrategien unerlässlich.

1.2.1. Aktivierung von Protoonkogenen

Protoonkogene kodieren für Proteine, die Schlüsselfunktionen in der Übertragung von Proliferations- und/oder Differenzierungssignalen haben und je nach ihrer subzellulären Lokalisation Wachstumsfaktoren, Membranrezeptoren, Kinasen oder Transkriptionsfaktoren

zugeordnet werden können (Bishop 1991). Protoonkogene können durch eine Mutation im Regulationsbereich zu Onkogenen mutieren und somit zur Pathogenese einer Neoplasie beitragen. Ein wichtiger Vertreter beim kolorektalen Karzinom ist das häufig mutierte K-ras (Kirstin rat sarcoma) -Gen. Es handelt sich dabei um ein dominantes Onkogen, das für ein membranständiges Protein kodiert, welches GTP bindet und hydrolisiert. Eine Punktmutation in diesem Gen führt zu einem durchgehend aktiven Ras-Protein und somit zu einer konstitutiven Aktivierung des Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Protein- Kinase(MAPK)-Signalweges, ohne dass ein proliferationsstimulierendes Signal vorliegt. Folge ist eine persistierende mitotische Stimulation.

Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg wird im ersten Schritt durch die Umwandlung von Ras-GDP in Ras-GTP aktiviert. Im zweiten Schritt aktiviert Ras-GTP die zytosolische Serin/Threonin-Kinase Raf, welche die spezifischen MAP-Kinasen MEK1 und MEK2 phosphoryliert. Diese wiederum phosphorylieren und aktivieren die Effektor-MAP-Kinasen ERK1 und ERK2. ERKs sind multifunktionelle Serin / Threonin-Kinasen, die es auf eine große Anzahl von Substraten wie Proteinkinasen, Signaleffektoren, Rezeptoren, Zytoskelett- und Kernproteine sowie Transkriptionsfaktoren abzielen und somit das Zellschicksal beeinflussen können (Pearson u. a. 2001; Meloche und Pouyssegur 2007; Mercer u. a. 2002).

Die Kinasen der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) – Kinase Superfamilie sind also an Signalkaskaden beteiligt, die extrazelluläre Signale in intrazelluläre Reaktionen umwandeln. Sie sind Hauptkomponenten für die Steuerung der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Proliferation und den Tod einer Zelle und spielen daher eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese (Pearson u. a. 2001; McCubrey u. a. 2006).

Eine konstitutive Aktivierung dieses MAPK-Signalwegs wurde bei verschiedenen Malignitäten und Zelllinien des Menschen wie Brust-, Dickdarm-, Magen- oder Speiseröhrenkrebs beobachtet und liefert eine Erklärung für die unkontrollierte Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen (Davies u. a. 2002; Hoshino u. a. 1999).

1.2.2. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Tumorsuppressorgene tragen durch den Verlust ihrer Funktion zur Krebsentstehung bei. Ein für das kolorektale Karzinom spezifisches Suppressorgen ist das APC (Adenomatous Polyposis Coli)- Gen. Das APC-Protein hat eine zentrale Funktion im Schnittpunkt von Zelladhäsions- und intrazellulären Signalvermittlungsprozessen. So bindet es unter anderem an β -Catenin, einem an Zellkontakten beteiligten Strukturprotein und erschwert dadurch die Zellteilung. Durch die APC-Mutation wird meist ein Stoppkodon neu eingeführt, woraus die Bildung eines verkürzten Genproduktes resultiert. Dadurch verliert das APC-Genprodukt die Fähigkeit der β -Cateninbindung und sorgt für eine ungehemmte Zellproliferation (Wolfgang Hiddemann, Huber, und Bartram 2004).

In über 70% aller kolorektaler Karzinome findet sich außerdem eine Punktmutation in dem P53(Chromosom 17p13)- Gen, dessen Genprodukt unter anderem als Regulator des G1/S-Kontrollpunktes im Zellzyklus dient. So werden DNA-Schäden bei intaktem p53-Gen erkannt und repariert bzw. die körpereigene Apoptose induziert. Bei Mutationen des P53-Gens entfällt diese Kontrollfunktion und es kommt zu einer Akkumulation von DNA-Schäden (W Hiddemann und Bartram 2010).

1.2.3. Mikrosatelliteninstabilität als Resultat defizienter Reparaturgene

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet die Anreicherung von Basenfehlpaarungen („mismatches“) und kurzen Deletionen/Insertionen an repetitiven Sequenzen (Mikrosatelliten), welche als Folge eines Korrekturausbleibens von Replikationsfehlern entstehen (Dietmaier u. a. 1997).

MSI ist nicht nur ein Charakteristikum des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC), sondern spielt auch bei 12-15% sporadischer, kolorektaler Karzinome, als Folge einer epigenetischen Inaktivierung des MLH1-Gens durch Promotor-Hypermethylierung, eine große Rolle.

So hat sich eine hochfrequente MSI, d.h. mindestens 2 von 5 definierten Mikrosatellitenmarker sind instabil, in klinischen Studien beim kolorektalen Karzinom als ein positiver prognostischer Marker bezüglich des Gesamtüberlebens erwiesen (Popat, Hubner, und Houlston 2005).

Laut aktuellen S3-Leitlinien ist die MSI-Testung einerseits für die Indikationsstellung einer human-genetischen Beratung hilfreich, andererseits kann sie im Hinblick auf die Behandlung mit Immun-Checkpointinhibitoren sinnvoll sein (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

1.2.4 Cycline als Zellzyklus-regulierende Protoonkogene

Cycline sind Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus einnehmen. Dabei kontrollieren sie wichtige Schritte in der Tumorentstehung, wie etwa der DNA-Replikation und Zellteilung. Der Zellzyklus besteht aus einer kurzen mitotischen Phase, der M-Phase und einer langen Interphase. Letztere wird nochmals unterteilt in die S-Phase (Phase der DNA-Synthese), in die G1-Phase (Phase zwischen der M-Phase und S-Phase) und die G2-Phase (Phase zwischen der S-Phase und der M-Phase). In der späten G1-Phase passieren die Zellen einen als „Check-point“ bezeichneten Zeitpunkt im Zellzyklus, der garantiert, dass bestimmte Abläufe abgeschlossen sind, bevor die Zellen in eine neue Zellzyklusphase übertreten (Sherr 1996).

Solche Kontrollpunkte gewährleisten die Stabilität des genetischen Materials, da bei Fehlern eine Zelle nicht weiter proliferiert bzw. in die Apoptose übergeht. Das Retinoblastom (Rb) - Tumorsuppressorgen spielt bei der Regulation solcher „Check-points“ eine Schlüsselrolle und wird durch wechselnde Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert (Williams, Smalley, und DuBois 1997). Das dephosphorylierte Rb- Protein (pRb) verhindert dabei einen

verfrühten Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. Hierbei kommen die Cyclin D-abhängigen Kinasen ins Spiel, welche die pRb-Phosphorylierung kontrollieren.

Bei beschädigter DNA kann somit durch eine Blockierung von Cyclinen der Zellzyklus in der G1-Phase abgebremst und eine Replikation der DNA verhindert werden. Der programmierte Zelltod stellt dabei die effektivste natürliche Verteidigungsmaßnahme gegen eine maligne Entartung der Zelle dar (Sherr 1996).

1.3. Differenzierung von rechts- und linksseitig-lokalisierten Tumoren

Retrospektive Untersuchungen klinischer Studien weisen darauf hin, dass es signifikante Unterschiede bezüglich der Altersverteilung, dem Geschlecht, der Verteilung ethnischer Gruppen, der Stadieneinteilung, dem Tumorgrad und dem Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie zwischen links- und rechtsseitig lokalisiertem Kolonkarzinom gibt. Dabei zeigen rechtsseitig lokalisierte Tumore ein dominantes Merkmal bei Frauen. Rechtsseitig lokalisierte Tumore kommen außerdem signifikant häufiger bei Älteren vor (69% rechtsseitig vs. 61% linksseitig > 75 Jahre). Des Weiteren zeigen rechtsseitig lokalisierte Tumore häufiger eine undifferenzierte Pathologie (25% rechtsseitig vs. 14% linksseitig) und haben einen höheren Prozentanteil der UICC-Stadien II und III (76% rechtsseitig vs. 74% linksseitig) (Weiss u. a. 2011).

Bezüglich der Überlebensraten zeigt sich die aktuelle Studienlage uneinheitlich. So berichten einige Autoren über eine schlechtere Prognose und somit eine höhere Mortalität rechtsseitiger Kolonkarzinome. Als Grund für die ungünstigere Prognose sehen diese den schlechteren Differenzierungsgrad, die größere lokale Tumorausbreitung und den größeren Anteil an Lymphknotenmetastasen (Benedix u. a. 2010).

Im Gegensatz dazu wiesen andere Autoren keine signifikanten Unterschiede im 5-Jahres-Mortalitätsrisiko zwischen rechts- und linksseitigen Kolonkarzinomen nach (Weiss u. a. 2011).

Derzeit verfügbare Daten weisen darauf hin, dass linksseitige Tumore in hohem Maße von einer Behandlung mit anti-EGFR-Substanzen profitieren. Rechtsseitige Tumore hingegen sprechen schlecht auf Standardtherapien und Anti-EGFR-Antikörper an (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019).

So scheint es nachvollziehbar, dass sich die Prognose zwischen rechts- und linksseitigen Kolonkarzinomen unterscheidet und die Lokalisation des Primärtumors eine wichtige Determinante der therapeutischen Effektivität darstellt. Somit sollte diese in die Therapieentscheidung miteinbezogen werden. Eine Analyse aus der nordamerikanischen SEER-Datenbank veranschaulicht dies deutlich (Abbildung 3)(Schrag D et al. 2016).

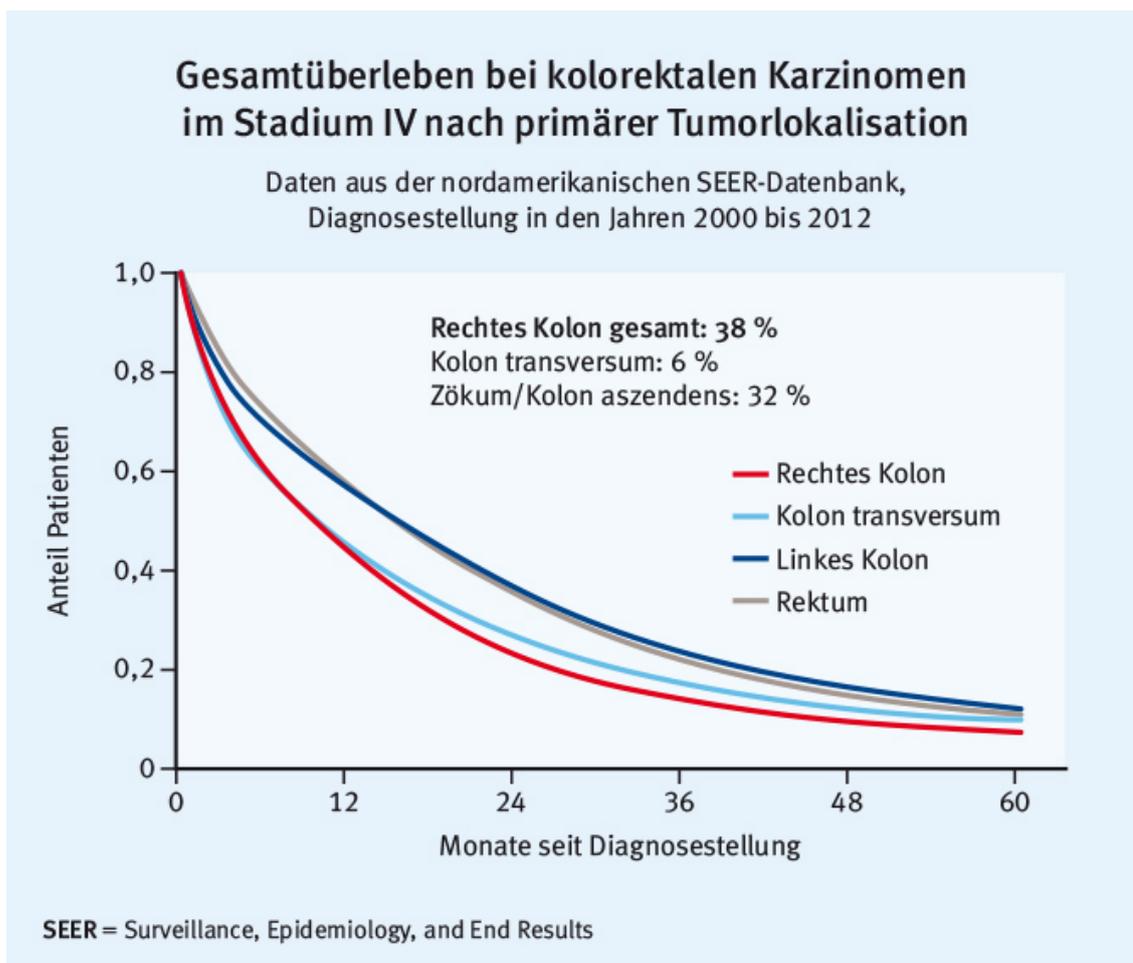


Abbildung 3: Gesamtüberleben bei kolorektalen Karzinomen im Stadium IV nach primärer Tumorlokalisation. Daten aus der nordamerikanischen SEER-Datenbank, Diagnosestellung in den Jahren 2000 bis 2012

(Quelle: © (Schrag D et al. 2016), <https://meetinglibrary.asco.org/record/123724/abstract,05/2020>)

1.4. Allgemeine Informationen zu HNPCC

Beim HNPCC handelt es sich um die häufigste erbliche Dickdarmkrebsform, welche 2-3% aller kolorektalen Karzinome ausmacht (Steinke u. a. 2013). Dabei liegt eine autosomal-dominant erbliche Tumordisposition vor, welche auf einer genetischen Veränderung, einer Mutation, in einem DNA-Reparaturgen (sog. Mismatch-Repair-Gen = MMR-Gen) zurückzuführen ist. Da die genetische Veränderung in der Keimbahn entstanden ist, liegt die Mutation in allen Körperzellen eines Anlageträgers heterozygot vor. Anlageträger vererben die Mutation mit 50%iger Wahrscheinlichkeit an ihre Kinder. Ein Tumor tritt jedoch nur dann auf, wenn im Laufe des Lebens spontan eine weitere Mutation in der zweiten MMR-Genkopie einer Zelle

auftritt. Erst dann kann diese Zelle unkontrolliert proliferieren und damit Karzinome entstehen („Zwei-Schritt-Theorie“) (Steinke u. a. 2013).

Um eine objektivierbare Einordnung von familiär aufgetretenen Krebserkrankungen zu ermöglichen, wurden weltweit einheitliche diagnostische Kriterien für einzelne Krebs syndrome entwickelt. Für HNPCC gibt es die sogenannten Amsterdam- bzw. Bethesda-Kriterien (Steinke u. a. 2013).

Mutationsträger haben ein sehr hohes Risiko, ein kolorektales Karzinom (50-70%) oder ein Endometriumkarzinom (20-60%) zu entwickeln. Dies gilt vermindert auch für weitere Neoplasien wie Ovarial-, Magen und Dünndarmkarzinome sowie Urothelkarzinome des Nierenbeckens und Ureters.

Bei familiär bekannter krankheitsursächlicher Mutation in einem der HNPCC-assoziierten Gene ist es möglich, Familienangehörige auf das Vorliegen der Mutation zu testen, bevor überhaupt erste klinische Symptome beobachtet werden.

1.5. MAPK-Weg

Obwohl Zellen von einer Membran umgeben sind, welche eine Trennung zwischen der äußeren und der inneren Umgebung ermöglicht, können sie auf extrazelluläre Reize wie etwa Mitogene oder Hormone reagieren und ihre Signale in zelluläre Prozesse umwandeln. Solch eine Umwandlung wird üblicherweise durch Bindung extrazellulärer Liganden an spezifische transmembrane Rezeptoren vermittelt, die folglich aktiviert werden und die Signale über intrazelluläre Signalwege weiterleiten. Eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung spielen dabei MAPK- Kaskaden (Shaul und Seger 2007).

Die Übertragung von Signalen über diese Kaskaden wird üblicherweise durch Aktivierung eines G-Proteins, wie z.B. Ras, initiiert. Das aktivierte Ras aktiviert nun selbst die Serin-/Threoninkinase Raf und zahlreiche andere Kinasen durch Phosphorylierung.

Jede dieser MAPK- Kaskaden besteht aus drei bis fünf Kinasen (MAPKKKK, MAPKKK, MAPKK, MAPK und MAPKAPK), die sich gegenseitig phosphorylieren und somit aktivieren. Die letzte Kinase in solch einer Kaskade phosphoryliert dann regulatorische Zielmoleküle, welche den erforderlichen physiologischen Prozess einleiten. Bisher wurden vier verschiedene MAPK-Kaskaden (ERK, JNK, p38 und BMK) beschrieben. All diese Kaskaden wirken bei der Übertragung von extrazellulären Signalen zusammen und bestimmen so das Schicksal einer Zelle (Shaul und Seger 2007).

Im Folgenden wird genauer auf die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK), ein Mitglied der MAPK-Familie, eingegangen. ERK kommt überwiegend in zwei Formen vor, ERK1 und ERK2. Der ERK1/2-Signalweg ist an mehreren unterschiedlichen Ereignissen, wie etwa der Proliferation, dem Wachstum, der Differenzierung, der Zellmigration, dem Zellüberleben, dem

Metabolismus und der Transkription beteiligt. ERK1/2 wird durch eine Phosphorylierung im Zytosol aktiviert und anschließend in den Nucleus transloziert. Dort aktiviert ERK1/2 Transkriptionsfaktoren (Lu und Malemud 2019).

Abbildung 4 soll diesen Signalweg veranschaulichen. Verschiedene Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren (engl.: Growth factors) oder Mitogene (engl.: Mitogens) aktivieren die MAPKKK, wie z.B. Mitglieder der Raf-Familie. Die MAPKKK wiederum aktiviert die MAPKK, wie z.B. MEK1/2. Diese aktiviert die MAPK, wie z.B. ERK1/2, welche dann anschließend verschiedene Prozesse einleitet (Morrison 2012).

Kommt es allerdings zu Mutationen, z.B. im Ras-Gen, kann dieses dauerhaft aktiviert bleiben und ein unkontrolliertes Zellwachstum begünstigen. Ein Tumor entsteht.

Als Stimuli fungieren epidermale Wachstumsfaktoren, EGF, welche an den EGF-Rezeptoren binden und die Signalkaskade aktivieren. Der EGF-Rezeptor ist ein Mitglied der ErbB-Familie, eine Unterfamilie von vier eng verwandten Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4).

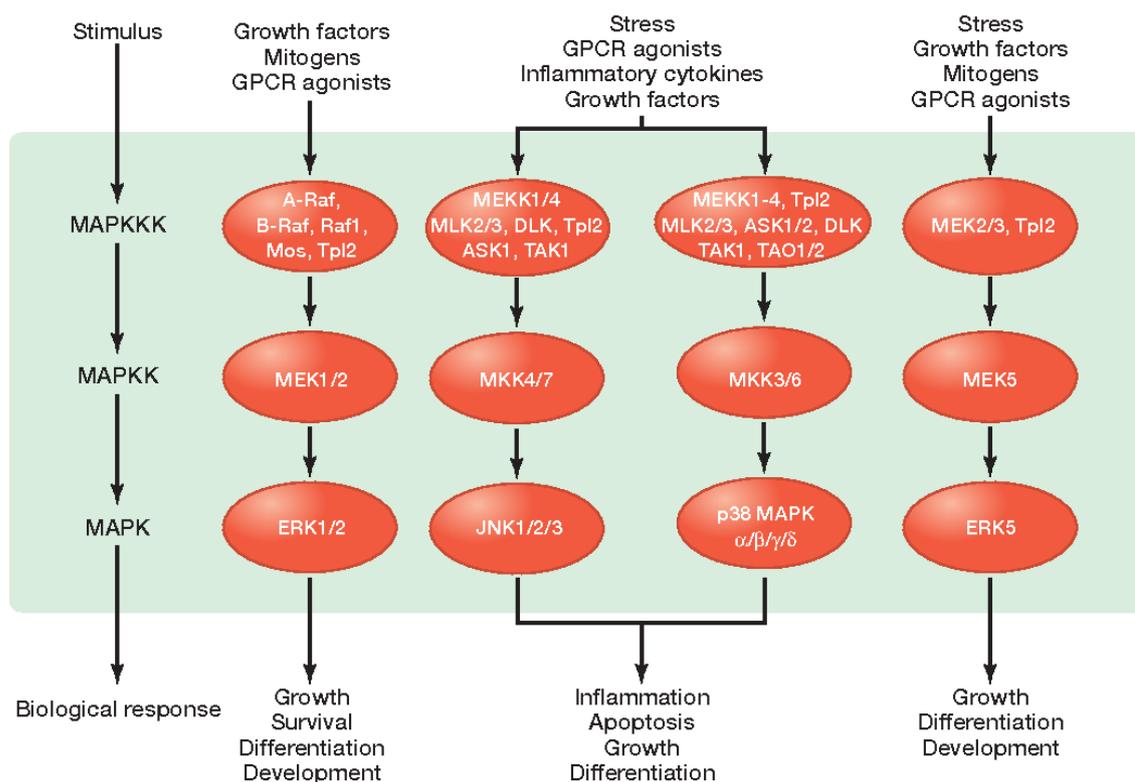


Abbildung 4, mit Genehmigung von Cell Signaling (www.cellsignaling.com)

1.6. HLA

Humanes Leukozytenantigen (HLA) gehört zu den Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Klasse-I-Molekülen, eine Gruppe von Genen, die Proteine codieren, welche für die Immunerkennung, die immunologische Individualität und auch Histokompatibilitäten bei Transplantationen zuständig sind. Beim Menschen liegen diese HLA- Gene auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31).

Polygenie, die Beteiligung mehrerer Gene zur Ausbildung eines Phänotyps und Polymorphismus, das Auftreten mehrerer Allele in einer Population, tragen zur Diversität der HLA-Moleküle eines Individuums bei. Jede Person hat eine individuelle HLA-Kombination (Murphy, Weaver, und Janeway 2018). Man unterscheidet HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) von HLA-Klasse-II-Molekülen (HLA-DRB1, HLA-DQB1), welche jeweils eine unterschiedliche Zahl an Allelen besitzen. Nahezu alle kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimieren HLA-Klasse-I-Moleküle, während HLA-Klasse-II-Moleküle ausschließlich auf Zellen des Immunsystems vorkommen.

Das HLA- System macht es dem Immunsystem möglich, eigene Zellen von fremden Zellen zu unterscheiden.

Dafür werden zum einen Tumorantigene von den MHC-Klasse-I-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert und von CD8⁺ T-Zellen erkannt, welche sich zu zytotoxischen T-Lymphozyten differenzieren. Daraufhin geben diese Proteine wie Perforine und Granzyme ab, die eine Durchlässigkeit der Membran der Zielzelle induzieren. Zum anderen werden Tumorantigene von den MHC-Klasse-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert und von den CD4⁺ Zellen erkannt, die zu T-Helfer-Zellen differenzieren. Daraufhin werden Zytokine und Chemokine von diesen ausgeschüttet, sowie Immunreaktionen anderer Zellen verstärkt (Garrido und Aptsiauri 2019).

Eine erhöhte HLA-A-Oberflächenexpression korreliert mit einer besseren Erkennung und Lyse durch spezifische zytotoxische T-Zellen und eine verminderte HLA-A-Oberflächenexpression korreliert mit einem ungehinderten Tumorwachstum. Als Folge einer verminderten HLA-A-Expression entstehen bösartige Erkrankungen.

Neue Studien haben gezeigt, dass eine Herunterregulierung der HLA-Klasse-I-Exprimierung in vielen Malignitäten vorkommt und mit einer schlechteren Krankheitsprognose und schlechterem Langzeitüberleben einhergeht (Chang, Campoli, und Ferrone 2003).

Das MHC-Klasse-I-Molekül hat einen unsymmetrischen Aufbau und setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Eine schwere α -Kette, welche in die Domänen α_1 , α_2 und α_3 unterteilt wird und eine leichte β_2 -Mikroglobulin-Kette. Das MHC-Klasse-II-Molekül hat einen symmetrischen Aufbau und setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen: Einer α -Kette, welche in die Domänen α_1 und α_2 unterteilt wird und einer β -Kette, welche ebenfalls in die

Domänen β_1 und β_2 unterteilt wird. Aus Röntgenstrukturanalysen weiß man, dass HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Moleküle in sehr ähnlicher Weise sogenannte Taschen formen, deren Boden jeweils von einer Faltblattstruktur und deren Seitenwände von zwei α -Helices gebildet werden. Die räumliche Struktur eines Klasse-I-Antigens stellt Abbildung 5 dar. In solche Hohlräume der HLA-Taschen können Peptidantigene aufgenommen und vom T-Zellrezeptor erkannt werden (Waßmuth 2005).

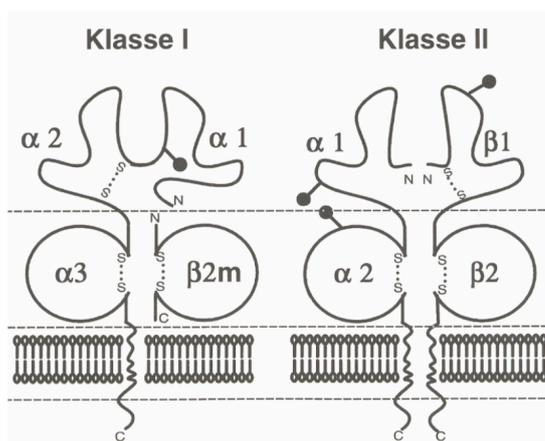


Abbildung 5: Schema der Sekundärstruktur von HLA- Klasse-I und Klasse-II-Antigenen (Quelle: ©Einführung in das HLA-System 2005 von Ralf Waßmuth, (Waßmuth 2005), 05/2020)

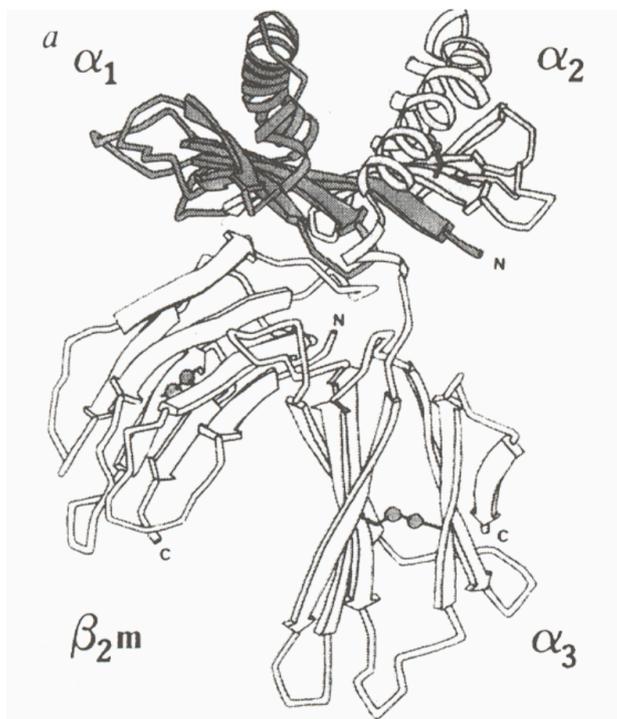


Abbildung 6: Tertiärstruktur von HLA-Klasse-I-Antigenen am Beispiel von HLA-A2 (Quelle: ©Einführung in das HLA-System 2005 von Ralf Waßmuth, (Waßmuth 2005), 05/2020)

Das HLA-System ist in der Medizin von großer Bedeutung. Bei Transplantationen zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad einer Abstoßungsreaktion vom Unterscheidungsgrad der HLA-Moleküle des Spenderorgans und des Empfängers abhängig ist. Auch HLA-bedingte Erbkrankheiten rücken immer mehr in den Fokus der Forschung, da einige genetische Erkrankungen noch vor Krankheitsausbruch bzw. noch vor Auftreten von Symptomen diagnostiziert werden können. Zu nennen sind hier Erbkrankheiten wie das Goodpasture-Syndrom (HLA-Merkmale: DR2, DQ2), Morbus Bechterew (HLA-Merkmal: B27) und Systemischer Lupus Erythematodes (HLA-Merkmale: DR3, DQ2).

2. Zielstellung

Basierend auf den dargelegten Forschungsergebnissen ist es Ziel der Studie, herauszufinden, ob der MAPK-Signalweg an der Regulation der HLA-A-Expression beim Kolonkarzinom beteiligt ist.

Dies wurde für andere Krebsarten, wie beispielsweise beim Oesophagus- und Magenkarzinom belegt (Mimura u. a. 2013). Primär besteht die These der inversen Korrelation zwischen der Erk-Expression und HLA-Klasse-I-Expression in klinischen Tumor Proben. So vermutet man bei vermehrter Aktivierung des MAPK-Signalwegs eine verminderte HLA-Klasse-I-Expression und damit einhergehend eine schlechtere Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem.

Zuletzt wurde im Jahr 2019 ein Zusammenhang zwischen einer HLA-G- Expression und der Aktivierung des MAPK-Signalweges im Kolorektalen Karzinom beobachtet. HLA-G, ein nicht klassisches MHC-Molekül, bindet dabei an die Rezeptoren von Immunoglobulin like transcript (ILT) 2 und ILT 4 und induziert somit eine inhibitorische Signalübertragung. In der Studie aus dem Jahr 2019 wurde herausgearbeitet, dass bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Koexpression von ILT 4 und HLA-G im Zusammenhang mit Alter, fortgeschrittenem Tumorstadium, Lymphknoten-Beteiligung und allgemein schlechter Überlebenszeit stehen. Behandlung mit HLA-G-Fusionsproteinen erhöhte dabei die ILT4-Expression und aktivierte die Signalübertragung von Proteinkinase B und ERK, wodurch die Proliferation von kolorektalen Karzinomzellen erleichtert wurde. Ziel dieser Studie war es somit eine neue Strategie zur Blockierung von ILT4/ HLA-G für die Behandlung vom Kolorektalem Karzinom zu finden. Zusammengefasst unterstreicht diese Studie die Vermutung, dass die Expressierung von HLA-Molekülen in direktem Zusammenhang mit der p-Erk-Expression stehen und dies Einfluss auf die Malignitätseigenschaften kolorektaler Tumorzellen hat. (Cai u. a. 2019)

Es soll die Hypothese überprüft werden, dass bei fehlender Expression von Erk eine hohe Präsentation von HLA-Klasse-I-Antigenen vorliegt.

Es erfolgte eine retrospektive Auswertung einer prospektiv angelegten Datenbank, in der Patienten, bei denen eine chirurgische Therapie eines Kolonkarzinoms erfolgte, erfasst wurden. Auf diese Weise sollten nicht nur Unterschiede zwischen rechtsseitigen und linksseitigen Kolonkarzinomen, sondern auch mögliche Risiken, die eine Umgehung des Immunsystems begünstigen, analysiert werden.

Ferner war es Ziel der Studie, Korrelationen zwischen klinischen bzw. pathologischen Patientendaten und der Stärke der HLA-A- und p-Erk-Expressierung zu untersuchen. Relevante Patientendaten wurden dabei untersucht und folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Zeigen sich Unterschiede in der HLA- A- oder p- Erk- Expression zwischen rechtsseitigen und linksseitigen Kolonkarzinomen, zwischen Patienten mit chirurgisch therapiertem

Kolonkarzinom älter und jünger als 50 Jahren, über und unter einem BMI von 30, zwischen weiblichen und männlichem Geschlechts, zwischen Patienten mit und ohne Nikotinabusus, Alkoholabusus, Diabetes mellitus Typ II, arteriellem Hypertonus, COPD, koronaren Herzerkrankungen und Niereninsuffizienz?

- Zeigen sich Unterschiede in der HLA- A- oder p- Erk- Expression zwischen Patienten mit chirurgisch therapiertem Kolonkarzinom mit G1, G2 oder G3 eingestuft Tumoren, mit UICC Stadium I, II, III oder IV, mit und ohne Lymphknoten-Befall, Metastasierung, Zweittumor oder positiver Familienanamnese?

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Englische Bezeichnungen sind *kursiv* gedruckt.

3.1.1. Antikörper

Verwendete Antikörper:

Für die Darstellung von **p-Erk** wurde ein monoklonaler, aus dem Hasen stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen phosphoryliertes Erk1/2 in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

Produktname: Anti- ERK1 + ERK2 (phosphor T202 + Y204) *antibody* [SP327] ab223500

Hersteller: Firma Abcam

Beschreibung: *Rabbit monoclonal* [SP327] to ERK1 + ERK2 (phospho T202 + Y204), *Clone number*: SP327

Reaktivität mit: human

Für die Darstellung von **HLA-A** wurde ein monoklonaler, aus der Ratte stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen HLA Klasse I ABC in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet.

Produktname: *Monoclonal Antibody to HLA Class I ABC Xenograft marker-Purified*

Hersteller: ORIGENE Technologies

Beschreibung: *Clone number*: YTH862.2

Reaktivität mit: human

3.1.2. Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Materialien unter Angabe der Hersteller

Material	Hersteller
<i>Antibody-Diluent</i>	Dako, Dänemark
<i>NeoClear</i>	Merck, Darmstadt
Xylol (Isomere) ROTIPURAN® \geq 99%	Carl Roth, Karlsruhe
Entellan (<i>Xylene based</i>)	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt \geq 99.8%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%	Walter CMP, Kiel
Ethanol 70%	Walter CMP, Kiel
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS PUFFERAN® \geq 99.3%, <i>Buffer Grade</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt

Salzsäure 2 mol/l – 2N Lösung (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Tween</i>	SERVA, Heidelberg
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
<i>Citric Acid 1-hydrate pure</i>	AppliChem, Darmstadt
<i>Sodium Citrate Trisodium salt: Dihydrate</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Honeywell, Seelze
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Ziegenserum, <i>Goat Serum X0907</i>	Dako, Dänemark

3.1.3. Gewebeschnitte

Das Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen stammt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie in Halle. Über die Datenbank der Universitätsklinik Halle wurden Kolonkarzinome aus den Jahren 2013 bis einschließlich Januar 2019 ermittelt, wovon erstmals insgesamt 81 Fälle für die Studie von Relevanz waren. Es wurden ausschließlich Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe verwendet.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 sind Patienten, deren Tumor rechtsseitig lokalisiert war, Gruppe 2 sind Patienten, deren Tumor linksseitig lokalisiert war. Um diese Gruppen streng voneinander zu unterscheiden, diente die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification (ICD-10-GM) als Orientierung.

Dabei werden Kolonkarzinome folgendermaßen untergliedert (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) u. a. o. J.):

3.1.4. Klassifikation

C18.- Bösartige Neubildung des Kolons

C18.0	Zäkum Inkl.: Ileozäkalklappe [Bauhin]
C18.1	Appendix vermiformis
C18.2	Colon ascendens
C18.3	Flexura coli dextra [hepatica]
C18.4	Colon transversum
C18.5	Flexura coli sinistra [lienalis]
C18.6	Colon descendens
C18.7	Colon sigmoideum

Inkl.: Sigma (Flexur)

Exkl.: Rektosigmoid, Übergang (C19)

C18.8 Kolon, mehrere Teilbereiche überlappend

C18.9 Kolon, nicht näher bezeichnet

Inkl.: Dickdarm o.n.A.

C19. bösartige Neubildung am Rektosigmoid, Übergang

Inkl.: Kolon mit Rektum

Übergang vom Rektum zum Colon sigmoideum

Die Flexura coli sinistra [lienalis] dient dabei als Grenze zwischen rechtsseitig- und linksseitig-lokalisiertem Kolonkarzinom.

Zunächst wurde von allen Geweben Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) angefertigt. Diese wurden anschließend zusammen mit einem Pathologen begutachtet und gegebenenfalls reevaluiert. Von den 81 ermittelten Kolonkarzinom-Fällen konnten letztendlich 54 Fälle in die Untersuchung miteingeschlossen werden, da in den restlichen Fällen entweder kein Kolonkarzinom mehr in den Gewebeblöcken nachweisbar war oder es sich nicht um einen Primärtumor handelte.

3.1.5. Objektträger

Wir verwendeten silanisierte Objektträger.

Als Erstes wurden die Objektträger 2 Minuten in destilliertem Wasser gewässert, dann zwei Minuten in Aceton gespült und schließlich fünf Minuten mit 2%iger Mischung aus Aceton mit (3- Aminopropyl)-triethoxysilane inkubiert. Nach anschließendem Spülen unter fließendem Wasser wurden die Objektträger getrocknet.

Material	Hersteller
PAP-Pen	Kisker Biotech GmbH&Co. KG, Dutcher Group
Deckgläser	Marienfeld GmbH&Co. KG, Lauda-Königshofen

3.1.6. Färbekits

Kit: *Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAC+, Rabbit/Mouse*
von Dako, Dänemark

3.1.7. Geräte

Gerät	Hersteller
Mikrotom: Microm HM325	Microm GmbH, Walldorf
Mikroskop: Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena

3.2. Erarbeitung der Färbeprotokolle

Zur Austestung wurden drei zufällig gewählte Paraffinschnitte aus dem Patientenpool verwendet. Um die beste Färbemethode zu bestimmen, wurde bei beiden Antikörpern streng nach dem vom Hersteller mitgeschickten Protokoll vorgegangen. Dabei wurde bei beiden Antikörpern die LSAB-Methodik angewandt, jedoch verschiedene Seren zum Blocken (10%iges Ziegenserum in TBS, 10%iges Ziegenserum in 1% BSA mit TBS, 0,1%iges BSA in TBS, 10%iges Schweineserum in TBS) und verschiedene Konzentrationen (Antikörper-Verdünnung 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:5000) ausgetestet. Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen durch Auslassen des Primärantikörpers mitgeführt, um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden. Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper p- Erk wurden dabei die besten Färbeergebnisse mit 10%igem Ziegenserum in TBS-T bei einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:200 erreicht. Bei der Färbung mit dem HLA-A-Antikörper wurden die besten Färbeergebnisse mit 10%igem Ziegenserum in 1% BSA mit TBS und einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:5000 beobachtet.

3.3. Präparation der Paraffinschnitte

3.3.1. Zuschnitt

Die angefertigten Paraffinblöcke wurden mit dem Mikrotom in ca. 2-5 μm große Schnitte geschnitten und auf silanierte Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte, welche für die immunhistochemische Färbung genutzt werden sollten, für mindestens zwölf Stunden in einem Trockenschrank bei 37 °C getrocknet.

3.3.2. Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Gewebeschnitte wurden für 20 Minuten in frisches *NeoClear* gestellt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe von 99.8%, 96% und 70% Ethanol für jeweils vier Minuten rehydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte in destilliertem Wasser gespült und in 1x TBS-T überführt.

Zur Herstellung von TBS- T wurden 24,2 g TRIS mit 80 g NaCl in 800 ml destilliertem Wasser gelöst und genau so viel HCl hinzugegeben, bis ein pH-Wert von 7,5 erreicht war. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und zuletzt 500 μl *Tween* hinzugefügt.

3.4. Vorbehandlung des histologischen Materials

Ein Nachteil der Fixierung und Paraffineinbettung ist, dass durch Formalin Antigene mit anderen Antigenen, Lipiden oder Nucleinsäuren quervernetzen, sodass die Bindungsstellen monoklonaler Antikörper an bestimmten Epitopen blockiert bzw. maskiert sind. Dies nennt man Antigenmaskierung. Um diesem Schritt entgegenzuwirken, wurden die Gewebeschnitte vorbehandelt bzw. antigendemaskiert:

Als Erstes wurden die Schnitte mit *Citrate Buffer*, pH 6.0 behandelt. Dafür wurden 7.5 ml der *Stock-Solution A* (bestehend aus 10.5 g 0.1 M *Citric Acid 1-hydrate* aufgelöst in 500 ml destilliertem Wasser) mit 42.5 ml der *Stock-Solution B* (bestehend aus 14.7 g 0.1 M *Sodium Citrat Trisodium salt: Dihydrate* aufgelöst in 500 ml destilliertem Wasser) zusammengegeben und auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Danach wurden jeweils zwei Objektträger in Kunststoffküvetten gebracht, mit dem *Citrate Buffer* aufgefüllt, sodass diese ausreichend bedeckt und mit einem Kunststoffdeckel schräg bedeckt waren. Für drei Minuten bei maximaler Wattzahl wurden diese in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und danach für ca. 15 bis 20 Minuten auf *Crushed Ice* heruntergekühlt. Dabei wurde verdampfte Flüssigkeit stets mit destilliertem Wasser nachgefüllt, womit man gewährleisten konnte, dass die Gewebeschnitte nicht austrockneten.

Im Anschluss wurden die Objektträger für fünf Minuten in 1x TBS-T-Flüssigkeit auf dem Magnetrührer mit einer Geschwindigkeit von ca. 500 Umdrehungen pro Minute ausgewaschen.

3.5. Färbeprotokolle

3.5.1. LSAB-Methode

Labeled (Strept) Avidin-Biotin-Methode, kurz LSAB-Methode, beschreibt ein Verfahren zur Detektion von Antigenen. Hierbei bedient man sich der starken Affinität des Vitamins Biotin zu dem Glykoprotein Avidin bzw. Streptavidin. Avidin ist ein Glykoprotein, welches aus dem Hühnerweiß gewonnen wird und vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Streptavidin ist ein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnenes, reineres Produkt, welches auf gentechnischem Weg gewonnen wird.

Bei dem Nachweisverfahren bindet im ersten Schritt ein primärer Antikörper an dem gesuchten Antigen. Anschließend wird ein sekundärer, biotinylierter Brückenantikörper hinzugegeben, der an dem primären Antikörper bindet. Zuletzt wird dann enzymmarkiertes (Strept)Avidin, der sogenannte Streptavidin-Biotin-Peroxidase (HRP)-Komplex, hinzugegeben, welches am Biotin des sekundären Brückenantikörpers bindet. Um dies sichtbar zu machen, wird im letzten Schritt

als Substrat ein Chromogen hinzugegeben, das von dem Enzym, der Peroxidase (HRP), in einen Farbkomplex umgewandelt wird.

Das hier verwendete Chromogen heißt Diaminobenzidin, kurz DAB, und ruft eine braune Farbreaktion hervor.

Ein Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung und eine gute Sensitivität. Der Nachteil ist die Kreuzreaktion des Biotins mit dem endogenen Biotin.

Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 7:

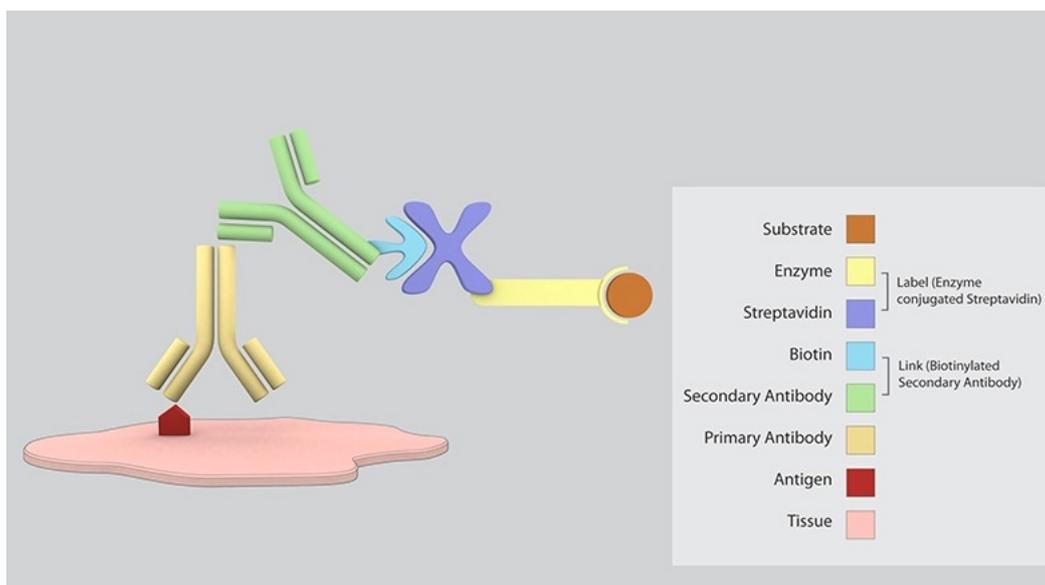


Abbildung 7: schematische Darstellung der LSAB-Methode (mit Genehmigung von BioGenex Laboratories, Inc., www.biogenex.com)

3.5.2. Färbeprotokoll p-Erk nach der LSAB-Methode

Gewebeigene Peroxidase kann unerwünschte Interferenzen bewirken, die zu mehr oder weniger starken Hintergrundfärbungen führen. Aus diesem Grund wurde die endogene Peroxidase im nächsten Schritt blockiert. Dazu wurden 30 ml von 3%iger H_2O_2 *Stock-Solution* mit 120 ml kaltem Methanol (4 °C) vermischt und auf 4 °C heruntergekühlt. In diesem Methanol/ H_2O_2 -Gemisch wurden die Objektträger für 20 Minuten gebadet und anschließend drei Mal für je fünf Minuten mit frischer 1x TBS-T-Lösung auf dem Magnetrührer ausgewaschen, in feuchte Kammern platziert und mit dem *PAP-Pen* die Gewebeschnitte umkreist.

Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung wurde im nächsten Schritt das Blocken mittels Ziegen Serum durchgeführt. Dafür wurde das Ziegen Serum 1 zu 10 in TBS-T verdünnt und für eine Stunde auf die Objektträger gegeben.

Die Primärantikörper wurden mit einer Verdünnung von 1:200 mit *Dilution Buffer* (*Dilution Buffer* aus dem *Kit: Dako REAL™ Antibody Diluent*) auf die vorbehandelten Objektträger

gegeben und über Nacht bei 4 °C in eine feuchte Kammer gestellt. Pro Gewebeschnitt wurden dafür 100 µl Antikörper-Verdünnung verwendet.

Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Mal für fünf Minuten in 1x TBS- T gespült, um dann den sekundären Antikörper für 30 Minuten auftragen zu können.

Nach anschließendem dreimaligem Spülgang für fünf Minuten mit 1x TBS-T wurde das Tertiärsystem aus Streptavidin- Biotin- Peroxidase(HRP)- Komplex (*Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)*) für 30 Minuten aufgetragen und ebenfalls wieder sorgfältig drei Mal für jeweils fünf Minuten mit 1x TBS-T abgespült.

Es folgte die Herstellung einer Substrat-Arbeitslösung mit der *Dako REAL™ DAB+ Chromogen (50x)* und *Dako REAL™ HRP Substrate Buffer* im Verhältnis von 1:50. Die Objektträger wurden dann für sechs Minuten in einer feuchten Kammer mit der Substrat-Arbeitslösung inkubiert und danach kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Die gesuchten Antigenstrukturen haben sich dann bereits in brauner Farbe hervorgehoben.

Nun wurden die Zellkerne mit verdünntem Hämatoxylin (Verdünnung von 1:5 mit destilliertem Wasser) für mindestens drei Minuten gegengefärbt.

Daraufhin wurden die Objektträger zuerst unter fließendem Wasser, danach mit 70% Ethanol ausgespült, dann zwei Minuten in 96% Ethanol und im Anschluss für vier Minuten mit absolutem Ethanol bedeckt.

Im letzten Schritt wurden die Objektträger nach 4-minütiger Xylol-Inkubation mit Entellan (*Xylene based*) beträufelt und mit Deckgläsern vorsichtig bedeckt.

Abschließend wurden alle Objektträger über Nacht getrocknet.

3.5.3. Färbeprotokoll HLA-A nach der LSAB-Methode

Nach Vorbehandlung der histologischen Schnitte wurde das Gewebe auf den Objektträgern mittels *PAP-Pen* umkreist. Anschließend wurde auch hier, zur Reduzierung der Hintergrundfärbung, im nächsten Schritt das Blocken mittels Ziegenserum durchgeführt. Dafür wurde das Ziegenserum 1 zu 10 in 1%-igem BSA mit TBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Objektträger gegeben.

Die Primärantikörper wurden dann mit einer Verdünnung von 1:5000 mit *Dilution Buffer (Dilution Buffer* aus dem Kit: *Dako REAL™ Antibody Diluent*) auf die vorbehandelten Objektträger gegeben und über Nacht bei 4°C in eine feuchte Kammer gestellt. Pro Gewebeschnitt wurden dafür 100 µl Antikörper-Verdünnung verwendet.

Am Folgetag wurden die Objektträger zwei Mal für fünf Minuten in 1x TBS-T gespült, um dann im nächsten Schritt die endogene Peroxidase zu blockieren. Dazu wurden die Objektträger mit 0,3%iger H₂O₂ *Stock-Solution* in TBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden diese zwei Mal für fünf Minuten auf dem Magnetprüher in TBS-T ausgewaschen.

Die Objektträger wurden erst mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten inkubiert, dann drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T gespült und zuletzt nochmals 30 Minuten mit dem Tertiärsystem aus *Streptavidin-Biotin-Peroxidase(HRP)*-Komplex (*Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)*) für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach erneut dreimaligem Spülen in 1x TBS-T erfolgte die Herstellung der Substrat-Arbeitslösung mit der *Dako REAL™ DAB+ Chromogen (50x)* und *Dako REAL™ HRP Substrate Buffer* im Verhältnis von 1:50. Die Objektträger wurden dann für 20 Sekunden in einer feuchten Kammer mit dieser Substrat-Arbeitslösung inkubiert und danach kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Die gesuchten Antigenstrukturen haben sich dann bereits in brauner Farbe hervorgehoben.

Nun wurden die Zellkerne mit verdünntem Hämatoxylin (Verdünnung von 1:5 mit destilliertem Wasser) für mindestens drei Minuten gegengefärbt.

Daraufhin wurden die Objektträger zuerst unter fließendem Wasser, dann mit 70% Ethanol ausgespült und dann zwei Minuten in 96% Ethanol und im Anschluss für vier Minuten mit absolutem Ethanol bedeckt.

Im letzten Schritt wurden die Objektträger nach vierminütiger Xylol-Inkubation mit Entellan (*Xylene based*) betropfelt und mit Deckgläsern vorsichtig bedeckt.

Abschließend wurden alle Objektträger über Nacht getrocknet.

3.6. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte mit Rücksprache einer Fachärztin für Pathologie. Um eine Beeinflussung der Auswertung zu vermeiden, erfolgte diese ohne Kenntnis des genauen Gradings. Mithilfe des Immunreaktiven Scores (IRS), einer Bewertungsskala zur Quantifizierung der angefärbten Zellen, wurden die immunhistochemischen Färbungen klassifiziert. Dabei wurde sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl der positiven Zellen wie folgt beurteilt (Tabelle 6):

Tabelle 6: der Immunreaktive Score (IRS), von Remmele et al. und Halon et al.

Färbeintensität (SI):	positive Zellen (PP):	Bewertung des immunreaktiven Scores: IRS = SI * PP
0 = keine Reaktion	0= keine	0-2 = negativ
1= schwache Reaktion	1= weniger als 10%	3-4= schwach positiv
2= mäßige Reaktion	2= zwischen 10 und 50%	6-8= mäßig positiv
3= starke Reaktion	3= zwischen 51 und 80%	9-12= stark positiv
	4= mehr als 80%	

Im Anschluss wurde die Färbeintensität mit der Anzahl der positiven Zellen multipliziert und man erhielt somit den immunreaktiven Score (IRS = Färbeintensität x positive Zellen).

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS und einem Statistiker. Für den Vergleich qualitativer Variablen wurden Kreuztabellen und der Chi-Quadrat-Test benutzt. Als Signifikanzniveau wurde bei allen Berechnungen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p- Wert <0,05) festgelegt.

Für die Darstellung repräsentativer Zentralwerte kamen arithmetische Mittelwerte, Medianwerte, Standardabweichungen und 95%- Konfidenzintervalle zur Anwendung.

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

3.8. Patientendaten

Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studienpopulation wurden wie folgt festgelegt:

Tabelle 7: Einschluss- und Ausschlusskriterien der Studienpopulation

Einschlusskriterien:	Ausschlusskriterien:
Vorliegen eines Kolonkarzinoms	Kein Primärtumor
Operative Therapie des Kolonkarzinoms	Simultanes Karzinom in einem anderen Organsystem

Um Rückschlüsse ziehen zu können, ob etwaige Risikofaktoren, Begleiterkrankungen oder andere relevanten Patienteninformationen einen Einfluss auf den MAPK-Signalweg oder die HLA-Exprimierung haben, wurden aus Patientenakten relevante Informationen recherchiert. Somit konnten viele Daten wie die Lokalisation des Tumors, das Alter, der BMI und das Geschlecht der Patienten, das Suchtverhalten in Bezug auf Nikotin und Alkohol, Vorerkrankungen wie arterieller Hypertonus, COPD, KHK, Zustand nach Cholezystitis oder Cholezystektomie und Niereninsuffizienz ermittelt werden. Aber auch die Familienanamnese bezüglich Tumorerkrankungen, eigene vorrangegangene Tumorerkrankungen und Informationen zum aktuellen Krebsgeschehen wie das Grading, das UICC-Stadium, der Lymphknoten- und Lymphgefäß-Befall, die Metastasierung und die Tumorlokalisierung waren

wichtige Parameter, welche von jedem in die Studie mit einbezogenem Patienten, herausgesucht wurden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

4.1.1. Übersicht

Eine grobe Übersicht der Färbeergebnisse zeigt Abbildung 8. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei Patienten mit Kolonkarzinom in 20facher Vergrößerung. Die Bilder zeigen irreguläre, tubuläre Drüsenformationen mit Tumorzellen, die vor allem durch große Zellkerne, vielen Mitosen und erhöhten Kern-/Plasma-Relationen auffallen. Teilweise sind auch Infiltrationen der Tumorzellen in die Submukosa und Muscularis propria sichtbar.

Die Bilder A1 und A2 sind Hämatoxylin- Eosin (HE)-Färbungen, die Bilder B1 und B2 Anfärbungen mit dem HLA- Antikörper und die Bilder C1 und C2 sind Anfärbungen mit dem p-Erk-Antikörper. Die mit den Antikörpern angefärbten Zellen stellen sich dabei braun dar, während sich bei den HE-Färbungen keine spezifische Anfärbung finden lässt.

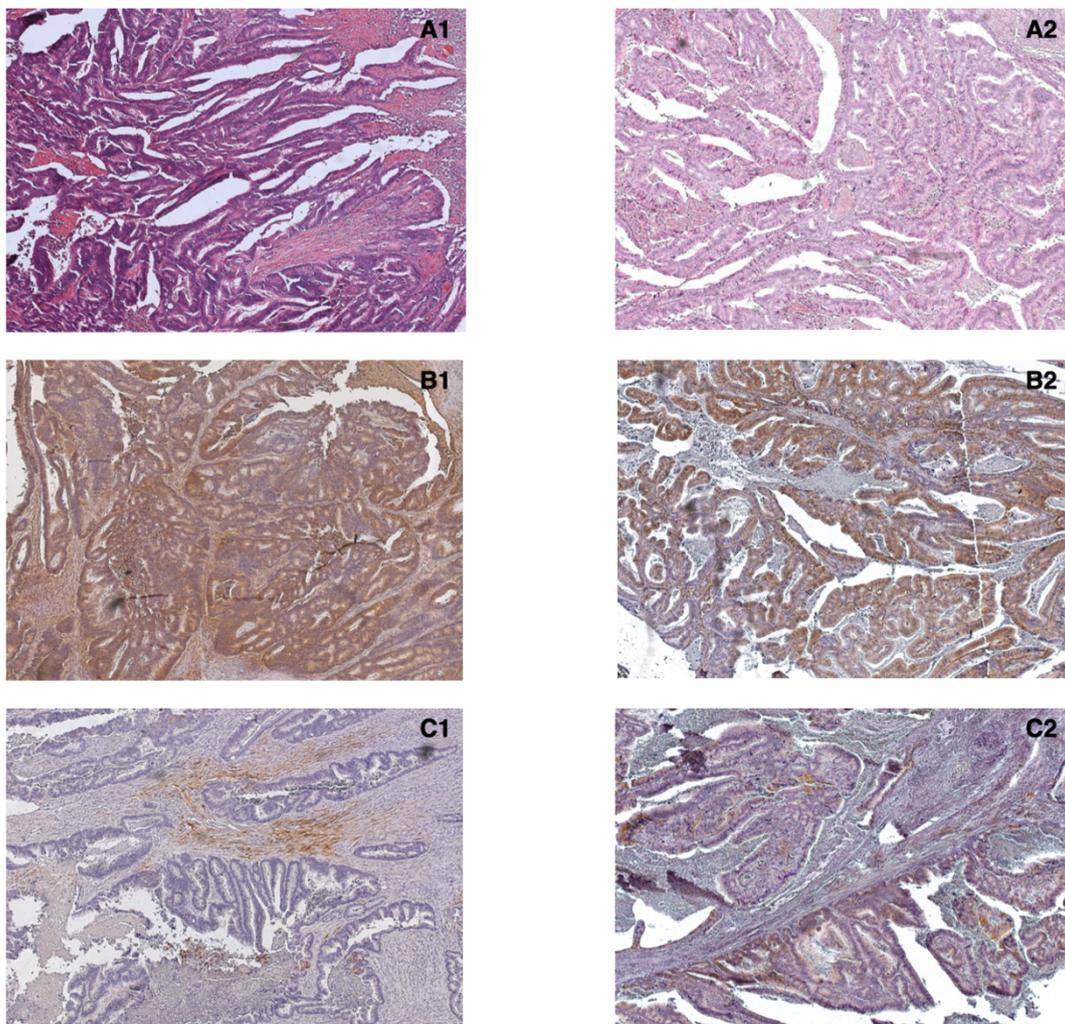


Abbildung 8: Repräsentative Abbildungen immunhistochemischer Hämatoxylin- Eosin-Färbungen (A1 und A2), Anti-HLA-Färbungen (B1 und B2) und Anti-p-Erk-Färbungen (C1 und C2) in 20facher Vergrößerung

4.1.2. HLA

Abbildung 9 zeigt das Färbeergebnis mit dem HLA-A-Antikörper von drei unterschiedlichen Patientengeweben des Dickdarms in 20facher Vergrößerung. In aufsteigender Reihenfolge von B1 zu B3 lässt sich eine Abnahme der HLA- A- Anfärbung erkennen.

Die wichtigsten Rezeptoren für die Erkennung körpereigener Zelloberflächen gehören zum HLA-System. Es findet sich in den Plasmamembranen aller Zellen, mit Ausnahme der Erythrozyten. Daher sieht man hier wie zu erwarten eine relativ flächige Anfärbung der Karzinomgewebe.

In Bild B3 lässt sich außerdem der Übergang von Normalgewebe, auf der linken Hälfte des Bildes, in tumoröses Gewebe, auf der rechten Hälfte des Bildes, gut erkennen. Im direkten Vergleich sieht man, dass im Normalgewebe (linke Bildhälfte) die Kolonkrypten mit ihren vielen Becherzellen unverzweigt verlaufen und regelmäßig geformt sind. Im Gegensatz dazu sieht man auf der rechten Hälfte vergrößerte, polymorphe Zellen mit einer erhöhten Kern/Plasma- Relation und destruierendem Wachstum. Dies ist typisch für tumoröses Gewebe im Kolon.

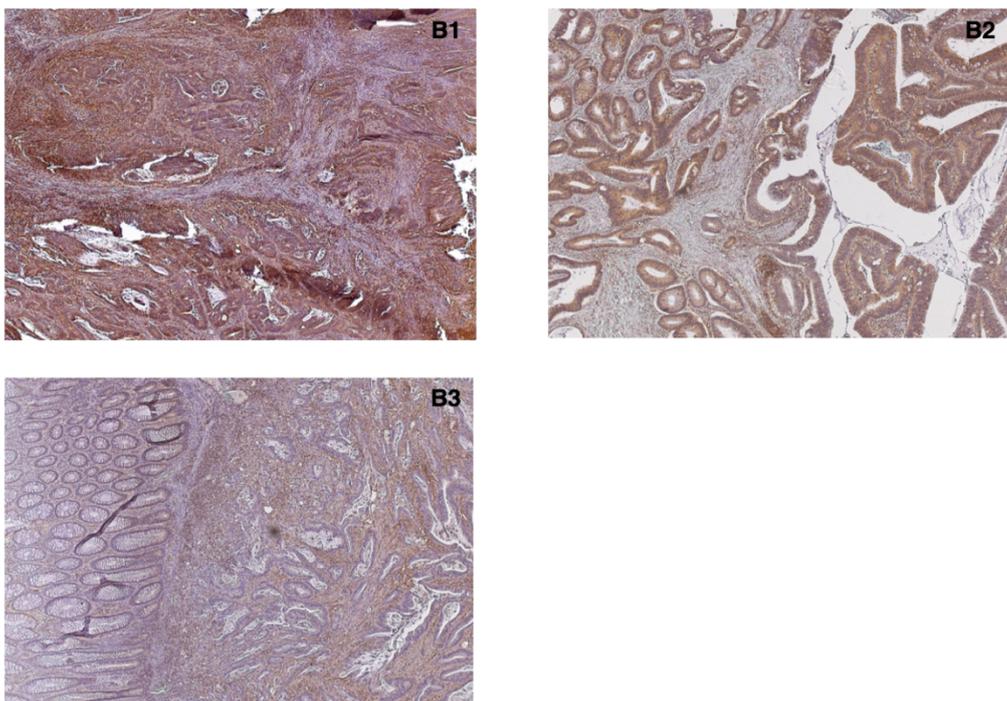


Abbildung 9: Immunhistochemische Anfärbung von Kolonkarzinomen von drei unterschiedlichen Patienten mit einem HLA-A-Antikörper (20fache Vergrößerung)
C1: stark positive Anfärbung, C2: mäßig positive Anfärbung, C3: schwach positive Anfärbung

4.1.3. p-Erk

Abbildung 10 zeigt das Färbeergebnis von drei unterschiedlichen Patienten mit Kolonkarzinomen mit dem p-Erk-Antikörper in 20facher Vergrößerung. Der p-Erk-Antikörper ermöglicht die Visualisierung phosphorylierter ERK-Kinasen, welche sich im Allgemeinen im Zytoplasma befinden und bei Aktivierung in den Zellkern gelangen, wo sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors, sowie die Genexpression regulieren. Die hier verwendeten Antikörper Anti- ERK1 + ERK2 (phosphor T202 + Y204) binden an den zwei regulatorischen Stellen Thr 202/185 und Tyr 204/187. Bei C1 handelt es sich um eine stark positive Färbung, bei C2 um eine mäßig positive Färbung und bei C3 um eine schwach positive Färbung.

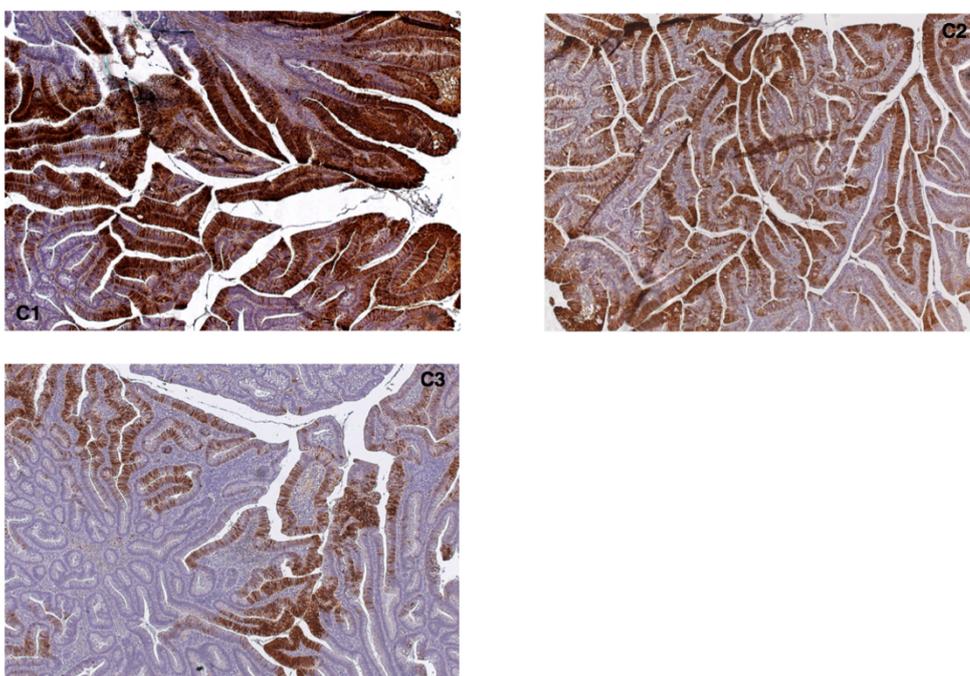


Abbildung 10: Immunhistochemische Anfärbung von Kolonkarzinomen von drei unterschiedlichen Patienten mit dem p-Erk-Antikörper (20fache Vergrößerung)

C1: stark positive Anfärbung, C2: mäßig positive Anfärbung, C3: schwach positive Anfärbung

4.1.4. Positivkontrollen

Abbildung 11 zeigt die Positivkontrollen in 20facher Vergrößerung. Bild A1 zeigt einen Ausschnitt eines Mammakarzinoms nach immunhistochemischer Färbung mit dem p-Erk-Antikörper. Dabei sieht man die für das Brustgewebe typischen Glandulae mammae, umgeben von sogenanntem Mantelbindegewebe, kollagenem Bindegewebe und zahlreichen Fettzellen.

Bild A2 zeigt den Ausschnitt eines Lymphknotens nach immunhistochemischer Färbung mit dem HLA-A-Antikörper.

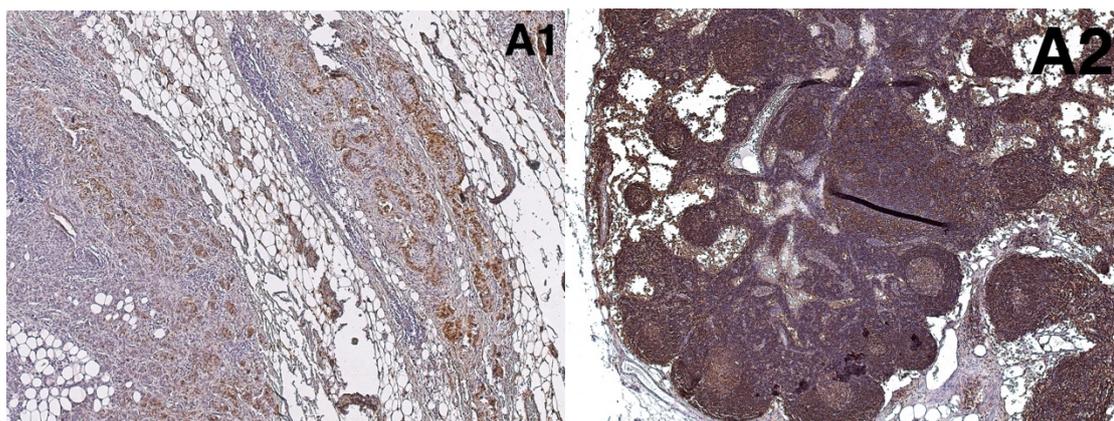


Abbildung 11: Positivkontrollen von Mammakarzinom Gewebe (A1) für den p-Erk- Antikörper und Lymphknotengewebe (A2) für den HLA- A- Antikörper (20fache Vergrößerung)

4.2. Patientenkollektiv

Tabelle 8: Übersicht über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs nach epidemiologischen, klinischen und pathologischen Daten (verwendete Abkürzungen: BMI = *body mass index*, COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung, KHK = koronare Herzerkrankung, LK = Lymphknoten)

Relevante klinische und pathologische Patientendaten	
Patientenzahl insgesamt	54 (100%)
Lokalisation	
rechts	24 (44,4%)
links	30 (55,5%)
Alter	
< 50	4 (7,4%)
> 50	50 (92,6%)
BMI	
< 30	39 (72,2%)
> 30	15 (27,8%)
Geschlecht	
männlich	37 (68,5%)
weiblich	17 (31,5%)
Nikotinabusus	
ja	2 (3,7%)
nein	52 (96,3%)
Alkoholabusus	
ja	5 (9,3%)
nein	49 (90,7%)

Diabetes mellitus II	
ja	17 (31,5%)
nein	37 (68,5%)
Arterieller Hypertonus	
ja	32 (59,3%)
nein	22 (40,7%)
COPD	
ja	5 (9,3%)
nein	49 (90,7%)
KHK	
ja	14 (25,9%)
nein	40 (74,1%)
Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie	
ja	6 (11,1%)
nein	48 (88,9%)
Niereninsuffizienz	
ja	8 (14,8%)
nein	46 (85,2%)
Grading	
1	1 (1,9%)
2	33 (61,1%)
3	20 (37%)
T-Stadium	
T1	8 (14,8%)
T2	24 (44,4%)
T3	14 (25,9%)
T4	8 (14,8%)
LK-Befall	
ja	28 (51,9%)
nein	26 (48,2%)
Metastasierung	
ja	12 (22,2%)
nein	42 (77,7%)
Zweitumor	
ja	12 (22,2%)
nein	42 (77,7%)
Positive Familienanamnese	
ja	4 (7,4%)
nein	50 (92,6%)

Das durchschnittliche Manifestationsalter im eigenen Patientengut mit $69,6 \pm 14,2$ Jahren deckt sich mit den meisten Angaben aus der Literatur (Bertz, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, und Robert-Koch-Institut 2006).

Im eigenen Patientengut überwog der Männeranteil die Frauen um mehr als das Zweifache mit 68,5% zu 31,5%.

Obwohl nur rund 28% der Patienten einen BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$ hatten, so hatten 65% der Patienten einen BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$.

Die folgende Abbildung zeigt die Häufigkeiten der Tumorlokalisation des untersuchten Patientengutes:

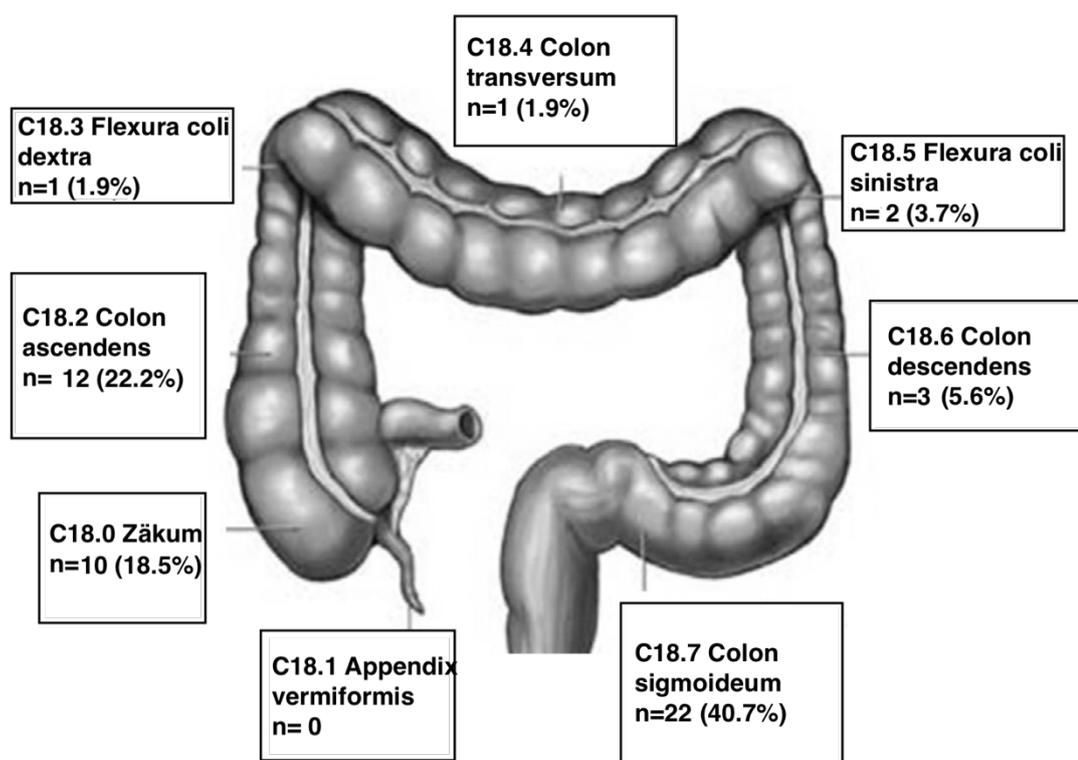


Abbildung 12: Verteilung der Tumorlokalisationen im eigenen Patientengut

In der untersuchten Studienpopulation wurden weniger rechtsseitig als linksseitig lokalisierte Kolonkarzinome gezählt. Die meisten Erkrankungsfälle traten im Colon sigmoideum auf, gefolgt vom Colon ascendens und dem Zäkum. Diese Rangfolge stimmt mit vielen Ergebnissen anderer Autoren überein.

Die Anzahl präparierter Lymphknoten ist ausschlaggebend, um einen positiven Lymphknotenbefall diagnostizieren zu können. Pro Patient wurden im Durchschnitt 17,4

Lymphknoten präpariert. Der Median lag bei 16,5 Lymphknoten. Bei N0 waren es im Mittel 18,5, bei N1 12,9 und bei N2 16,9 präparierte Lymphknoten. Laut Leitlinien lautet die Empfehlung ≥ 12 Lymphknoten zu präparieren. Im eigenen Patientengut wurde dies zu 84,6% erfüllt. In 15,4% der Fälle wurden allerdings weniger als 12 Lymphknoten präpariert.

Tabelle 9: Abhängigkeit der N-Stadien von der Anzahl präparierter Lymphknoten

Anzahl präparierter Lymphknoten	N0	N1	N2
< 12	4 (11,4%)	2 (25%)	2 (22,2%)
≥ 12	31 (88,6%)	6 (75%)	7 (77,8%)

4.3. Zusammengefasst

Folgende Ergebnisse wurden dabei beobachtet und tabellarisch dargestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Fallzahlen von den immunhistochemischen Färberegebnissen mit den HLA-A- und p-Erk-Antikörpern bei Kolonkarzinomgeweben

HLA	p-Erk					insgesamt (%)
	neg. (%)	schwach pos. (%)	mäßig pos. (%)	stark pos. (%)	insgesamt (%)	
neg. (%)	5 (9,3)	0 (0)	1 (1,9)	1 (1,9)	7 (13)	
schwach pos. (%)	2 (3,7)	3 (5,6)	0 (0)	0 (0)	5 (9,3)	
mäßig pos. (%)	14 (25,9)	1 (1,9)	4 (7,4)	1 (1,9)	20 (37)	
stark pos. (%)	20 (37)	0 (0)	1 (1,9)	1 (1,9)	22 (40,7)	
insgesamt (%)	41 (75,9)	4 (7,4)	6 (11,1)	3 (5,6)	54 (100)	

Insgesamt wurden die p-Erk-Färbungen von 41 Patienten als negativ, 4 Patienten als schwach positiv, 6 Patienten als mäßig positiv und 3 Patienten als stark positiv beurteilt. So wurden 75,9% aller Färbungen mit dem p-Erk-Antikörper negativ bewertet. Bei den HLA-A-Färbungen wurden 7 Patienten als negativ, 5 Patienten als schwach positiv, 20 Patienten als mäßig positiv und 22 Patienten als stark positiv beurteilt. Während die p-Erk-Färbungen also zu rund zwei Drittel (75,9%) negative Ergebnisse zeigten, waren die HLA-A-Färbungen zu 40,7% stark und zu 37% mäßig positiv.

Vereinfacht mithilfe einer 4-Felder-Tafel lässt sich zusätzlich das Odds Ratio berechnen.

(OR=0,764)

Die Wahrscheinlichkeit bei negativ bewerteter p-Erk-Expression ein positives HLA- A- Färbeergebnis zu bekommen ist mit einer Odds Ratio (OR) < 1 nicht höher als bei einer als positiv bewerteten p- Erk- Expression.

Tabelle 11: 4- Felder- Tafel der immunhistochemischen Färbeergebnisse mit den HLA-A- und p-Erk- Antikörpern bei Kolonkarzinomgeweben

HLA	p-Erk		insgesamt (%)
	negativ (%)	positiv (%)	
negativ (%)	5 (9,3)	2 (3,7)	7 (13)
positiv (%)	36 (66,7)	11 (20,3)	47 (87)
insgesamt (%)	41 (75,9)	13 (24,1)	54 (100)

4.4. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Grafische Darstellung und Auswertung der Korrelation der Färbeergebnisse mit klinischen Parametern

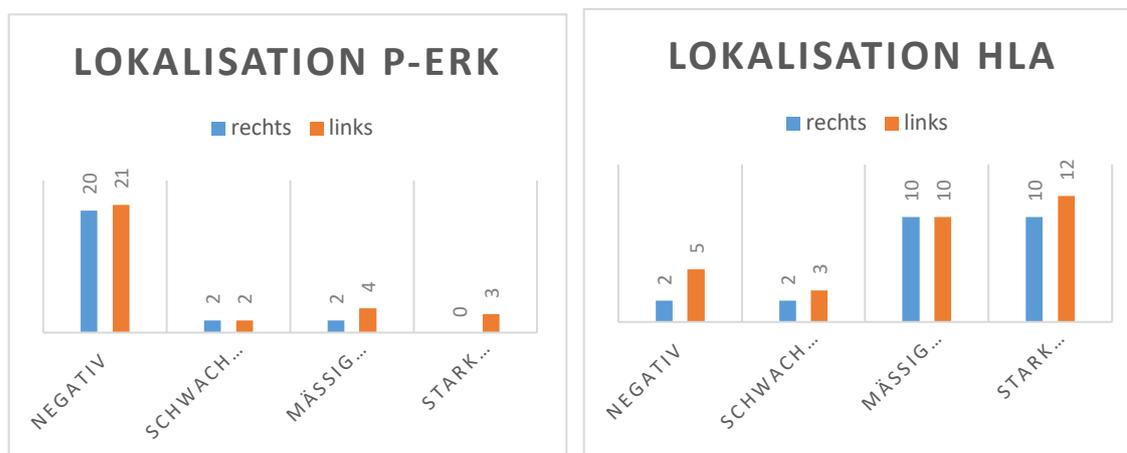


Abbildung 13

Abbildung 14

Abb. 13 zeigt die Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und der Lokalisation des Tumors
Abb. 14 zeigt die Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und der Lokalisation des Tumors

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p- Erk- Expressierung ($p= 0,075$) und der HLA-A- Expressierung ($p = 0,365$) bei rechter Tumorlokalisation gegenüber linker Lokalisation im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

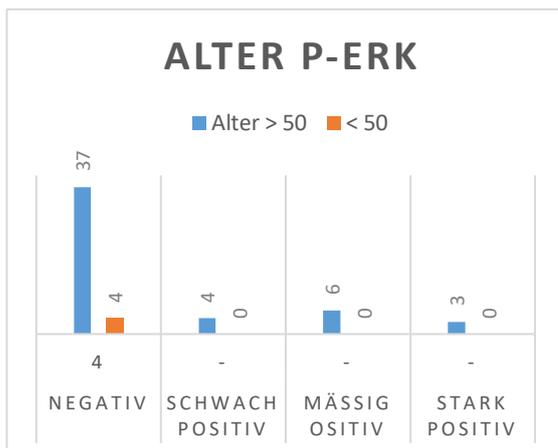


Abbildung 15

Abbildung 16

Abb. 15 zeigt die Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und dem Patientenalter

Abb. 16 zeigt die Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und dem Patientenalter

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expressierung ($p = 0,186$) und der HLA-A-Expressierung ($p = 0,059$) bei Patienten älter als 50 Jahren bei Erstdiagnose gegenüber jüngeren im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

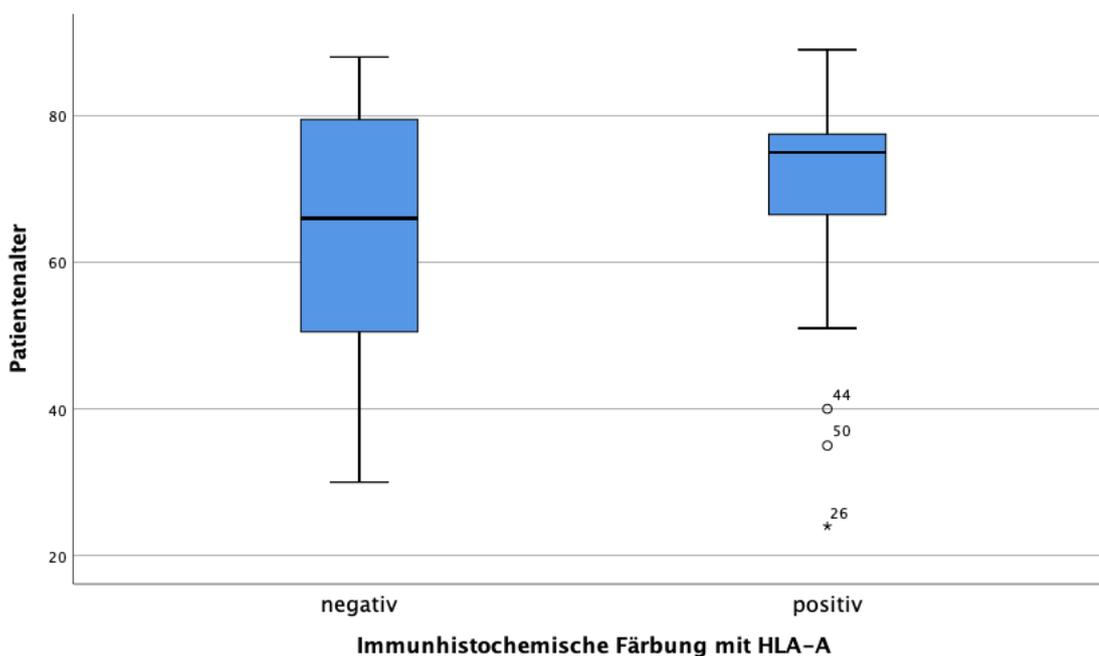


Abbildung 17: Boxplots für die HLA-A-Expressierung je nach Patientenalter

Das mittlere Alter der 41 als negativ bewerteten HLA-A-Färbungen beträgt 63,43 Jahre mit einer Standardabweichung von 20,75 Jahren. Mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit liegt das Alter zwischen 44,24 und 82,62 Jahren. Das mediane Alter beträgt 66 Jahre mit einem Minimum von 30 und einem Maximum von 88 Jahren. Das mittlere Patientenalter der 13 als positiv bewerteten HLA-A-Färbungen beträgt 70,55 Jahre mit einer Standardabweichung von 12,94 Jahren. Mit

95%-iger Wahrscheinlichkeit liegt das Alter zwischen 66,75 und 74,35 Jahren. Das mediane Alter beträgt 75 Jahre mit einem Minimum von 24 und einem Maximum von 89 Jahren.

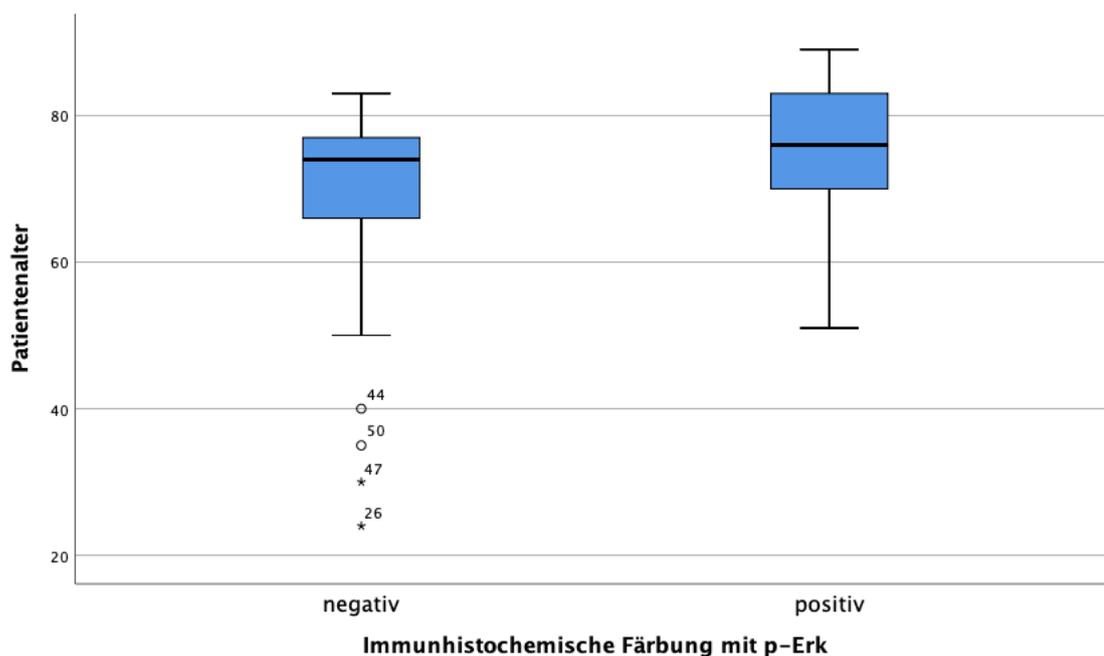


Abbildung 18: Boxplots für die p-Erk-Expression je nach Patientenalter

Das mittlere Alter der 41 als negativ bewerteten p-Erk-Färbungen beträgt 68,1 Jahre mit einer Standardabweichung von 14,62 Jahren. Mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit liegt das Alter zwischen 63,48 und 72,71 Jahren. Das mediane Alter beträgt 74 Jahre mit einem Minimum von 24 und einem Maximum von 83 Jahren. Das mittlere Patientenalter der 13 als positiv bewerteten p- Erk- Färbungen beträgt 74,46 Jahre mit einer Standardabweichung von 11,72 Jahren. Mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit liegt das Alter zwischen 67,38 und 81,54 Jahren. Das mediane Alter beträgt 76 Jahre mit einem Minimum von 51 und einem Maximum von 89 Jahren.

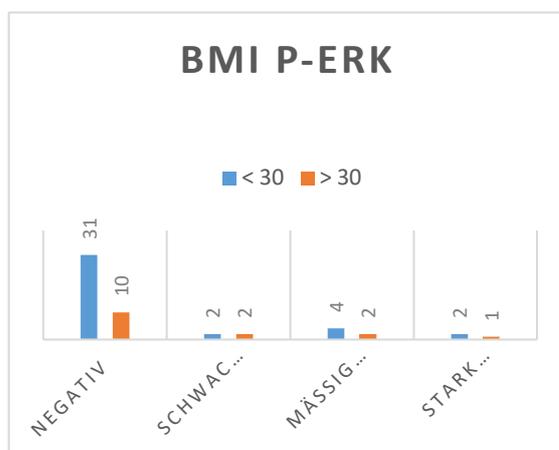


Abbildung 19

Abb. 19: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und dem Patienten BMI

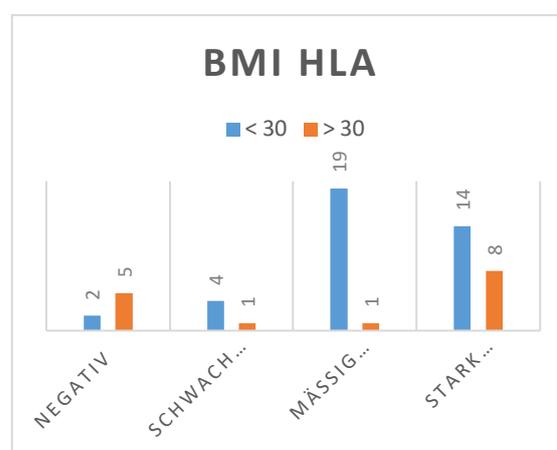


Abbildung 20

Abb. 20: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und dem Patienten BMI

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expression ($p = 0,664$) und HLA-A-Expression ($p = 0,393$) bei Patienten mit einem BMI > 30 gegenüber Patienten mit einem BMI < 30 im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

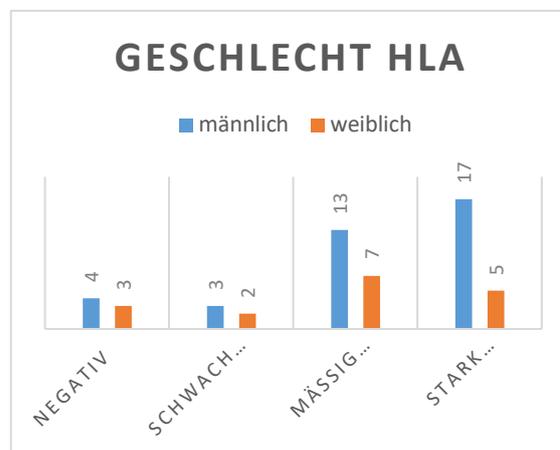
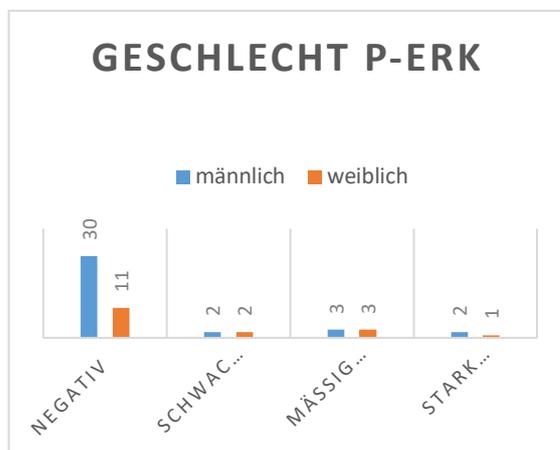


Abbildung 21

Abbildung 22

Abb. 21: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und dem Geschlecht der Patienten

Abb. 22: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und dem Geschlecht der Patienten

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expression ($p = 0,534$) und HLA-A-Expression ($p = 0,487$) bei Männern gegenüber Frauen im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

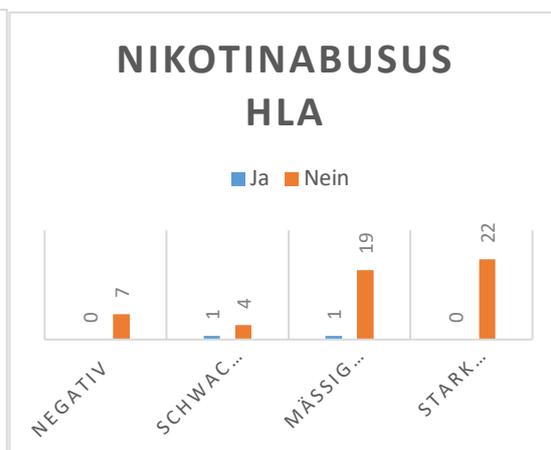
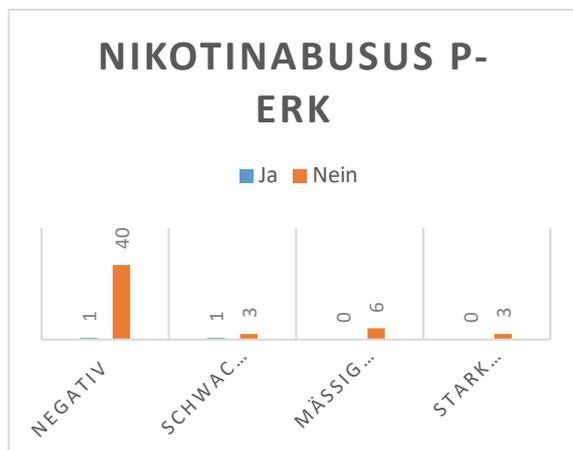


Abbildung 23

Abbildung 24

Abb. 23: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Nikotinabusus

Abb. 24: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Nikotinabusus

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expression ($p = 0,382$) und HLA-A-Expression ($p = 0,623$) bei Patienten mit Nikotinabusus gegenüber Patienten ohne Nikotinabusus im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

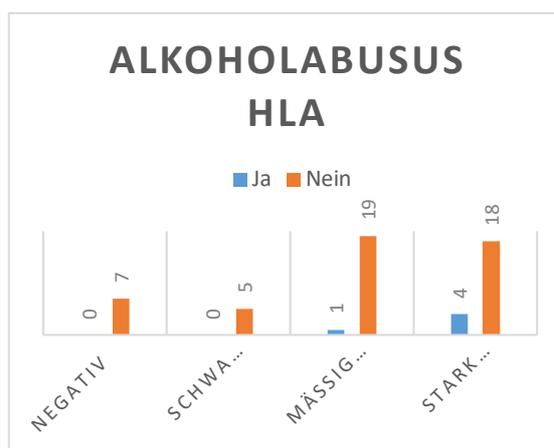
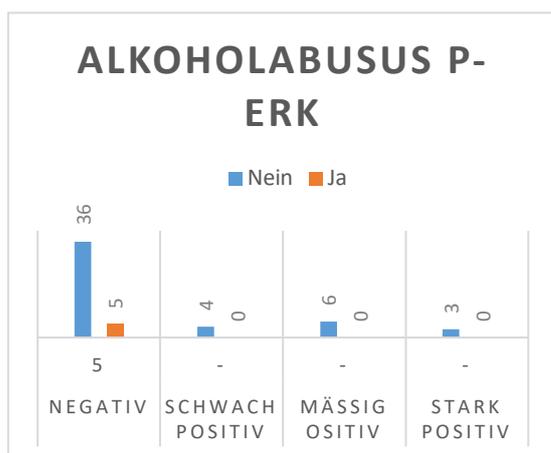


Abbildung 25

Abbildung 26

Abb. 25: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Alkoholabusus

Abb. 26: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Alkoholabusus

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,242$) und HLA-A-Exprimierung ($p = 0,422$) bei Patienten mit Alkoholabusus gegenüber Patienten ohne Alkoholabusus im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

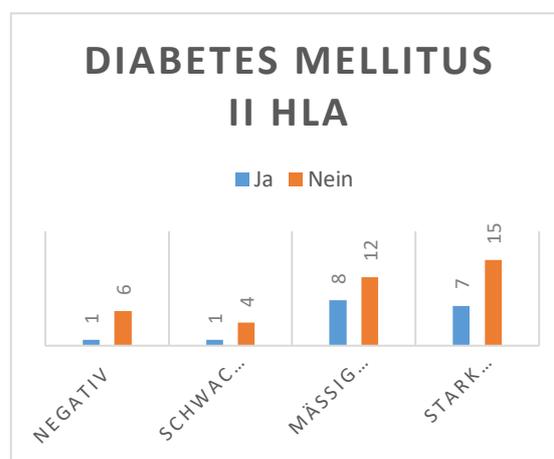
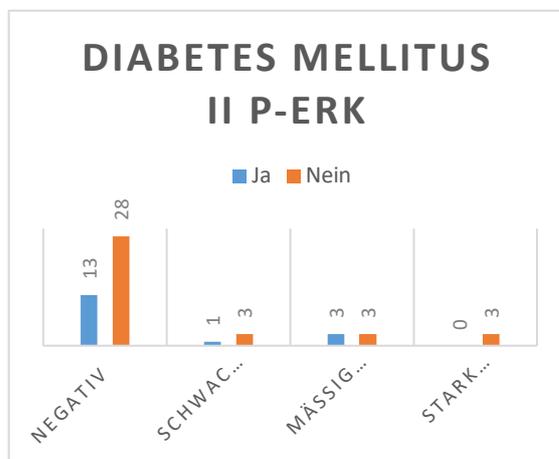


Abbildung 27

Abbildung 28

Abb. 27: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Diabetes mellitus II

Abb. 28: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Diabetes mellitus II

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,534$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,294$) bei Patienten mit Diabetes mellitus II gegenüber Patienten ohne Diabetes mellitus II im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

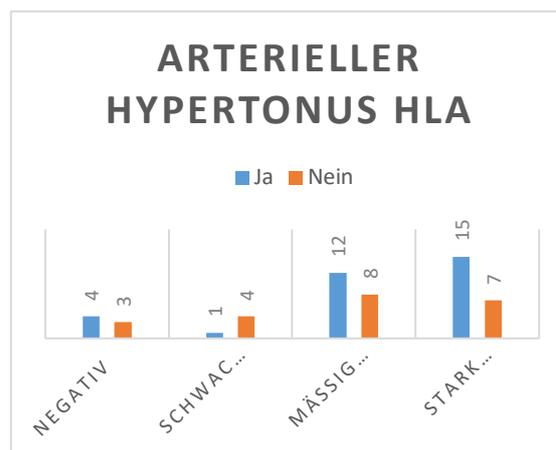
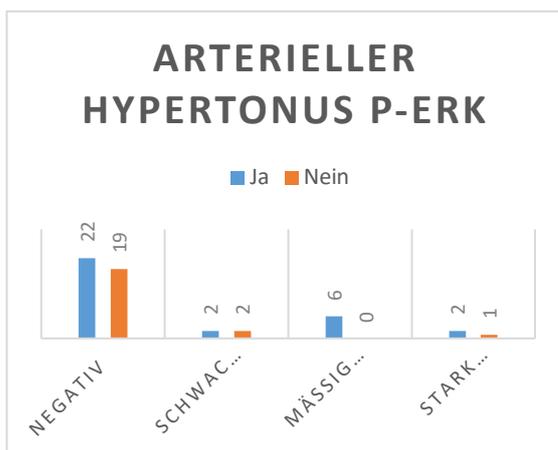


Abbildung 29

Abb. 29: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Arteriellem Hypertonus

Abbildung 30

Abb. 30: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Arteriellem Hypertonus

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,137$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,344$) bei Patienten mit arterieller Hypertonie gegenüber Patienten ohne arterieller Hypertonie im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

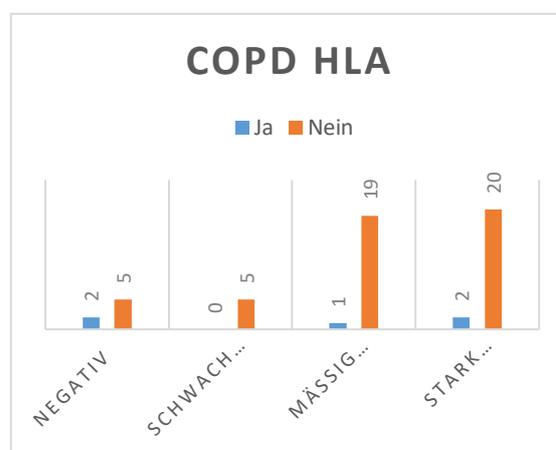
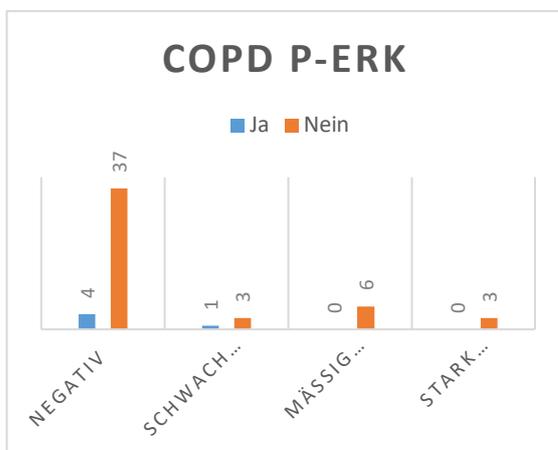


Abbildung 31

Abb. 31: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit COPD und ohne COPD

Abbildung 32

Abb. 32: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit COPD und ohne COPD

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,823$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,623$) bei Patienten mit COPD gegenüber Patienten ohne COPD im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

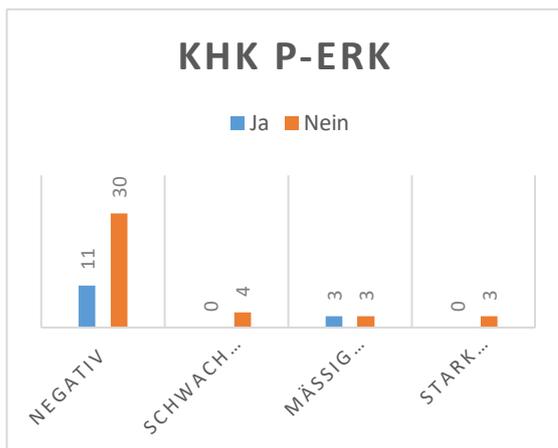


Abbildung 33

Abb. 33: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne KHK

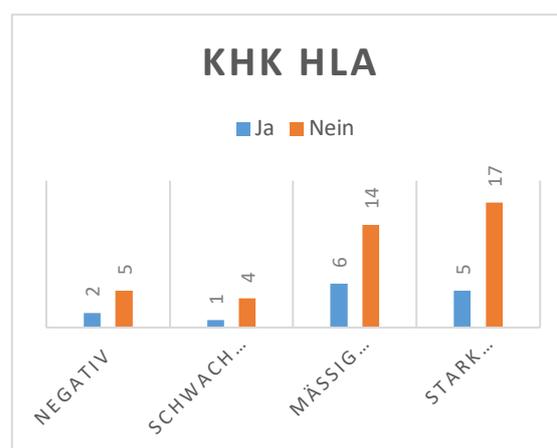


Abbildung 34

Abb. 34: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne KHK

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expression ($p = 0,647$) und der HLA-A-Expression ($p = 0,451$) bei Patienten mit KHK gegenüber Patienten ohne KHK im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

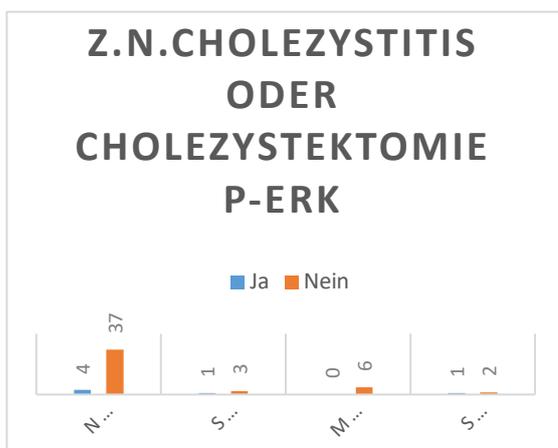


Abbildung 35

Abb. 35: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie

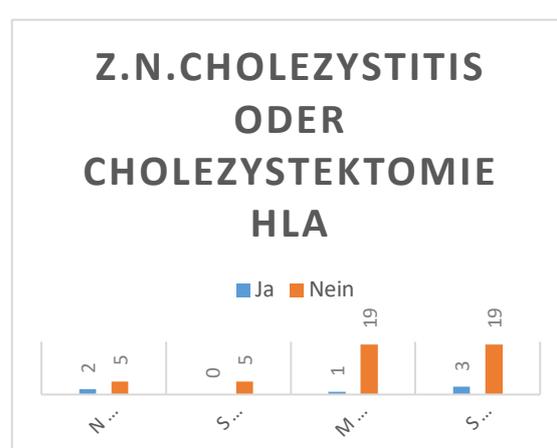


Abbildung 36

Abb. 36: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Expression ($p = 0,574$) und der HLA-A-Expression ($p = 0,316$) bei Patienten mit Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie gegenüber Patienten ohne Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

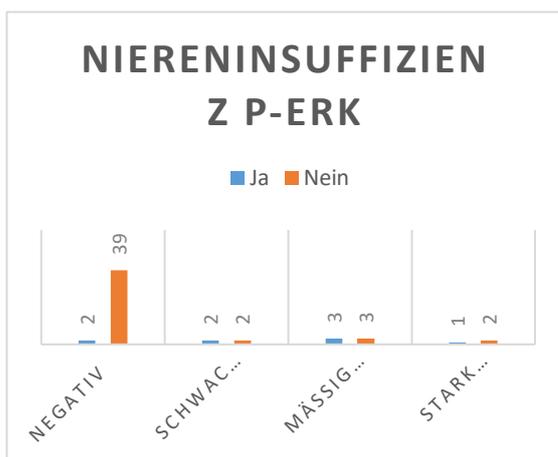
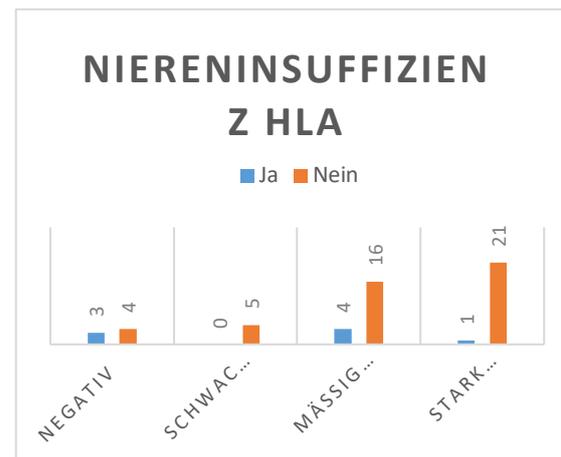


Abbildung 37

Abb. 37: Korrelation zwischen der p-erk-Expression und Patienten mit Niereninsuffizienz und ohne Niereninsuffizienz

Abbildung 38

Abb. 38: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit Niereninsuffizienz und ohne Niereninsuffizienz



Es konnte ein signifikanter Unterschied der p-erk-Exprimierung bei Patienten mit Niereninsuffizienz gegenüber Patienten ohne Niereninsuffizienz im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,006$). Die korrespondierenden Bilder dazu sind in Abbildung 39 und 40 dargestellt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der HLA-A-Exprimierung bei Patienten mit Niereninsuffizienz gegenüber Patienten ohne Niereninsuffizienz im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,966$).

Niereninsuffizienter Patient, positive p-erk-Färbung

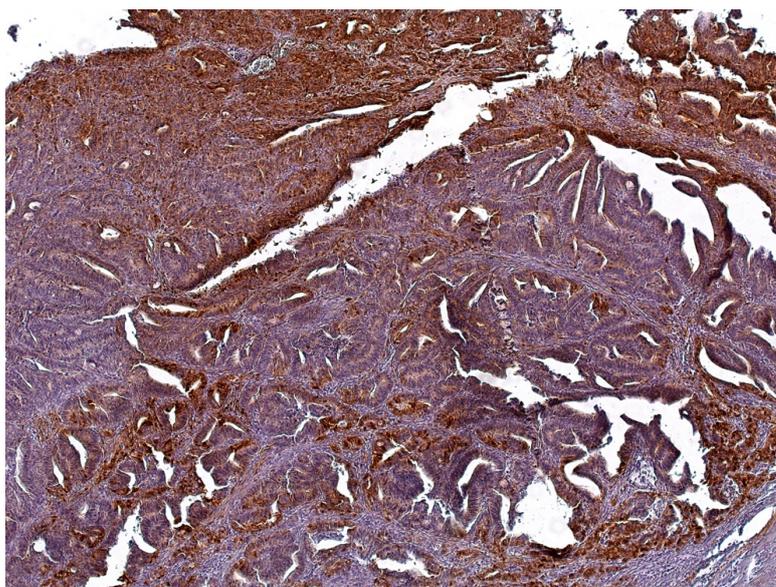


Abbildung 39: Ausschnitt eines Kolonkarzinomgewebes mit immunhistochemischer p-erk-Antikörper-Färbung, 20fache Vergrößerung

Nicht niereninsuffizienter Patient, negative p-Erk-Färbung

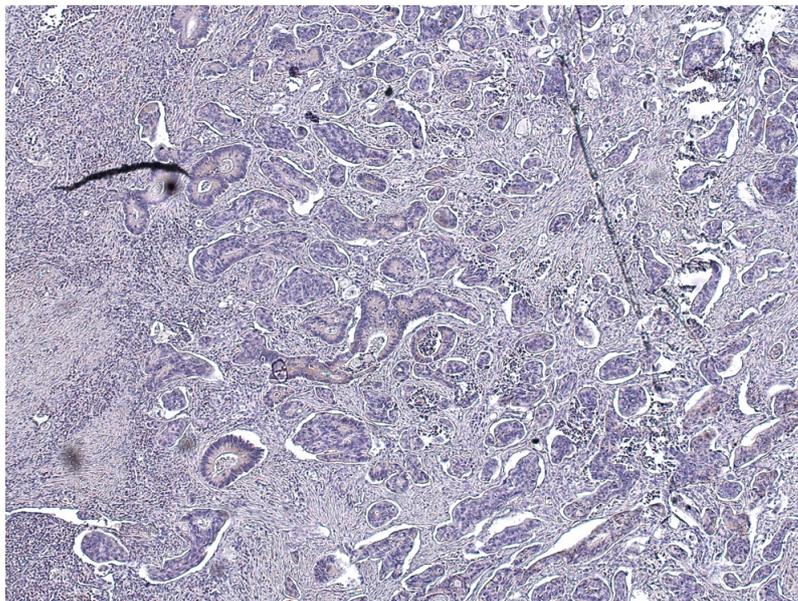


Abbildung 40: Ausschnitt eines Kolonkarzinomgewebes mit immunhistochemischer p-Erk-Antikörper-Färbung, 20fache Vergrößerung
Abbildung 40 repräsentiert exemplarisch Patienten, welche nicht an Niereninsuffizienz litten. Diese zeigten auffällig vermehrt negative p-Erk-Färbungen.

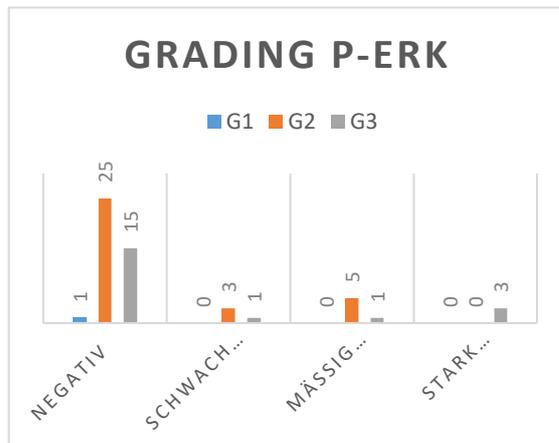


Abbildung 41

Abb. 41: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit Tumorgrading G1, G2 und G3

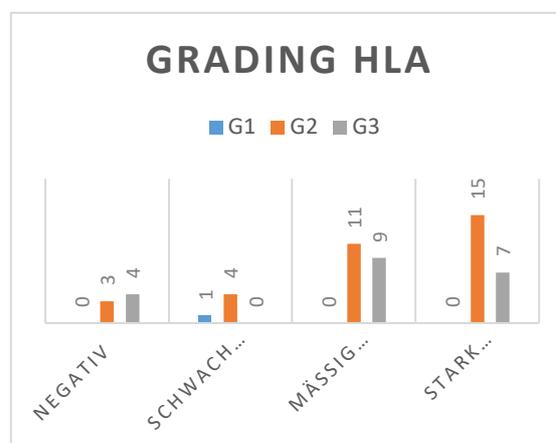


Abbildung 42

Abb. 42: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit Tumorgrading G1, G2 und G3

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung bei Patienten mit Tumorgrading G1 gegenüber Patienten Tumorgrading G2 gegenüber Patienten Tumorgrading G3 im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,654$).

Es konnte ein signifikanter Unterschied der HLA-A-Exprimierung bei Patienten mit Tumorgrading G1 gegenüber Patienten Tumorgrading G2 gegenüber Patienten Tumorgrading G3 im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,019$). Die korrespondierenden Bilder dazu sind in Abbildung 43 und 44 dargestellt.

Patient mit negativer HLA-A-Färbung, Grading G3

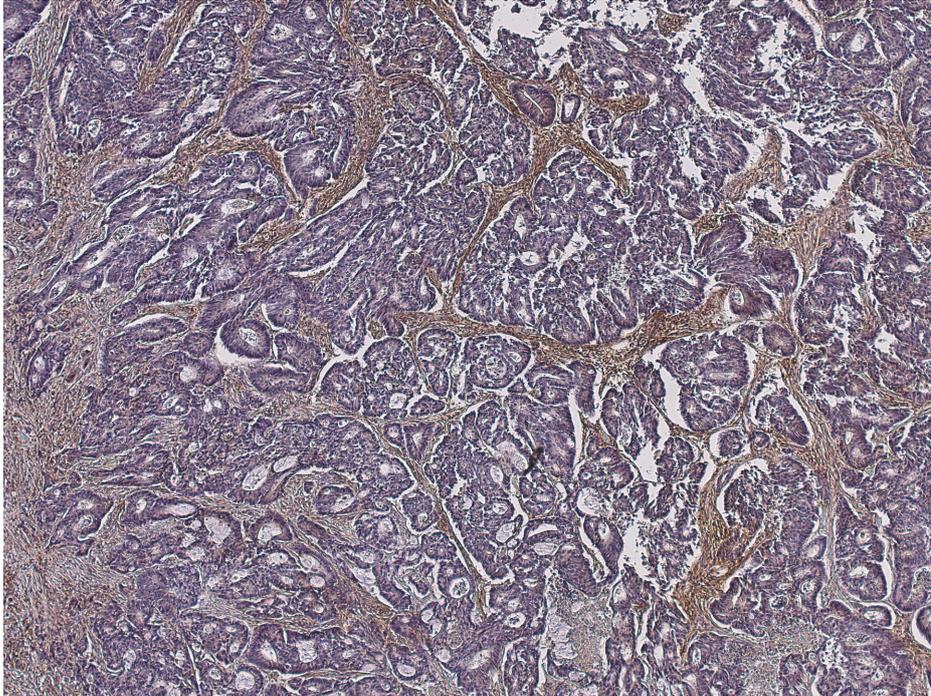


Abbildung 43: Ausschnitt eines Kolonkarzinomgewebes mit immunhistochemischer HLA-A-Antikörper- Färbung, 20fache Vergrößerung

Die abgebildete negative HLA-A-Färbung stammt von einem Patienten mit Tumorgrading G3.

Patient mit positiver HLA-A-Färbung, Grading G2

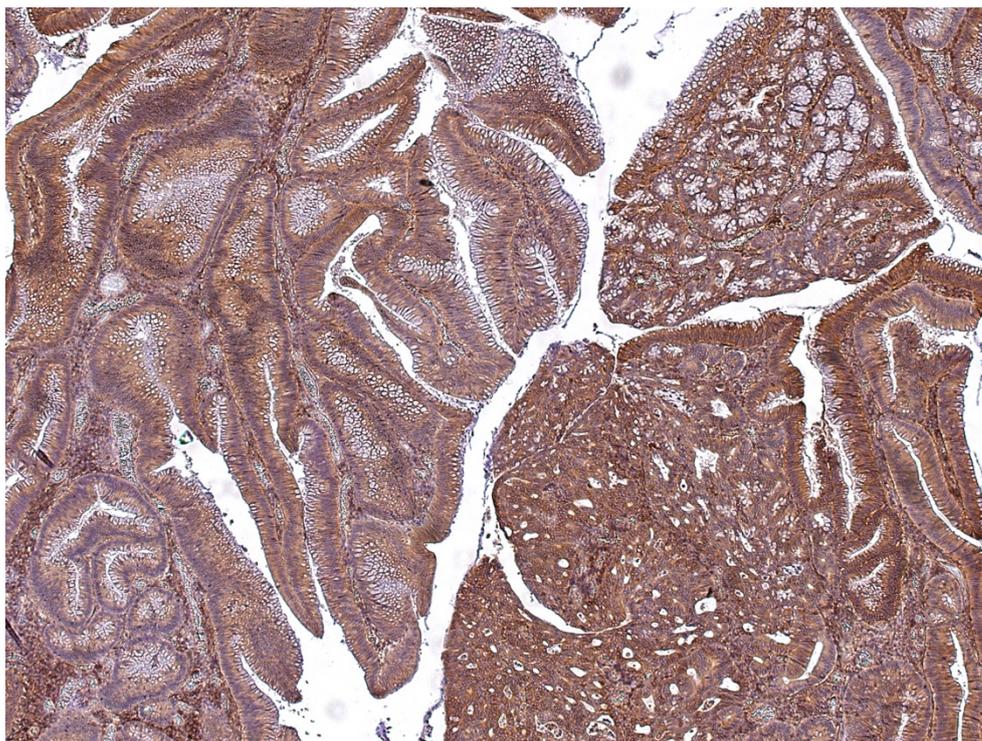


Abbildung 44: Ausschnitt eines Kolonkarzinomgewebes (rechte Bildhälfte) mit immunhistochemischer HLA-A-Antikörper-Färbung, 20fache Vergrößerung

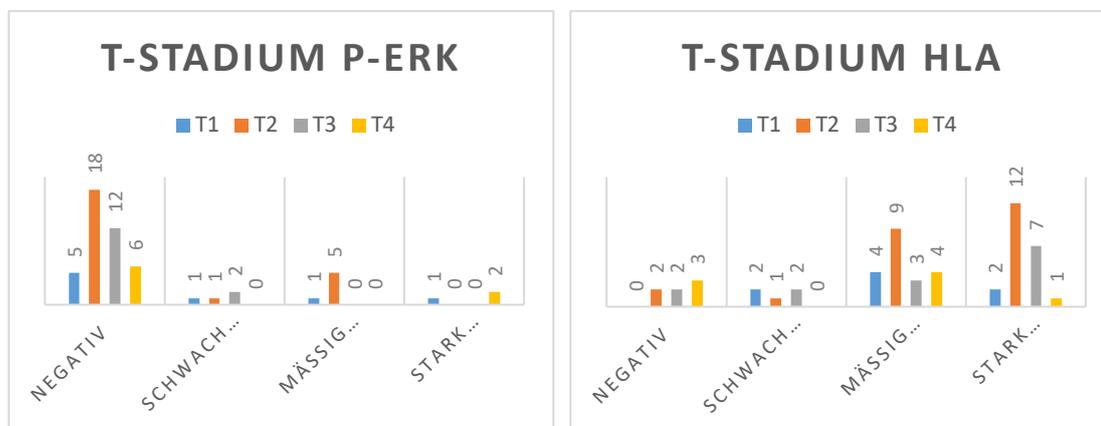


Abbildung 45

Abbildung 46

Abb. 45: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit Tumorklassifikation laut UICC in T1, T2, T3 und T4

Abb. 46: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit Tumorklassifikation laut UICC in T1, T2, T3 und T4

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,734$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,248$) bei Patienten mit unterschiedlichen T-Stadien im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

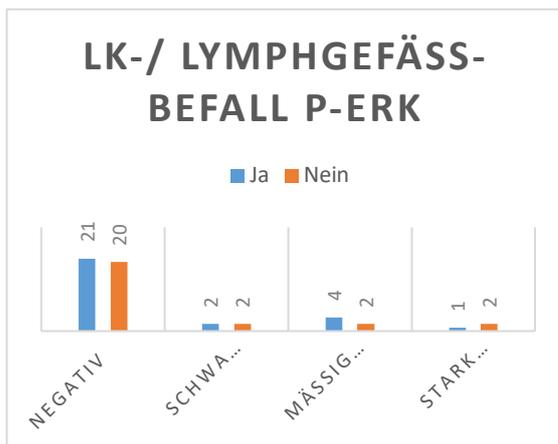


Abbildung 47

Abb. 47: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit LK-/ Lymphgefäß-Befall und ohne LK-/ Lymphgefäß-Befall.

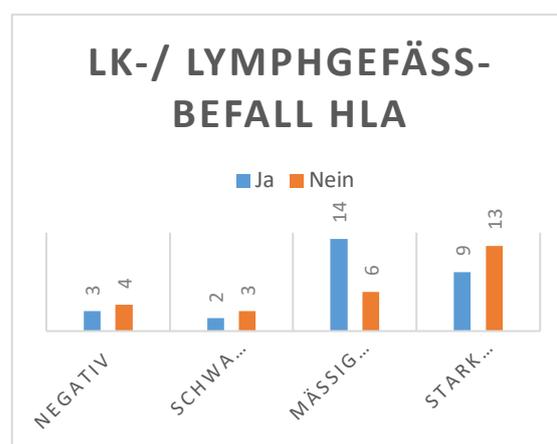


Abbildung 48

Abb. 48: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit LK-/ Lymphgefäß-Befall und ohne LK-/ Lymphgefäß-Befall.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($P= 0,422$) und der HLA-A-Exprimierung ($p= 0,610$) bei Patienten mit LK-/ Lymphgefäß-Befall gegenüber Patienten ohne LK-/ Lymphgefäß-Befall im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

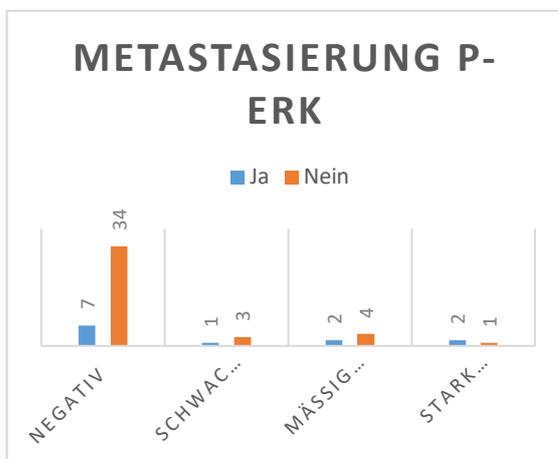


Abbildung 49

Abb. 49: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit Metastasen und ohne Metastasen

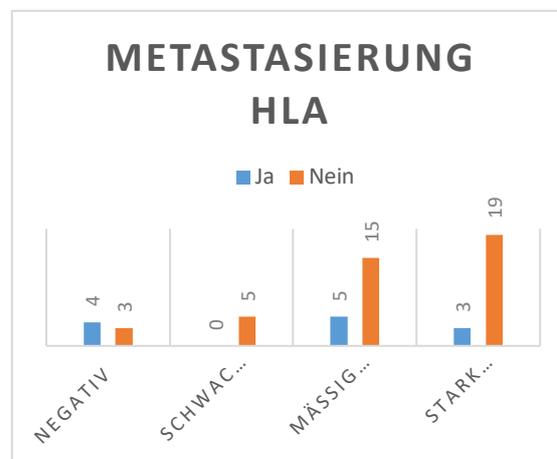


Abbildung 50

Abb. 50: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit Metastasen und ohne Metastasen

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,932$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,588$) bei Patienten mit Metastasierung gegenüber Patienten ohne Metastasierung im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

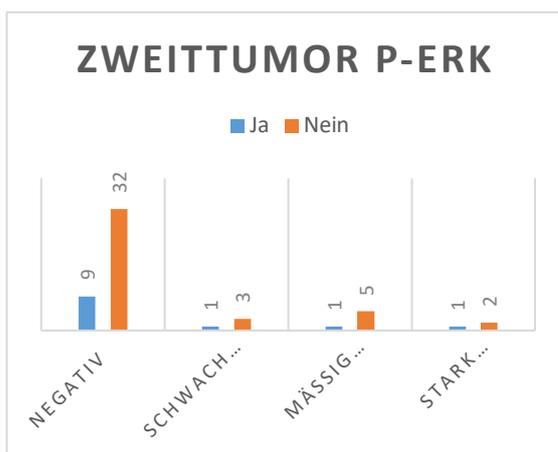


Abbildung 51

Abb. 51: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit und ohne Zweittumor

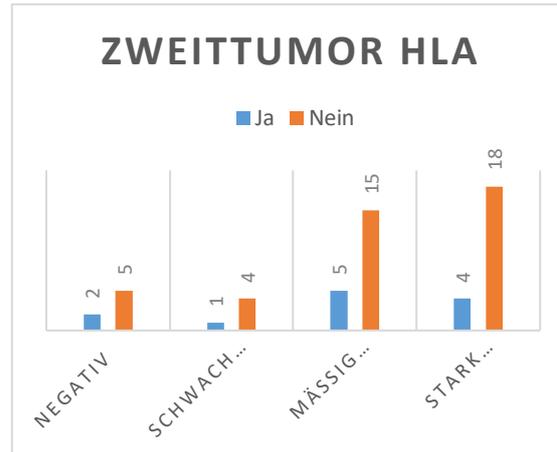


Abbildung 52

Abb. 52: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit und ohne Zweittumor

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung ($p = 0,932$) und der HLA-A-Exprimierung ($p = 0,665$) bei Patienten mit Zweittumor gegenüber Patienten ohne Zweittumor im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden.

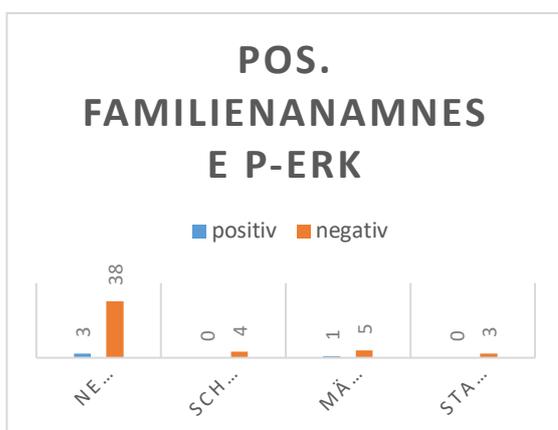


Abbildung 53

Abb. 53: Korrelation zwischen der p-Erk-Expression und Patienten mit positiver Familienanamnese

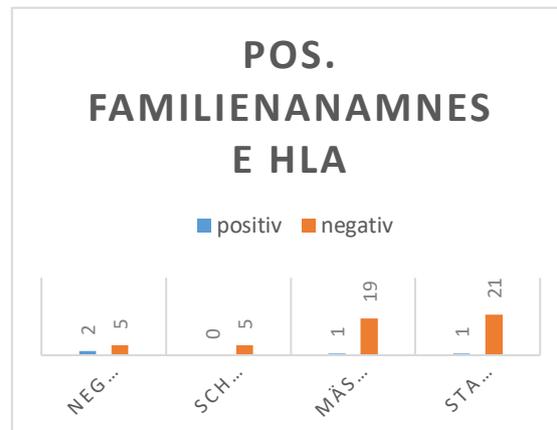


Abbildung 54

Abb. 54: Korrelation zwischen der HLA-A-Expression und Patienten mit positiver Familienanamnese

Es konnte kein signifikanter Unterschied der p-Erk-Exprimierung bei Patienten mit positiver Familienanamnese gegenüber Patienten ohne positiver Familienanamnese im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,964$).

Es konnte ein signifikanter Unterschied der HLA-A-Exprimierung bei Patienten mit positiver Familienanamnese gegenüber Patienten ohne positiver Familienanamnese im Kolonkarzinomgewebe nachgewiesen werden ($p = 0,022$).

Zusammengefasst:

Zunächst wurde in unserem Patientenkollektiv eine immunhistochemische Analyse zur p-Erk-Expression angefertigt. Dafür wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte von 54 Patienten mit einem Kolonkarzinom mit einem HLA-A-Antikörper und einem p-Erk-Antikörper gefärbt und die Färbeintensität gemäß dem o.a. Protokoll bestimmt.

In Abb. 10 exemplarisch dargestellt, zeigte sich bei 87% der Patienten mit einem Kolonkarzinom eine starke HLA-A-Expression. Bei 5 Patienten zeigte sich eine schwache, bei 20 Patienten eine moderate und bei 22 Patienten eine starke HLA-A-Expression.

In Abb. 11 exemplarisch dargestellt, zeigte sich bei 24,1% der Patientin mit einem Kolonkarzinom eine vermehrte p-Erk-Expression. Bei 4 Patienten zeigte sich eine schwache, bei 6 Patienten eine moderate und bei 3 Patienten eine starke p-Erk-Expression.

Anschließend wurde versucht, eine Korrelation zwischen einer HLA-A- sowie p-Erk-Expression und klinischen Parametern, zu identifizieren. Dafür wurden Patientendaten bezüglich Risikofaktoren untersucht und geschaut, ob etwaige klinische Parameter mit vermehrter oder vermindert Expression von HLA-A oder p-Erk einhergehen. Um Zusammenhänge objektiv beurteilen zu können, wurden p-Werte berechnet und damit Signifikanzen bestimmt.

Dabei konnte ein signifikanter Zusammenhang für das Grading der Tumorstadien sowie einer positiven Familienanamnese und der HLA-A- Expressierung nachgewiesen werden.

Für die 54 in die Studie eingeschlossenen Patienten zeigte nur der Parameter Niereninsuffizienz als einziger Faktor eine signifikante Korrelation mit der p-Erk- Expressierung.

Für die Faktoren Alter, Geschlecht, BMI, Nikotinabusus, Alkoholabusus, Diabetes mellitus II, arterielle Hypertonie, COPD, KHK, Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie, UICC-Stadium, Zweitumor und Metastasierung konnte kein signifikanter Zusammenhang für die p-Erk-/ oder HLA-A- Expressierung nachgewiesen werden.

5. Diskussion**5.1. Beurteilung der Methodik****5.1.1. Beurteilung des Materials**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Formalin-fixiertem Paraffin eingebettetem Gewebe vorgenommen, welches sich zwar durch einen guten Erhalt der morphologischen Strukturen, jedoch mit einer verminderten Reaktivität mit Antikörpern im Vergleich zu Kryogewebe auszeichnet. Da bisher vom Institut für Pathologie in Halle nur in Paraffin eingebettete Gewebe zur Verfügung standen, musste bei dieser Arbeit darauf zurückgegriffen werden.

Das Tumorgading und die Einteilung in UICC-Stadien wurden zwar von einem erfahrenen Pathologen vorgenommen, jedoch haben Studien gezeigt, dass diese Einteilung einer teilweise erheblichen Beobachter-Variabilität unterliegen kann (Burchardt u. a. 2008).

Die Qualität der Antikörper ist abhängig von dessen Herstellung, aber auch von der Lagerung und Handhabung im Labor. Die diesbezüglichen Herstellerempfehlungen wurden stets exakt eingehalten. So wurde die Kühlkette beim Versand der Antikörper nicht unterbrochen, die Antikörper stets nach empfohlener Lagertemperatur gekühlt und ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren unterlassen.

5.1.2. Beurteilung der qualitativen Färbeergebnisse

Die Färbungen wurden mit größter Sorgfalt und mit genauester Orientierung am Färbeprotokoll durchgeführt. Da die Färbungen aufgrund von Mangel an Kapazitäten nicht in einem Durchgang, sondern nacheinander durchgeführt wurden, muss an Schwankungen oder Fehler in der Durchführung des Färbeprotokolls gedacht werden. So spielen Einflussfaktoren wie unterschiedliche Raumtemperatur, schwankende Qualität der Waschlösung oder abnehmende Enzymaktivität der gewebeigenen Peroxidase eine entscheidende Rolle.

Auch wurden die Antikörperfärbungen nicht an ein und demselben Schnitt durchgeführt. Zwar wurde darauf geachtet, aufeinander folgende Schnitte zu verwenden, eine Färbung desselben Schnittes beider Antikörper, p-Erk und HLA-A, war jedoch nicht möglich.

Zur Beurteilung der Detektionsfähigkeit der verwendeten Antikörper wurde neben den Kolongewebeschnitten auch Lymphknoten- und Brustkrebsgewebe als Positivkontrolle und ein Kolongewebeschnitt ohne Primärantikörper als Negativkontrolle mitgefärbt. Erst im Vergleich dieser Kontrollschnitte wird die unterschiedliche Sensitivität der Antikörper deutlich. So ist es für den Erhalt eines validen immunhistochemischen Färbeergebnisses unumgänglich, in jedem Färbedurchgang Positiv- und Negativkontrollen zur ständigen Qualitätskontrolle mit durchzuführen.

5.1.3. Beurteilung der quantitativen Auswertung

Trotz aller Bemühungen um Objektivität unterliegt die Auswertung immunhistochemischer Färbungen subjektiven Einflüssen und ist deshalb insgesamt als semiquantitativ zu bezeichnen. So können sich die Ergebnisse zu denen anderer Arbeiten unterscheiden.

Bei der Auswertung wurden nur Areale berücksichtigt, die mit Rücksprache eines erfahrenen Pathologen als geeignet befundet wurden. Es gilt dennoch zu beachten, dass die Resultate von der Erfahrung des Untersuchers abhängig sind.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse existieren außerdem unterschiedliche Bewertungsskalen. Der Immunreaktive Score (IRS) ist eine weltweit angewandte Bewertungsskala, sodass eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu anderen Arbeiten angestrebt wird.

Des Weiteren bleibt zu beachten, dass sämtliche Patienten nur an einem Zentrum rekrutiert wurden und die Ergebnisse daher möglicherweise auf die Population im Einzugsgebiet dieses Zentrums zu beschränken sind. Zudem wurden keine Ernährungsgewohnheiten oder Lebensstil-Veränderungen erfasst. Der Einfluss dieser Faktoren, die in Zusammenhang mit der Karzinogenese des Kolonkarzinoms stehen können, wurde nicht weiter untersucht. Eine weitere Einschränkung ergibt sich durch den retrospektiven Ansatz der Studie, deren Aussagekraft im Vergleich zu prospektiven Studien geringer ausfällt.

5.1.4. Beurteilung der statistischen Auswertung

Es gilt zu berücksichtigen, dass fehlende Signifikanzen prinzipiell darauf beruhen, dass tatsächlich keine signifikanten Unterschiede vorhanden sind oder aber, dass die Fallzahl zum Nachweis vorhandener Signifikanzen zu gering ist. Daher sollte der Nachweis bzw. das Fehlen von Signifikanzen generell vorsichtig interpretiert werden.

5.2. Beurteilung der Ergebnisse

Wichtiger Kritikpunkt dieser Arbeit ist, dass von den Patienten keine Überlebensdaten erhoben werden konnten. Vor allem, um Auswirkungen vermehrter bzw. vermindert HLA-A- und p-Erk-Expression auf das Tumorgeschehen abschätzen zu können, wären Überlebensdaten und Informationen bezüglich des Therapieansprechens von großer Relevanz. Es ist daher nicht möglich, Prognosen zu stellen oder 5- Jahres- Mortalitätsraten zu erfassen. Da jüngste Patienten, die mit in die untersuchte Datenbank aufgenommen wurden, vor nur wenigen Wochen operiert wurden und generell keine Krebsdiagnose im Patientenpool älter als 6 Jahre alt war, war eine Erfassung der Lebenszeiten nicht möglich. Vor allem zukünftige Anschlussarbeiten, in denen etwaige Therapiemöglichkeiten diskutiert werden könnten, sollten dies beachten.

5.3 Ausblick

Das mittlere Alter bei der Diagnosefeststellung eines kolorektalen Karzinoms ist in den letzten Jahren angestiegen, was vor allem darauf zurückzuführen ist, dass der Anteil älterer Menschen in unserer Gesellschaft stetig wächst. Eine Ausnahme davon sind die familiären Formen des Kolonkarzinoms, welche ein früheres Manifestationsalter aufweisen.

Im Jahr 2014 hat das deutsche Krebsregister ein Geschlechterverhältnis von 54% Männern und 46% Frauen festgestellt.

Auch Übergewicht ist bei einer großen Zahl epidemiologischer Studien mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Kolonkarzinomen assoziiert. Die deutsche Adipositasgesellschaft stuft Patienten mit einem BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$ bereits als übergewichtig ein. Vor allem die fehlende

körperliche Aktivität bei zunehmendem Körpergewicht ist dabei von großer Bedeutung. In einer Studie wurde gezeigt, dass Übergewichtige, die regelmäßig Sport treiben, gegenüber nicht Sportlichen, kein deutlich erhöhtes Risiko für ein kolorektales Karzinom aufwiesen (I.-M. Lee 2003).

Dabei ist allerdings unklar, ob bei bereits aufgetretenem Übergewicht eine Gewichtsreduktion einen krebspräventiven Effekt hat (Vainio, Kaaks, und Bianchini 2002).

Kolonkarzinome finden sich an unterschiedlichen Lokalisationen des Dickdarms ungleichmäßiger Verteilung. Der Grund für die ungleiche Verteilung der Karzinome in den einzelnen Darmabschnitten ist bislang unklar. Diskutiert wird, ob etwa eine unterschiedliche Verweildauer des Darminhalts und eine damit verbundene längere Einwirkzeit der im Stuhl enthaltenen Karzinogene, ursächlich für die ungleiche Verteilung ist. Solche kanzerogenen Stoffe könnten in etwa Gallensäuren oder bakteriellen Stoffwechselprodukten sein (G. H. Lee u. a. 2015).

Aus Studien zur Analyse molekulargenetischer Eigenschaften linksseitiger und rechtsseitiger KRAS-Wildtyp-Tumoren nach einer EGFR-Antikörpertherapie ist bekannt, dass die rechtsseitigen Tumoren rund sechsmal häufiger Mikrosatelliteninstabilitäten, dreimal häufiger eine BRAF-Mutation und etwa doppelt so häufig eine Hypermethylierung aufwiesen (Schrag D et al. 2016).

Laut aktuellem Stand der S3-Leitlinie wird der Tumorlokalisierung bei der Therapieentscheidung nur bei der Behandlung von KRAS-Wildtyp-Tumoren eine Bedeutung zugesprochen. Als Trennlinie zwischen rechts- und linksseitigen Tumoren definieren die Leitlinien dabei die Flexura colica sinistra. Demnach wird auf dem Boden der gegenwärtigen Datenlage bei rechtsseitigen Primärtumoren, in der Erstlinientherapie der metastasierten Erkrankung, eine Chemotherapie-Doublette plus Bevacizumab und bei linksseitigen Primärtumoren eine Chemotherapie-Doublette plus anti-EGFR-Antikörper empfohlen (Deutsche Krebshilfe, AWMF 2019). Ansonsten wird in der Therapieentscheidung die Lokalisation des Primärtumors noch nicht berücksichtigt.

Möglicherweise ändert sich dies in Zukunft, wenn die molekularen Unterschiede zwischen rechts- und linksseitig lokalisierten Tumoren weiter aufgedeckt werden.

Weitere Wirkstoffe zielgerichteter Therapieverfahren sind derzeit Gegenstand klinischer Studien.

Um einen direkten Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die HLA-A-Expriemierung nachzuweisen, ergibt sich für Anschlussprojekte die Überlegung bereits mit EGFR-Antikörpern vorbehandelte Patienten, in eine Studie mit einzuschließen. Bei mit EGFR-Antikörpern

vorbehandelten Patienten kann der MAPK-Signalweg gezielt ausgeschaltet werden. Hierbei wäre es interessant zu ermitteln, inwieweit sich die HLA-A-Expressierung von zuvor nicht behandelten Patienten unterscheidet. Nimmt der MAPK-Signalweg, wie vermutet, Einfluss auf die HLA-A-Expressierung, so erwartet man hier eine Heraufregulierung dieser und damit verbunden eine bessere Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem. Für die Zukunft ist es nicht nur von Interesse, einen Zusammenhang der beiden Signalwege nachzuweisen, sondern auch, konkret zu erforschen, welcher Teilschritt des MAPK- Signalwegs Einfluss auf die HLA-A-Expressierung hat. So könnten die Ergebnisse vor allem im Hinblick auf die Therapie des Kolonkarzinoms hilfreich sein.

Trotz der hier in der Studie erlangten Ergebnisse, verbleibt ein großer Anteil der Regulation der HLA- A- Expressierung von Kolontumorzellen ungeklärt. Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Mechanismen und die Regulierung der HLA- A- Oberflächenmoleküle zu verstehen und vor allem, um den Einfluss des MAPK- Signalwegs auf die HLA- A- Expression zu klären.

5.4. Niereninsuffizienz als Risikofaktor für das Kolorektale Karzinom anhand aktueller Studienlage

Studien haben gezeigt, dass chronische Nierenerkrankungen ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms darstellen. Dies wird einerseits damit begründet, dass eine kranke Niere den Körper nicht mehr ausreichend von anfallenden Toxinen befreien kann und andererseits, dass die immunsuppressive Therapie nierenkranker Patienten die Karzinogenese begünstigt (Velcirov u. a. 2013). Ferner werden Zusammenhänge zwischen dem MAPK- Signalweg und akuten und chronischen Nierenerkrankungen diskutiert (Tian u. a. 2017).

Es ist bekannt, dass der MAPK-Signalweg an der Entstehung und dem Fortschreiten von Nierenfibrose beteiligt und vermehrt aktiviert ist (J. Lee u. a. 2019). Es lassen sich klare Zusammenhänge von Niereninsuffizienz und der Aktivierung des MAPK-Signalwegs beobachten. Bisher wurde jedoch noch keine direkte Verbindung zwischen vermehrter Aktivierung des MAPK-Signalwegs bei Nierenkranken und der daraus resultierend verminderten HLA-A-Expressierung von Tumorzellen festgestellt.

Die immunhistochemischen Färbungen haben den Verdacht, dass es einen Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und der HLA-A-Expressierung gibt, entsprechend der aktuellen Studienlage erhärtet. Von 46 Patienten ohne Niereninsuffizienz, zeigten 39 Patienten (84,8%) negative p-Erk-Anfärbungen. Von den 8 Patienten mit Niereninsuffizienz zeigten 2 Patienten negative p-Erk-Anfärbungen (25%). Bezieht man dies auf den MAPK-Signalweg und die Hypothese, dass dieser invers mit der HLA-A-Expressierung korreliert, so unterstreicht dies, dass eine verminderte Aktivierung des MAPK-Signalwegs, eine vermehrte HLA-A-Expressierung mit sich ziehen könnte. Eine vermehrte HLA-A-Expressierung wiederum kann es dem Immunsystem leichter machen, die Tumorzellen als solche zu identifizieren und diese zu bekämpfen. Im Umkehrschluss kann man dies so deuten, dass Patienten mit Niereninsuffizienz wahrscheinlich häufiger am kolorektalen Karzinom erkranken, da diese vermehrt den MAPK-Signalweg aktivieren, daher Tumorzellen weniger HLA-A exprimieren und somit dem Immunsystem entkommen können.

Abschließend ist es nicht klar, ob die vermehrte Aktivierung des MAPK-Signalwegs bei Niereninsuffizienten aktiv die HLA-Expression von Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms herunterreguliert oder dies nur eine zufällige Beobachtung ist.

5.5. Einfluss einer positiven Familienanamnese auf die HLA-A-Expressierung von Tumorzellen des Darmkrebses

Die Vererbung der HLA-Gene folgt den klassischen Mendel- Regeln. Der Mensch besitzt einen diploiden Chromosomensatz, der für die Fortpflanzung in zwei haploide Chromosomensätze

getrennt wird. Gleiches gilt für den kurzen Arm von Chromosom 6, auf dem die Gene liegen, welche für HLA codieren. Jedes Individuum erhält somit von seinen Eltern eine haploide HLA-Genortkette, die als HLA-Haplotyp bezeichnet wird (Waßmuth 2005).

HLA-Gene werden als Einheit vererbt. Rekombinationen sind mit unter 3% selten. Der HLA-Genpool unterscheidet sich in verschiedenen Populationen und Gebieten aufgrund von Mutationen, Selektionen und Gendrifts. Daher gibt es eine bevölkerungsspezifische Häufigkeit HLA-assoziierter Erkrankungen (Madania u. a. 2014).

Geht man davon aus, dass die HLA-A-Exprimierung eine wesentliche Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung der Tumorzellen durch das Immunsystem spielt und, dass die HLA-A-Gene von beiden Elternteilen auf ihre Nachkommen weitergegeben werden, so lässt sich die Vermutung aufstellen, dass eine positive Familienanamnese in Bezug auf Krebsgeschehen die Entstehung kolorektaler Karzinome wahrscheinlich begünstigt. Wiesen die Eltern eines Patienten bereits eine verminderte HLA-Exprimierung und somit eine schlechtere Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem auf, so wurde diese Eigenschaft mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an den Patienten weitergegeben.

Daher ist zu erwarten, dass eine positive Familienanamnese in unserem Patientenkollektiv einen signifikanten Einfluss auf die Karzinogenese kolorektaler Karzinome hat.

5.6. Korrelation zwischen dem MAPK- Signalweg und der HLA- Exprimierung

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass das Herunterregulieren der Expression einzelner oder mehrerer Komponenten des MHC-Klasse-I-Antigen-Prozessierungswegs die Erkennung von Tumorzellen durch tumorspezifische CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten verhindert. Doch welche Mechanismen sind für diese Herunterregulierung verantwortlich? In ösophagealen Tumoren konnte nachgewiesen werden, dass unter anderem eine Hypermethylierung der Promotorregionen der HLA-A-, B- und C-Gene einen Hauptmechanismus der Transkriptionsinaktivierung darstellt (Nie 2001).

Stellt man die immunhistochemischen Färbungen von HLA-Klasse-I-Molekülen und p-Erk (siehe Tabelle 9) gegenüber, lässt sich eine inverse Korrelation beobachten. Eine stark positive p-Erk-Anfärbung spricht für eine starke Aktivität des MAPK-Signalwegs. Die meisten Patientengewebe, die stark positive p-Erk-Färbungen zeigten, hatten vor allem negative HLA-Klasse-I-Anfärbungen. Umgekehrt zeigten Patienten mit stark positiver HLA-Klasse-I-Anfärbung häufig negative p-Erk-Anfärbungen.

75,9% der p-Erk-Anfärbungen wurden als negativ bewertet, während 40,7% der HLA-Anfärbungen stark positiv und 37% mäßig positiv eingestuft wurden. Dies lässt einen

Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und der HLA-Klasse-I-Exprimierung vermuten.

Interessanterweise zeigt die aktuelle Studienlage Gleiches für Magen- und Ösophaguskarzinome. Um diese Hypothese zu unterstreichen, haben Wissenschaftler dafür den MAPK- Signalweg in Ösophaguskarzinom- Zellen mit dem p-Erk-Inhibitor PD98059 blockiert, woraus eine Hochregulierung der HLA-A-Exprimierung resultierte (Mimura u. a. 2013).

Um die Beteiligung des MAPK-Signalwegs an der Regulation der HLA-A-Expression weiter zu demonstrieren, wurden in einem zweiten Versuch Ösophaguskarzinom- Zellen mit Erk1/2-siRNA und dem p-Erk-Inhibitor PD98059 behandelt, um die Erk1/2-Expression zu unterdrücken. Wie zu erwarten, war die HLA-A-Exprimierung und auch die Reaktivität der zytotoxischen T-Zellen in mit Erk1/2-siRNA und PD98059 transfizierten Zellen höher, im Vergleich zu denen in Kontroll-siRNA (Mimura u. a. 2013). Dies bestätigt weiterhin die Hypothese, dass die Hochregulierung von HLA-A durch die Hemmung von p-Erk1/2 induziert wird und die Menge an p-Erk1/2 umgekehrt mit der Menge an HLA-A-Molekülen korreliert.

Die Blockierung des MAPK-Signalweges mit einem p-Erk-Inhibitor geht also mit einer vermehrten HLA-A-Exprimierung und folglich einer stärkeren Aktivierung des Immunsystems einher.

Eine neueste Studie aus dem Jahr 2019 untersuchte die gleiche Fragestellung. In der Studie wurden Darmorganoide kolorektal-karzinom-erkrankter Patienten verwendet, welche in zwei Gruppen aufgeteilt wurden: Gruppe A wurde mit MEK-Inhibitoren behandelt, Gruppe B nicht. MEK-Inhibitoren hemmen ebenfalls einen Teilschritt des MAPK-Signalwegs. Im Anschluss wurden beide Gruppen mittels Massenspektrometrie, eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung geladener Teilchen, auf HLA-Peptidliganden der Klassen I und II untersucht. Allerdings zeigte sich hier kein signifikanter Einfluss der MEK-Inhibitoren auf die HLA-Klasse-I- oder II-Expression (Newey u. a. 2019).

Weitere Recherchen haben ähnliche Ergebnisse geliefert, sodass man rückschließen kann, dass die aktuelle Studienlage nicht eindeutig, sondern vielmehr widersprüchlich ist. Dabei ist hinzuzufügen, dass die beiden beschriebenen Studien unterschiedliche Methoden zur Klärung der Fragestellung verwendeten und ein Vergleich daher schwer anzustellen ist. Dennoch widersprechen sich die Ergebnisse.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels immunhistochemischem Nachweisverfahren den Zusammenhang zwischen der HLA-A-Exprimierung von Kolontumorzellen und dem MAPK-Signalweg zu ermitteln.

Es zeigte sich für 47 von 54 Patienten (87%) eine positive HLA-A-Exprimierung bei Kolonkarzinomen, während nur 13 von 54 Patienten (24,1%) eine positive p-Erk-Exprimierung zeigten. Bei 22 Patienten zeigten sich stark positive HLA-A-Färbeergebnisse (40,7%), wohingegen sich nur bei 3 Patienten stark positive p-Erk-Färbeergebnisse nachweisen ließen (5,6%). Auf der anderen Seite zeigten 41 Patienten negative p-Erk-Färbeergebnisse (75,9%) und nur 7 Patienten negative HLA-A-Färbeergebnisse (13%).

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Kohorte, bestehend aus 54 an der Universität Halle in Sachsen-Anhalt behandelten Patienten, erstellt.

Im Anschluss konnten die molekularen Marker HLA-A und p-Erk in Kolonkarzinomgewebeschnitten immunhistochemisch mit Hilfe der LSAB-Methode angefärbt werden. Pro Patienten wurden die folgenden Färbungen des Tumorgewebes durchgeführt: Je eine HLA-A-Antikörper- Färbung, p-Erk-Antikörper- Färbung und Hämatoxylin- Färbung, sowie je eine Negativkontrolle. Abschließend wurden für die beiden Antikörper Anti-HLA-A und Anti-p-Erk zusätzlich je eine Positivkontrolle durchgeführt, sodass in der Summe, abzüglich aller vorangegangenen Versuche zur Etablierung der Färbemethode, 218 Schnitte gefärbt wurden.

Mit den Ergebnissen dieser Studie konnte der bereits vermutete Zusammenhang zwischen der HLA-A-Exprimierung und dem MAPK-Signalweg bestärkt, nicht jedoch bewiesen werden.

Diese Studie zeigt eine Tendenz dazu, dass der MAPK-Signalweg invers mit der HLA- A-Exprimierung korreliert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die klinischen und pathologischen Parameter bezüglich der p-Erk und HLA-Klasse-I-Exprimierung untersucht. Dabei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Die p-Erk-Exprimierung hat sich lediglich bei Patienten mit Niereninsuffizienz gegenüber Patienten ohne Niereninsuffizienz unterschieden. Die HLA-A- Exprimierung zeigte sowohl bei Patienten mit unterschiedlichem Tumor-Grading, als auch bei Patienten mit positiver Familienanamnese signifikante Unterschiede in Bezug auf die Entstehung kolorektaler Karzinome. Für die Faktoren Alter, Geschlecht, BMI, Nikotinabusus, Alkoholabusus, Diabetes mellitus II, art. Hypertonie, COPD, KHK, Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie, UICC-Stadium, Zweitumor und Metastasierung konnte kein signifikanter Zusammenhang für die p-Erk-/ oder HLA- A-Exprimierung nachgewiesen werden.

7. Literaturverzeichnis

Aaltonen, Lauri A., Stanley R. Hamilton, World Health Organization, und International Agency for Research on Cancer, Hrsg. 2000. *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. World Health Organization classification of tumours. Lyon : Oxford: IARC Press ; Oxford University Press (distributor),).

Ackermann, Hanns, Hrsg. 2014. *AllEx - Alles fürs Examen*. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. AllEx - Alles fürs Examen, das Kompendium für die 2. ÄP / [Hanns Ackermann ...]; Bd. B. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Aumüller, Gerhard, Hrsg. 2007. *Anatomie: 208 Tabellen ; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]*. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme.

Benedix, Frank, Rainer Kube, Frank Meyer, Uwe Schmidt, Ingo Gasting, Hans Lippert, und Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. 2010. „Comparison of 17,641 Patients with Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and Survival“. *Diseases of the Colon and Rectum* 53 (1): 57–64. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4>.

Bertz, Joachim, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, und Robert-Koch-Institut, Hrsg. 2006. *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 5., überarb., aktualisierte Ausg. Saarbrücken: Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland.

Bishop, J.Michael. 1991. „Molecular Themes in Oncogenesis“. *Cell* 64 (2): 235–48. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90636-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90636-D).

Burchardt, M., R. Engers, M. Müller, T. Burchardt, R. Willers, J. I. Epstein, R. Ackermann, H. E. Gabbert, A. de la Taille, und M. A. Rubin. 2008. „Interobserver Reproducibility of Gleason Grading: Evaluation Using Prostate Cancer Tissue Microarrays“. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 134 (10): 1071–78. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0388-0>.

Cai, Zhaoyang, Lu Wang, Yali Han, Wenwen Gao, Xiaojuan Wei, Rumei Gong, Mingliang Zhu, Yuping Sun, und Shuwen Yu. 2019. „Immunoglobulin-like transcript 4 and human leukocyte antigen-G interaction promotes the progression of human colorectal cancer“. *International Journal of Oncology*, März. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4761>.

Chang, Chien-Chung, Michael Campoli, und Soldano Ferrone. 2003. „HLA Class I Defects in Malignant Lesions: What Have We Learned?“. *The Keio Journal of Medicine* 52 (4): 220–29. <https://doi.org/10.2302/kjm.52.220>.

Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, u. a. 2002. „Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer“. *Nature* 417 (6892): 949–54. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.

Deutsche Krebshilfe, AWMF. 2019. „Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/>.

Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI), im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG), unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG). o. J. „ICD-10-GM Version 2019, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision“. Zugegriffen 19. September 2019. <http://www.icd-code.de/icd/code/C18.-.html>.

Dietmaier, W., S. Wallinger, T. Bocker, F. Kullmann, R. Fishel, und J. Rüschoff. 1997. „Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation with Mismatch Repair Protein Expression“. *Cancer Research* 57 (21): 4749–56.

Garrido, Federico, und Natalia Aptsiauri. 2019. „Cancer Immune Escape: MHC Expression in Primary Tumours versus Metastases“. *Immunology*, September, imm.13114. <https://doi.org/10.1111/imm.13114>.

Hiddemann, W, und C. R Bartram. 2010. *Die Onkologie. T. 1, T. 1.*. Heidelberg: Springer Medizin. <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=510822>.

Hiddemann, Wolfgang, Heinz Huber, und Claus R Bartram. 2004. *Die Onkologie: Teil 1: Allgemeiner Teil - Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. Teil 2: Spezieller Teil - Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien.* <http://link.springer.com/openurl?genre=book&isbn=978-3-662-06671-3>.

Hoshino, R., Y. Chatani, T. Yamori, T. Tsuruo, H. Oka, O. Yoshida, Y. Shimada, u. a. 1999. „Constitutive Activation of the 41-/43-KDa Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Human Tumors“. *Oncogene* 18 (3): 813–22. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202367>.

Jung, Myung-Kyu, Ui Sup Shin, Young-Jun Ki, Yong-Bae Kim, Sun-Mi Moon, und Se-Jin Sung. 2017. „Is the Location of the Tumor Another Prognostic Factor for Patients With Colon Cancer?“ *Annals of Coloproctology* 33 (6): 210–18. <https://doi.org/10.3393/ac.2017.33.6.210>.

Lee, G.H., G. Malietzis, A. Askari, D. Bernardo, H.O. Al-Hassi, und S.K. Clark. 2015. „Is Right-Sided Colon Cancer Different to Left-Sided Colorectal Cancer? – A Systematic Review“. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 41 (3): 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.11.001>.

Lee, I-Min. 2003. „Physical Activity and Cancer Prevention???Data from Epidemiologic Studies“. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 35 (11): 1823–27. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000093620.27893.23>.

Lee, Jeonghwan, Jung Nam An, Jin Ho Hwang, Hajeong Lee, Jung Pyo Lee, und Sung Gyun Kim. 2019. „P38 MAPK Activity Is Associated with the Histological Degree of Interstitial Fibrosis in IgA Nephropathy Patients“. Herausgegeben von Jean-Claude Dussaule. *PLOS ONE* 14 (3): e0213981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213981>.

Lu, Nathan, und Charles J. Malemud. 2019. „Extracellular Signal-Regulated Kinase: A Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression“. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153792>.

Madania, A., I. Ghoury, W. Al-Ashkar, S. Nweder, und H. Zarzour. 2014. „Frequency of HLA-A Alleles in the Syrian Population Genotyped by Sequence-Based Typing“. *International Journal of Immunogenetics* 41 (5): 378–83. <https://doi.org/10.1111/iji.12140>.

McCubrey, James A., Linda S. Steelman, Steven L. Abrams, John T. Lee, Fumin Chang, Fred E. Bertrand, Patrick M. Navolanic, u. a. 2006. „Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Pathways in Malignant Transformation and Drug Resistance“. *Advances in Enzyme Regulation* 46: 249–79. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.004>.

Meloche, S., und J. Pouyssegur. 2007. „The ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway as a Master Regulator of the G1- to S-Phase Transition“. *Oncogene* 26 (22): 3227–39. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>.

Mercer, Kathryn, Antonio Chiloehes, Martin Hüser, Michelle Kiernan, Richard Marais, und Catrin Pritchard. 2002. „ERK Signalling and Oncogene Transformation Are Not Impaired in Cells Lacking A-Raf“. *Oncogene* 21 (3): 347–55. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205101>.

Mimura, Kousaku, Kensuke Shiraishi, Anja Mueller, Shinichiro Izawa, Ley-Fang Kua, Jimmy So, Wei-Peng Yong, u. a. 2013. „The MAPK Pathway Is a Predominant Regulator of HLA-A Expression in Esophageal and Gastric Cancer“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (12): 6261–72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301597>.

Morrison, D. K. 2012. „MAP Kinase Pathways“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (11): a011254–a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>.

Murphy, Kenneth M., Casey Weaver, und Charles Janeway. 2018. *Janeway Immunologie*. Übersetzt von Lothar Seidler. 9. Auflage. Springer Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum.

Newey, Alice, Beatrice Griffiths, Justine Michaux, Hui Song Pak, Brian J. Stevenson, Andrew Woolston, Maria Semiannikova, u. a. 2019. „Immunoepitomics of Colorectal

Cancer Organoids Reveals a Sparse HLA Class I Neoantigen Landscape and No Increase in Neoantigens with Interferon or MEK-Inhibitor Treatment“. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7 (1): 309. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0769-8>.

Nie, Y. 2001. „DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas“. *Carcinogenesis* 22 (10): 1615–23. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.10.1615>.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb. 2001. „Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions“. *Endocrine Reviews* 22 (2): 153–83. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>.

Popat, S., R. Hubner, and R. S. Houlston. 2005. „Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (3): 609–18. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.086>.

Robert Koch-Institut. 2016. „Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“. <https://doi.org/10.17886/rkipubl-2016-014>.

Schrag D et al. 2016. „The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 34, (suppl; abstr 3505)“. <https://meetinglibrary.asco.org/record/123724/abstract>.

Shaul, Yoav D., and Rony Seger. 2007. „The MEK/ERK Cascade: From Signaling Specificity to Diverse Functions“. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773 (8): 1213–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>.

Sherr, C. J. 1996. „Cancer Cell Cycles“. *Science* 274 (5293): 1672–77. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>.

Steinke, Verena, Christoph Engel, Reinhard Büttner, Hans Konrad Schackert, Wolff H. Schmiegel, und Peter Propping. 2013. „Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome“. *Deutsches Arzteblatt International* 110 (3): 32–38. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0032>.

the GEKID Cancer Survival Working Group, O Majek, A Gondos, L Jansen, K Emrich, B Holleczeck, A Katalinic, A Nennecke, A Eberle, und H Brenner. 2012. „Survival from Colorectal Cancer in Germany in the Early 21st Century“. *British Journal of Cancer* 106 (11): 1875–80. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.189>.

Tian, Lei, Xinghua Shao, Yuanyuan Xie, Qin Wang, Xiajing Che, Minfang Zhang, Weijia Xu, Yao Xu, Shan Mou, und Zhaohui Ni. 2017. „Kidney Injury Molecule-1 Is Elevated in Nephropathy and Mediates Macrophage Activation via the Mapk Signalling Pathway“. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41 (2): 769–83.

<https://doi.org/10.1159/000458737>.

Vainio, Harri, Rudolf Kaaks, und Franca Bianchini. 2002. „Weight Control and Physical Activity in Cancer Prevention: International Evaluation of the Evidence“. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* 11 Suppl 2 (August): S94-100.

Velciov, Silvia, B. Hoinoiu, Teodora Hoinoiu, Alina Popescu, Cristina Gluhovschi, Oana Grădinaru, Mădalină Popescu, u. a. 2013. „Aspects of Renal Function in Patients with Colorectal Cancer in a Gastroenterology Clinic of a County Hospital in Western Romania“. *Romanian Journal of Internal Medicine = Revue Roumaine De Medecine Interne* 51 (3–4): 164–71.

Waßmuth, Ralf. 2005. *Einführung in das HLA-System*. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Landsberg/Lech: ecomed Medizin.

Weiss, Jennifer M., Patrick R. Pfau, Erin S. O’Connor, Jonathan King, Noelle LoConte, Gregory Kennedy, und Maureen A. Smith. 2011. „Mortality by Stage for Right- versus Left-Sided Colon Cancer: Analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results--Medicare Data“. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (33): 4401–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4414>.

Williams, C S, W Smalley, und R N DuBois. 1997. „Aspirin Use and Potential Mechanisms for Colorectal Cancer Prevention.“ *Journal of Clinical Investigation* 100 (6): 1325–29. <https://doi.org/10.1172/JCI119651>.

Wittekind, C., und B. Oberschmid. 2010. „TNM-Klassifikation maligner Tumoren 2010: Allgemeine Aspekte und Änderungen im allgemeinen Teil“. *Der Pathologe* 31 (5): 333–38. <https://doi.org/10.1007/s00292-010-1301-6>.

8. Thesen

1. Das Kolorektale Karzinom ist eine bösartige Neoplasie. Sie ist die zweithäufigste maligne Erkrankung bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen. Über 90% aller Kolonkarzinome lassen sich histologisch in Adenokarzinome einteilen.
2. Das Kolon kann histologisch in einen rechten und einen linken Teil unterteilt werden, da diese einen unterschiedlichen embryologischen Ursprung aufweisen. Therapieansätze unterscheiden sich in der Lokalisation des Tumors. In der Therapie stehen die chirurgische Resektion, die Radiotherapie und die Chemotherapie zur Option.
3. Die molekularpathologische Charakterisierung des Tumors dient der prognostischen Einschätzung, sowie der Gewinnung prädiktiver Informationen hinsichtlich der Therapieauswahl. Molekularpathologische Untersuchungen umfassen essentiell eine Analyse des Mutationszustands der RAS-Gene KRAS und NRAS, des BRAF-Gens, sowie des Status der Mikrosatelliteninstabilität.
4. Aktuelle Studien erforschen weitere Mechanismen mit denen kolorektale Tumorzellen das Immunsystem umgehen können. Ziel ist es in Zukunft noch effektiver therapeutisch Tumorzellen bekämpfen zu können.
5. Es ist bekannt, dass MHC-Antigene einen starken Einfluss auf die Immunerkennung und die Immunreaktion gegenüber Tumorzellen haben. Beim Oesophagus- und Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass der der MAPK-Signalweg einen Einfluss auf die Expressierung von MHC-Klasse-I-Molekülen von Tumorzellen hat. Dies wurde übertragend in dieser Studie am Kolorektalen Karzinom untersucht.
6. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbung kann die Expression von MHC-Antigenen und p-Erk sichtbar gemacht und mittels des Immunreaktiven Scores beurteilt werden.
7. Diese Studie zeigt eine Tendenz dazu, dass der MAPK-Signalweg invers mit der HLA- A- Expressierung im Tumorgewebe des Kolorektalen Karzinoms korreliert.
8. In der statistischen Auswertung mittels Kreuztabellen und Chi-Quadrat-Test konnten Patientendaten wie Risikofaktoren untersucht werden. Zusammenhänge der Risikofaktoren mit der Expression von MHC-Antigenen und p-Erk konnten mittels Berechnung von p-Werten und damit Signifikanzen beurteilt werden.
9. Für die Faktoren Alter, Geschlecht, BMI, Nikotinabusus, Alkoholabusus, Diabetes mellitus II, arterielle Hypertonie, COPD, KHK, Z.n. Cholezystitis oder Cholezystektomie, UICC-Stadium, Zweitumor und Metastasierung zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang für die p-Erk-/ oder HLA-A- Expressierung.

10. Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich bei der HLA-A- Exprimierung sowohl für das Grading der Tumorstadien als auch bei einer positiven Familienanamnese. Für die p-Erk- Exprimierung zeigte sich nur bei dem Parameter Niereninsuffizienz eine signifikante Korrelation.

Erklärungen

- (1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

- (2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

- (3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 22.09.2021

Jacqueline Geist

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf vielfältige Weise unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Christoph Michalski für die Unterstützung und Ermöglichung der Promotion.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors der Viszeralchirurgie Halle, insbesondere bei Nadine von Auw, für die hervorragende Betreuung bedanken.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank Frau Jun.-Prof. Dr. med. univ. Monika Hämmerle und der Direktorin des Instituts für Pathologie in Halle, Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser, für ihre Kooperation und Bereitstellung von Patienten-Proben der Kolorektalen Karzinome.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Johannes Klose für sein außerordentliches Engagement und seiner durchweg konstruktiven Kritik bei der Ausarbeitung meiner Doktorarbeit bedanken.

Meiner Kommilitonin Viktoria Böker möchte ich bei dieser Gelegenheit danken, die mir im Rahmen meines Studiums zur Seite stand und meine Arbeit durch ihre Bemühungen und Gedanken beeinflusst hat.

Größter Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Familie für ihre Geduld, Ermutigungen und durchgängige Unterstützung sowohl während meines ganzen Studiums aber auch insbesondere während der Arbeit an dieser Dissertation.