

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

Immunhistochemische Analyse der Antikörper PAT-SM6 und PAT-LM1

auf Kolonkarzinomen und deren Metastasen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Yingjun Zhi

aus Shanghai

Würzburg, Mai 2016

Referent : Prof. Dr. Andreas Rosenwald
Korreferent: Prof. Dr. Ralf Bargou
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2017

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren und Vorsorgeuntersuchung.....	1
1.1.3 Diagnostik und Metastasierung.....	3
1.1.4 Konventionelle Therapie.....	5
1.2 Die Antikörpertherapie.....	6
1.2.1 Antikörper gegen den „Epidermal Growth Factor“- Rezeptor.....	7
1.2.2 Antikörpertherapie zur Behandlung des Mammakarzinoms.....	8
1.2.3 Antikörpertherapie zur Behandlung des Kolonkarzinoms.....	8
1.3 Die natürlichen Antikörper.....	9
1.3.1 Der Antikörper PAT-SM6.....	10
1.3.2 Der Antikörper PAT-LM1.....	11
1.4 Ziel der Arbeit.....	12
II. Material und Methoden	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	13
2.1.2 Geräte.....	14
2.1.3 Puffer und sonstige Lösungen für die Immunhistochemie.....	14
2.1.4 Patientendaten.....	15
2.1.5 Einschlusskriterien.....	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten aus Paraffinblöcken.....	16
2.2.2 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten.....	16
2.2.3 Einteilung der immunhistochemischen Färbegergebnisse in ein „Score“- System.....	19
2.2.3.1 Einteilung der Anzahl angefärbter Tumorzellen durch PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörper.....	19
2.2.3.2 Einteilung der Färbeintensität von PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern.....	19

III. Ergebnisse.....	21
3.1 Patientenkollektiv.....	21
3.1.1 Patienteneinteilung nach Geschlecht und Lebensalter.....	21
3.1.2 Einteilung der Metastasen.....	22
3.2 Immunhistochemische Untersuchungen mit PAT-SM6 Antikörper	23
3.3 Immunhistochemische Untersuchungen mit PAT-LM1 Antikörper	26
3.4 Darstellung immunhistochemischer Färbungen mit PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern.....	29
3.5 Vergleich von PAT-SM6- und PAT-LM1-Antikörpern anhand der Tumorzellfärbung.....	31
3.5.1 Analyse der Anzahl gefärbter Tumorzellen	31
3.5.2 Analyse der Färbeintensität der Tumorzellen.....	32
3.6 Analyse der Korrelation der immunhistochemischen Ergebnisse mit Patientendaten.....	33
3.6.1 Korrelation der Anzahl gefärbter Tumorzellen mit dem Überleben der Patienten.....	33
3.6.2 Vergleich der Färbeintensität mit dem Überleben der Patienten.....	34
3.6.3 Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.....	35
3.6.4 Vergleich des TNM-Stadiums mit den Ergebnissen der Antikörperfärbungen.....	36
IV. Diskussion.....	38
4.1 Übersicht	38
4.2 Das kolorektale Karzinom.....	39
4.3 Tiefeninvasion und Metastasierung des Kolonkarzinoms.....	39
4.4 Therapiemöglichkeiten von Kolonkarzinomen und deren Limitationen.....	41
4.5 PAT-LM1 Antikörper und NONO ^{PAT-LM1}	43
4.6 PAT-SM6 Antikörper und GRP78 ^{PAT-SM6}	44
4.7 PAT-LM1 als ein möglicher prognostischer Faktor für das Patientenüberleben.....	45
4.8 PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörper als Therapeutikum zur Behandlung von Dickdarmkarzinom.....	46

V. Zusammenfassung.....	50
VI. Literaturverzeichnis.....	52
VII. Anhang	58

Danksagung

Lebenslauf

I. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt mit über einer Million Betroffenen und ca. 600.000 Todesfällen pro Jahr eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen weltweit dar. Bei Männern steht das KRK nach Lungen- und Prostata-Karzinomen, bei Frauen nach Mamma- und Zervix-Karzinomen an dritter Stelle aller Krebserkrankungen. In Australien, Neuseeland und Westeuropa ist die Inzidenz von KRK im Vergleich zu anderen Ländern höher (Ferlay et al, 2010). Weltweit betrachtet sind Männer im Vergleich zu Frauen häufiger betroffen. In Deutschland stellt die maligne Neubildung des Dick- und Mastdarms sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Erkrankung und Todesursache dar, die durch Krebs verursacht wird. Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts ist die Prävalenz für das KRK in Deutschland prognostisch gesehen steigend (Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe, 2015).

1.1.2 Risikofaktoren und Vorsorgeuntersuchung

Für die Entstehung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen sind multiple Faktoren verantwortlich. Vor allem bei Männern ist der Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und KRK-Risiko stark ausgeprägt (Giovannucci et al, 1995). Einer der Gründe ist die durch die Fettleibigkeit verursachte Insulinresistenz, welche die Zellproliferation fördert und gleichzeitig die Apoptose verhindert (Stein et al, 2010). Aus diesem Grund werden regelmäßige körperliche Aktivität und eine Gewichtsreduktion ab einem BMI von 25 kg/m² empfohlen, um das Risiko für die Entwicklung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen zu reduzieren (Schmiegel et al, 2008). Darüber hinaus spielen die Ernährungsgewohnheiten eine wichtige Rolle. Dabei steigt das Risiko für kolorektale Adenome und Karzinome mit übermäßigem Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch. Das Erhitzen von Fleisch bei hoher Temperatur führt zur

Entstehung von heterozyklischen Aminen, die als kanzerogen gelten (Sinha et al, 1999). Des Weiteren sind Darmbakterien in der Lage, aus Aminen und Amiden N-Nitroso-Verbindungen zu bilden, die für ihre kanzerogene Wirkung verantwortlich gemacht werden (Bingham et al, 2002). Vor allem das Häm im Fleisch, welches nitrosyliert vorliegt, kann als Agens für weitere Nitrosierung dienen (Joosen et al, 2009). Ebenso können die im verarbeiteten Fleisch vorkommenden Konservierungsstoffe, wie Nitrate und Nitrite, sich im Beisein von Aminen in Nitrosamine verwandeln, so dass auch hier N-Nitroso-Verbindungen entstehen. Folglich kann eine ausgewogene und ballaststoffreiche Ernährung mit begrenztem Fleischkonsum die Entstehung von kolorektalen Karzinomen minimieren (Schmiegel et al, 2008). Ebenso ist der Verzicht auf Rauchen und ein Alkoholkonsum in Maßen empfehlenswert, denn sowohl Nikotin als auch Acetaldehyd, ein Abbauprodukt von Äthanol, können die Zellproliferation fördern und die DNA der Zellen schädigen (Dasgupta & Chellappan, 2006; Zhao et al, 2012) Neben den exogenen Risikofaktoren existieren eine Reihe genetischer (endogener) Risikofaktoren, die als Auslöser für kolorektale Karzinome berücksichtigt werden müssen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP). Die genetische Ursache der FAP basiert auf einer Mutation des APC-Gens, die zum Kettenabbruch des APC-Proteins führt. Die klinische Manifestation äußert sich durch Bildung multipler Polypen im Dickdarm (Goss & Groden, 2000). Das Lebensrisiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, ist bei Betroffenen ohne engmaschige Vorsorgeuntersuchung und adäquate Therapie nahezu 100 Prozent (Galiatsatos & Foulkes, 2006). Aus diesem Grund wird frühzeitig eine jährliche Darmspiegelung (Koloskopie) empfohlen. Eine Kontinenz erhaltende Proktokolektomie kann ab dem 18. Lebensjahr indiziert sein, wenn große bzw. multiple Polypen im Dickdarm zu finden sind. Das Gesamtrisiko für ein KRK bei FAP-Erkrankung sinkt durch die rechtzeitige Entdeckung und Therapie der Dickdarmveränderungen (Schmiegel et al, 2008; Zeichner et al, 2012). Ein weiterer endogener Risikofaktor für das KRK stellen die chronischen entzündlichen Darmerkrankungen in Form von Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn dar. Laut Eaden und Kollegen sind circa ein Prozent aller KRK-Fälle auf Colitis ulcerosa als Grundleiden zurückzuführen (Eaden et al, 2001). Im

Vergleich zur Allgemeinbevölkerung beträgt das Risiko für ein KRK bei Entzündung im gesamten Dickdarmabschnitt 14,8 Prozent. Wichtige Einflussfaktoren für die Entstehung von KRK sind Ausdehnung und Aktivität der Dickdarmentzündung (Ekblom et al, 1990). Ebenso wird Patienten mit chronischer Darmerkrankung wie bei den FAP-Patienten bereits in jungen Jahren eine Darmspiegelung empfohlen. Bei nachgewiesenen intraepithelialen Neoplasien soll eine Kontinenz erhaltende Proktokolektomie als Therapie stattfinden. Des Weiteren nimmt die Erkrankungsrate von KRK sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit steigendem Alter zu (Krebs in Deutschland 2011/2012, 10. Ausgabe, 2015). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Krebsfrüherkennung eine Stuhluntersuchung auf okkultes Blut (fecal occult blood test - FOBT) ab dem 50. Lebensjahr eingeführt (Schmiegel et al, 2008) und soll einmal jährlich wiederholt werden. Das Testergebnis gilt als positiv, wenn das mit Guaiak-Harz getränkte Testpapier nach Kontakt mit Blut in eine blaue Farbe umschlägt. Dadurch können Kolonkarzinome und große Polypen, die häufig zu Blutungen neigen, auf nicht invasivem Weg entdeckt werden. Allerdings kann das Verzehren von Häm-haltigen Nahrungsmitteln, wie Fleisch, das FOBT-Ergebnis beeinflussen und somit ein falsch positives Resultat hervorrufen (Allison et al, 2007). Im Vorsorgeprogramm ist zusätzlich eine komplette Dickdarmspiegelung für alle ab dem 55. Lebensjahr vorgesehen. Auf dieser Weise können Darmpolypen bzw. -karzinome frühzeitig entdeckt und therapiert werden. Bei unauffälligem Befund wird eine erneute Darmspiegelung im 10 Jahres-Intervall empfohlen. Im Vergleich zur Stuhluntersuchung auf okkultes Blut hat die komplette Dickdarmspiegelung eine höhere Sensitivität und Spezifität, so dass sie als Untersuchung im Rahmen der Krebsfrüherkennungsuntersuchung zu empfehlen ist (Lee et al, 2012).

1.1.3 Diagnostik und Metastasierung

Im Rahmen einer kompletten Dickdarmspiegelung werden multiple Biopsien bei Verdacht auf Dickdarmkarzinom entnommen, die anschließend histologisch auf ihre Dignität untersucht werden. Im Anschluss eines histologisch gesicherten KRK erfolgt ein „Staging“ des Patienten, um eine geeignete Therapie

festzulegen und die Prognose des Betroffenen einschätzen zu können. Dabei stellt die Sonographie des Abdomens eine der wichtigen präoperativen „Staging“-Untersuchungen dar, mit der malignitätsverdächtige abdominale Lymphknoten oder Fernmetastasen wie z. B. die der Leber festgestellt werden können. Beim unklaren Ultraschallbefund ist eine Computertomographie (CT) indiziert. Darüber hinaus soll eine Röntgenaufnahme des Thorax angefertigt werden, um die Lunge auf Fernmetastasen zu untersuchen (Schmiegel et al, 2008). Des Weiteren wird präoperativ der Ausgangswert der Tumormarker bestimmt. Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) dient während der Therapie als Verlaufsparemeter, um die Aktivität des Kolonkarzinoms besser erfassen zu können (Bast et al., 2001). Der präoperativ erhöhte Tumormarker CEA wird sich in den meisten Fällen nach einer kompletten Tumorentfernung normalisieren, so dass ein Anstieg von CEA nach Beendigung der Tumorthapie als tumorverdächtig betrachtet wird und weitere Untersuchungen eingeleitet werden müssen, um ein Tumorrezidiv auszuschließen (Nazato et al, 2009). Neben dem Tumormarker CEA wird präoperativ der Wert des Carbohydrate Antigens 19-9 (CA 19-9) bestimmt. Obwohl viele Patienten mit Kolonkarzinom erhöhte Tumormarker aufweisen, ist die Aussagekraft aufgrund der geringen Tumorspezifität unzureichend, um die Tumormarker im Rahmen der Krebsfrüherkennung von Kolonkarzinom einzusetzen. Beispielweise ist der Tumormarker CA19-9 auch bei Primärkarzinomen der Bauchspeicheldrüse und Leber erhöht. Ebenso kann eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse die Höhe des Tumormarkers CA19-9 beeinflussen (Yu et al, 2013).

Für die Prognose des Krankheitsverlaufs von KRK spielen die Ausdehnung und die Tiefeninvasion des Karzinoms eine wichtige Rolle. Darüber hinaus stellt der Tumorbefall der regionalen Lymphknoten und der Leber einen prognostischen limitierenden Faktor dar. Die Lymphknoten des Dickdarms werden in 4 Gruppen unterteilt, und die lymph-drainierenden Gefäße verlaufen im Gegensatz zu anderen Organen mit den arteriellen Gefäßen (A. mesenterica superior und A. mesenterica inferior). Im Falle einer Lymphknotenmetastase werden neben der Resektion des Primärtumors mindestens 12 regionale Lymphknoten entfernt, um sie pathologisch auf ihre Dignität zu untersuchen (Schmiegel et al, 2008; Denham et al, 2012). Neben den regionalen Lymphknoten treten meist

Fernmetastasen in der Leber auf. Bereits bei Erstdiagnose des KRKs weisen 15% der Betroffenen Lebermetastasen auf. Im Krankheitsverlauf kann die Inzidenz für Lebermetastasen bis zu 60 Prozent ansteigen. Des Weiteren scheint ein Zusammenhang zwischen Lebermetastasen und der Zunahme von Metastasenbildung im gesamten Körper zu bestehen (Zhang & Song, 2014).

1.1.4 Konventionelle Therapie

Der folgende Abschnitt gibt einen Gesamtüberblick der verschiedenen Therapiemöglichkeiten des Kolonkarzinoms. Zu erwähnen ist die vollständige Entfernung des Primärtumors samt Lymphknoten, die mittels „Non-Touch-Technik“ als En-bloc-Resektion durchgeführt wird. Diese operative Vorgehensweise stellt einen ausschlaggebenden Punkt für die Prognose der Erkrankung dar. Hierbei orientiert sich das Ausmaß der Dickdarmentfernung an der Lokalisation des Primärtumors. Beispielsweise wird bei Tumorbefall des aufsteigenden Dickdarmabschnitts (Colon ascendens) eine rechtsseitige Teilentfernung des Dickdarms (rechtsseitige Hemikolektomie) und beim Tumornachweis im absteigenden Dickdarmabschnitt (Colon descendens) eine linksseitige Teilentfernung des Dickdarms (linksseitige Hemikolektomie) durchgeführt. Für den Fall, dass der Tumor eine der beiden Kolonflexuren infiltriert hat, ist die erweiterte Teilentfernung des Dickdarms die Operation der Wahl, indem der querverlaufende Abschnitt des Dickdarms (Colon transversum) einschließlich der befallenen Kolonflexur entfernt wird. Mithilfe von End-zu-End-Nähten wird die Kontinuität der Dickdarmendstücke wiederhergestellt. Eine nahezu komplette Dickdarmentfernung (subtotale Kolektomie) ist bei Karzinomen im Colon transversum oder bei synchronen Zweittumoren in einem anderen Dickdarmabschnitt indiziert (Siewert et al, 2012). Beim Nachweis von Fernmetastasen der Leber ist eine Tumorentfernung der Leber, falls die Operabilität und Resektabilität gegeben sind, zu empfehlen.

Die Chemotherapie zur Behandlung von Kolonkarzinomen kann in zwei Indikationsgruppen mit unterschiedlicher Zielsetzung eingeteilt werden. Die adjuvante Chemotherapie, welche postoperativ verabreicht wird, soll die Rezidivrate des Kolonkarzinoms minimieren und das Gesamtüberleben der

Patienten langfristig verbessern, so dass ein kuratives Therapieziel angestrebt wird (Arkenau et al, 2003). Hierfür wird meistens das FOLFOX-Schema angewendet, welches eine Kombination aus drei verschiedenen Chemotherapeutika beinhaltet (5-Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin). Hingegen wird mit einer palliativen Chemotherapie versucht, die Tumorgröße zu verkleinern oder das Tumorwachstum aufzuhalten, um das Überleben der Patienten zu verlängern, wobei hier der kurative Therapieansatz verlassen wird. Deswegen soll während der palliativen Chemotherapie die Toxizität der Medikamente so gering wie möglich gehalten werden, um die Lebensqualität der Patienten nicht zusätzlich zu beeinträchtigen. Als Behandlung haben Seymour und Kollegen den Einsatz von 5-Fluoruracil mit Irinotecan vorgeschlagen, da in Studien gezeigt werden konnte, dass diese Kombination das Überleben der Patienten verbesserte (Seymour et al, 2007).

1.2 Die Antikörpertherapie

In den letzten Jahrzehnten sind molekulare Prozesse während der Tumorentstehung und des Tumorwachstums zunehmend in den Fokus der Tumorbehandlung gerückt, so dass zielgerichtete Antikörpertherapien vermehrt eingesetzt werden können. Die Antikörpertherapien unterscheiden sich in ihrer Zytotoxizität von der Chemo- und Strahlentherapie, da entartete Zellen selektiv „angegriffen“ werden. Folglich werden therapiebedingte Nebenwirkungen reduziert (Segota & Bukowski, 2004). Des Weiteren können Tumore, die gegen herkömmliche Chemotherapeutika resistent sind, eine gute Ansprechbarkeit auf Antikörpertherapien aufweisen. Somit hat der klinische Einsatz von Antikörpern eine Erweiterung des therapeutischen Spektrums bewirkt (Sliwkowski & Mellman, 2013).

1.2.1 Antikörper gegen den „Epidermal Growth Factor“- Rezeptor

Eine der bekanntesten Rezeptorfamilien, die als Zielstruktur der Antikörpertherapie dient, ist die „Epidermal Growth Factor (EGF)“ Rezeptorfamilie. Als Untertypen sind ErbB1 (EGFr) und ErbB2 (Her2/neu) hervorzuheben, welche bei zahlreichen malignen Tumorerkrankungen stark exprimiert vorkommen. Der EGF-Rezeptor (EGFR) besteht aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einem transmembranen Zwischenglied und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Die Ligandenbindung an EGFR löst eine Dimerisierung von zwei homologen oder heterologen Rezeptoren derselben Rezeptorfamilie aus. Durch die Dimerisierung wird die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung. Am Ende der Reaktionskaskade werden die Zellen zur Teilung angeregt (Mendelsohn & Baselga, 2000). Die Reaktionskaskade des EGF-Rezeptors kann auf zwei Wegen supprimiert werden. Als Erstes sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren mit dem bekannten Beispiel „Genfitinib“ zu nennen. Genfitinib ist ein kleines Molekül, das intrazellulär direkt mit der Bindungsstelle für Adenosintriphosphat konkurriert. Nach der Bindung von Genfitinib wird die zelluläre Phosphorylierung und Aktivierung von EGFR verhindert (Sliwkowski et al, 2013; Mahipal et al, 2014). Des Weiteren besitzen entartete Zellen die Eigenschaft EGF-Rezeptoren wie ErbB1 und/oder HER2/neu zu überexprimieren und dadurch abnormale Zellfunktionen auszulösen, weswegen sie selbst wichtige Zielstrukturen für eine Antikörpertherapie darstellen. Die Antikörperbindung an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors wirkt antagonistisch, indem dieses EGFR-Epitop für weitere Liganden blockiert, ohne jedoch selbst eine Aktivierung des EGF-Rezeptors auszulösen. Durch diesen Wirkmechanismus sind die Antikörper in der Lage, die Funktion von EGFR zu inhibieren. Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Antikörpertherapien von ausgewählten Malignomen eingegangen, um die Vielfältigkeit dieses Verfahrens detailliert zu beleuchten.

1.2.2 Antikörpertherapie zur Behandlung des Mammakarzinoms

Als Beispiel für einen humanisierten monoklonalen Antikörper der IgG-Klasse ist Trastuzumab (Herceptin®) zu nennen. Trastuzumab richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne von HER2/neu und beeinflusst die intrazelluläre Signalkaskade der Tumorzellen, indem das Tumorwachstum gehemmt wird (Mendelsohn & Baselga, 2000; Hurrell & Othoff, 2013; Zurawska et al, 2013). Diese Eigenschaft von Trastuzumab wird in der Brustkrebs-Therapie genutzt. Ein Mammakarzinom mit überexprimierten HER2/neu-Rezeptoren bedeutet nicht nur ein erhöhtes Risiko für Lokalrezidive, sondern auch eine Zunahme der tumorbedingten Letalität, so dass ein positiver HER2/neu-Rezeptorstatus als negativer prognostischer Faktor gilt. Laut Zurawska und Kollegen weisen 15 bis 20 Prozent der Patientinnen mit Brustkrebs eine Überexpression des HER2/neu-Rezeptors auf, so dass zusätzlich zur Chemotherapie eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab erfolgen soll.

1.2.3 Antikörpertherapie zur Behandlung des Kolonkarzinoms

Cetuximab (Erbix®) stellt ein weiteres Beispiel für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern der IgG-Klasse dar und wird in der Behandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen eingesetzt. Der chimäre Antikörper besteht aus einem murinen Anteil und wird mit Fragmenten des menschlichen Antikörpers der IgG-Klasse kombiniert. Diese Zusammensetzung soll die körpereigene Antigen-Antikörper-Reaktion, welche durch den murinen Anteil des Antikörpers induziert wird, reduzieren (Goldstein et al, 1995). Cetuximab entfaltet seine Wirkung, indem es an die extrazelluläre Domäne eines EGF-Rezeptors bindet und das EGFR-Epitop für eine weitere Ligandenbindung unzugänglich macht. Letzten Endes führt die Antikörperbindung zur Inaktivierung von EGFR und hemmt hierdurch die Zellproliferation (Segota & Bukowski, 2004; Dahan et al, 2011). Schmitz und Kollegen gelang in ihren experimentellen Versuchen die proliferationshemmende Wirkung des Cetuximabs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachzuweisen (Schmitz & Ferguson, 2009). Bei Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen wird Cetuximab in Kombination mit 5-Fluoruracil, Folinsäure und Irinotecan (FOLFIRI-Schema)

eingesetzt. Des Weiteren können Patienten, die eine Unverträglichkeit gegenüber Irinotecan aufweisen, von einer Cetuximab-Monotherapie profitieren. Beim fehlenden Ansprechen auf Oxaliplatin und Irinotecan kann Cetuximab als Antikörpertherapie eingesetzt werden (Sliwkowski & Mellman, 2013). Eine weitere Behandlungsmöglichkeit von Kolonkarzinomen stellt die Blockierung des „Vascular Endothelial Growth Factors“ (VEGF) durch Bevacizumab (Avastin®) dar. Die Hemmung von VEGF führt zu Hypoxie in Tumorzellen, wodurch langfristig eine Apoptose der Tumorzellen ausgelöst wird. Durch den Einsatz von Bevacizumab mit Chemotherapeutika wurde bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom eine Verlängerung der mittleren Überlebensrate um mehrere Monate nachgewiesen (Islam et al, 2013).

1.3 Die natürlichen Antikörper

Im Gegensatz zu Antikörpern der IgG-Klasse gehören die meisten natürlichen Antikörper der IgM-Klasse an und sind ein Bestandteil des primären, angeborenen Immunsystems. Die natürlichen Antikörper sind bereits im Blut eines Individuums vorzufinden, ohne dass ihre Bildung durch einen Antigenkontakt stimuliert wurde (Boes, 2000; Brändlein et al, 2003b; Vollmers & Brändlein, 2007). Im Unterschied zu IgG-Antikörpern besitzen IgM-Antikörper eine niedrigere Affinität zu einem spezifischen Antigen. Deswegen werden sie häufig als „unspezifische“ Antikörper bezeichnet. Dieser „Nachteil“ wird allerdings durch die spezielle Struktur in Form eines Pentamers kompensiert. Eine Eigenschaft natürlicher Antikörper ist die Mitwirkung an Detektion und Elimination von Erregern. Nach Entstehung eines Antigen-Antikörper-Komplexes wird die Aktivierung des Komplementsystems in Gang gesetzt und die Immunantwort ausgelöst (Boes, 2000). Zusätzlich sind natürliche Antikörper an der Unterscheidung zwischen gesunden und malignen Zellen beteiligt. Sie können an Epitope modifizierter Rezeptoren auf malignen Zellen binden und dadurch die intrinsische Apoptose induzieren (Vollmers & Brändlein, 2007).

Infolgedessen sind natürliche Antikörper der IgM-Klasse ein unentbehrlicher Bestandteil der Tumorüberwachung (Rosenes et al, 2013). Zu den natürlichen Antikörpern zählen auch die in dieser Arbeit verwendeten humanen Antikörper PAT-SM6 und PAT-LM1. Beide Antikörper sind durch Hybridisierung von B-Zellen, die aus lymphatischem Material von Tumorpatienten isoliert wurden, entstanden (Brändlein et al, 2003a).

1.3.1 Der Antikörper PAT-SM6

Der humane monoklonale Antikörper PAT-SM6 wurde aus einem Patienten mit Magenkarzinom isoliert. Es handelt sich dabei um einen natürlichen IgM-Antikörper, der von nicht-mutierten Genen der Keimbahn IgHV3-30.3*01 und LgLV3-1*01 kodiert wird (Pohle et al, 2004). Eine Besonderheit des PAT-SM6 Antikörpers besteht in seiner Fähigkeit, an das 'Glucose-Related' Protein 78 (GRP78^{PAT-SM6}) zu binden. GRP78^{PAT-SM6} stellt mit einem Molekulargewicht von 82 kD eine neue Isoform des GRP78 der Familie der Hitze-Schock-Proteine 70 (HSP 70) dar, die vor allem auf malignen Zellen überexprimiert vorkommt. Der PAT-SM6 Antikörper bindet an ein Kohlenhydrat-Epitop des GRP78^{PAT-SM6} (Rauschert et al, 2008). Zusätzlich ist PAT-SM6 in der Lage, oxidiertes 'low-density' Lipoprotein (LDL) zu binden. Es scheint, dass erst nach der Bindung von PAT-SM6 eine Wechselwirkung zwischen GRP78^{PAT-SM6} und oxidiertem LDL entsteht und somit die Endozytose von oxidiertem LDL mit PAT-SM6 in malignen Zellen ermöglicht. Bereits kurz nach der Endozytose wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt, welches die Caspasen-8 und -9 aktiviert. Infolgedessen werden die terminalen Caspase-3 und -6 aktiviert und in die Kaskade einbezogen. Das führt schließlich zur sogenannten Lipoptose, einer neuen Art der Apoptose, die durch intrazelluläre Lipidakkumulation von Cholesterinestern und Triglyceriden ausgelöst wird (Pohle et al, 2004; Brändlein et al, 2007). In der experimentellen Arbeit von Rasche und Kollegen wurde anhand der Untersuchung von PAT-SM6 am Multiplen Myelom gezeigt, dass der Antikörper in der Lage ist, den Komplementfaktor C1q zu aktivieren und dadurch auch eine Komplement-abhängige-Zytotoxizität (CDC) auszulösen. Allerdings

induziert der PAT-SM6 Antikörper im Gegensatz zu anderen IgM-Antikörpern nicht die Antikörper-abhängige-Zytotoxizität (ADCC) (Rasche et al, 2013).

1.3.2 Der Antikörper PAT-LM1

Der PAT-LM1 Antikörper stellt ein weiteres Mitglied der natürlichen Antikörper der IgM-Klasse dar. Er ist ebenfalls ein keimbahnkodierter humaner Antikörper (Brändlein et al, 2003a). Der PAT-LM1 Antikörper besitzt die Fähigkeit, Epitope von Tumorzellen zu binden und dadurch ihre Apoptose auszulösen. Hierbei findet die Bindung von PAT-LM1 an NONO^{PAT-LM1} (Non-POU domain-containing octamer-binding protein), ein Protein der DBHS-Familie (*Drosophila melanogaster* Behaviour Human Splicing), statt. Die DBHS-Proteine befinden sich überwiegend im Zellkern und sind in viele zelluläre Mechanismen involviert. Hervorzuheben ist die Beteiligung von DBHS-Proteinen an der Genregulation, indem sie während oder im Anschluss der Gentranskription in die Zellreparatur eingreifen. Darüber hinaus können DBHS-Proteine die Tumorentwicklung und -progression sowie den zirkadianen Rhythmus des Organismus beeinflussen (Passon et al, 2012). Des Weiteren zeichnen sich DBHS-Proteine durch die Fähigkeit aus, an RNA-Abschnitte zu binden, wobei der Komplex aus RNA und DBHS-Protein als „Paraspeckle“ bezeichnet wird. Die Paraspeckles können ihrerseits in die Genexpression während der Zelldifferenzierung eingreifen (Fox & Lamond, 2010).

Der PAT-LM1 Antikörper ist in der Lage an Tumorzellen zu binden, da viele Tumorzellen NONO^{PAT-LM1} auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, und diese als Zielstruktur des PAT-LM1 Antikörpers fungiert. Im Gegensatz dazu bindet PAT-LM1 Antikörper nicht an gesunde Zellen. Als Fazit kann festgehalten werden, dass die Bindung von PAT-LM1 an NONO^{PAT-LM1} eine interessante Möglichkeit darstellt, Tumorzellen in ihrer Entstehung und Differenzierung zu hemmen.

1.4 Ziel der Arbeit

Die natürlichen Antikörper der IgM-Klasse sind einerseits an der Abwehr von Erregern beteiligt, andererseits in der Lage Zelloptose zu induzieren, wodurch maligne Zellen eliminiert werden können. Hierzu gehören die humanen, keimbahnkodierte Antikörper PAT-SM6 und PAT-LM1, die an Oberflächenrezeptoren, an GRP78^{PAT-SM6} und NONO^{PAT-LM1}, der Tumorzellen binden und Lipoptose bzw. Apoptose auslösen. In den letzten Jahrzehnten nahmen Antikörper in der Tumorthherapie stetig an Bedeutung zu. Antikörper, wie Cetuximab oder Trastuzumab, sind neben den herkömmlichen Chemotherapeutika mittlerweile als wichtiger Kombinationspartner nicht mehr wegzudenken, und das Spektrum der Antikörpertherapie wird zunehmend erweitert. Auch Antikörper der IgM-Klasse, wie beispielsweise PAT-SM6, befinden sich bereits bei Patienten mit Multiplem Myelom bzw. malignem Melanom in der klinischen Erprobung.

Nun stellt sich die Frage, inwiefern PAT-SM6 und PAT-LM1 für diagnostische und therapeutische Zwecke zur Behandlung von Kolonkarzinom geeignet wären. Ein Ansatzpunkt stellt die Begutachtung von Gewebeschnitten des Konlonkarzinoms und seinen Metastasen nach immunhistochemischen Färbung mit PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern dar, die Gegenstand dieser medizinischen Doktorarbeit sind. Des Weiteren werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Patientendaten korreliert um eventuelle Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren festzustellen.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.2.1 Verbrauchsmaterial

allgemeine Materialien und Kits	Hersteller
DAB Tabletten SigmaFAST™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Demaskierungslösung G	Biologo, Kronshagen
Eppendorf Tubes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bio Magermilch Pulver	Heirler, Radolfzell
Super Frost Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	R. Langenbrink, Emmendingen
Deckgläschen 24 x 50 mm	Hartenstein, Würzburg
Aquatex Eindeckmittel	Merck, Darmstadt

Antikörper und Seren	Hersteller
IgM-Antikörper aus menschlichem Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
monoklonal Maus IgG, anti-Mensch Zytokeratin AE ₁ /AE ₃	Dako, Hamburg
Maus Serum IgM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
polyklonal Kaninchen, anti-Mensch IgM, HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg
polyklonal Kaninchen, anti-Maus IgM, HRP-gekoppelt	Dako, Hamburg
Kaninchen Serum IgM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PAT-SM6, humaner IgM-Antikörper	eigenes Labor
PAT-LM1, humaner IgM-Antikörper	eigenes Labor

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank Heracell	Kendro, Langensfeld
Mikroskop Leica DMIL	Leica Mikrosystem AG, Wetzlar
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim i. OB
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Reinstwassersystem MilliQ®	Millipore, Eschborn
Vortex Mixer 7-2020	Satorius, Heidelberg
Waage MC 1	Sartorius, Göttingen
Wasserbad WB10	Memmert, Schwabach

2.1.3 Puffer und sonstige Lösungen für die Immunhistochemie

Lösungen

Demaskierungslösung

1 Volumenteil Demaskierungslösung G

4 Volumenteile dest. Wasser aus Reinstwassersystem MilliQ®

Blocklösung für die Immunperoxidase-Färbung der Paraffinschnitte

PBS, pH 7,4

3% (m/v) Magermilchpulver

DAB-Substratlösung

SigmaFAST™ DAB Tablets

Kurz vor Gebrauch in der vorbeschriebenen Menge Leitungswasser auflösen.

Puffer

Phosphate Buffered Saline (PBS)

0,137 M Natriumchlorid (NaCl)

0,027 M Kaliumchlorid (KCl)

0,065 M Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

0,015 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Tris-NaCl

5 mM Tris

140 mM NaCl

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Salzsäure (HCl) pH 7,4 eingestellt.

2.1.4 Patientendaten

Die Rekrutierung geeigneter Tumorentitäten erfolgte mittels des PAS-Systems am Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Anhand der jeweiligen histologischen Befunde wurden die HE-gefärbten histologischen Präparate aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg verwendet. Unter dem Mikroskop wurden die Kolonkarzinome oder die zugehörigen Metastasen lokalisiert und beurteilt. Für die immunhistochemischen Analysen wurden Schnitte der entsprechenden Paraffinblöcke mit PAT-SM6 und PAT-LM1 IgM-Antikörper gefärbt.

2.1.5 Einschlusskriterien

Für die Patientenrekrutierung wurde ein Zeitfenster von 15 Jahren (1997-2012) festgelegt. Eine weitere Voraussetzung war, dass sowohl das primäre Kolonkarzinom als auch die zugehörigen Metastasen an der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Würzburg operiert wurden. Diese Einschränkung ist notwendig, weil die Patientendaten im „Comprehensive Cancer Center“ (CCC) Mainfranken registriert wurden und einen Vergleich der Patientendaten ermöglichen.

2.2 Methoden

2.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten aus Paraffinblöcken

Die Paraffinblöcke wurden zunächst über Nacht bei - 20°C im Gefrierschrank gekühlt. Am Folgetag wurden pro Paraffinblock jeweils 10 Gewebeschnitte von 2 µm Dicke mittels eines Mikrotoms hergestellt, die anschließend auf ein Wasserbad bei Raumtemperatur aufgelegt wurden, damit die Schnitte sich entfalten konnten. Danach wurden sie auf ein 30°C warmes Wasserbad aufgelegt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf Super Frost Plus-Objektträger aufgezogen. Nach dem Kennzeichnen der Objektträger wurden die Gewebeschnitte zum Trocken bei Raumtemperatur über Nacht gelagert.

2.2.2 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung mussten die Gewebeschnitte zuerst von Paraffin befreit werden. Der Vorgang fand mit Hilfe einer Alkoholreihe in absteigenden Konzentrationen statt. Die Inkubation der Gewebeschnitte wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Inkubationszeit (min)	Alkoholreihe
10	100% Ethanol
3	90% (v/v) Ethanol
3	80% (v/v) Ethanol
3	70% (v/v) Ethanol

Um die Gewebeschnitten mit einer Lösung aus 70 ml Methanol und 500 µl H₂O₂ zu bearbeiten, wurde die Entparaffinierung einmalig unterbrochen. Dieser Zwischenschritt dient als Vorbereitung für die Peroxidase Reaktion. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in mit Tris-NaCl Puffer gefüllten Glasküvetten gesammelt. Die Demaskierung erfolgte durch 20 minütiges Kochen in Demaskierungslösung G (1:4 in Aqua dest.) bei 99°C. Danach wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten in Tris-NaCl-Puffer gestellt, gefolgt von der Inkubation in je 150µl einer 3%igen Magermilchpulverlösung bei

Raumtemperatur für weitere 20 Minuten in einer Feuchtkammer aus Plastik. Anschließend wurden die Gewebeschnitte einmal mit Tris-NaCl Lösung gewaschen.

Anschließend erfolgte die immunhistochemische Färbung nach folgendem Färbeprotokoll:

Zunächst wurden je 150µl der Primärantikörper auf die Gewebsschnitte pipettiert. Die Kontrollen wurden begleitend mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein monoklonaler IgG-Antikörper AE₁/AE₃ gegen menschliches Zytokeratin verwendet. Bei Epithelzellen, die das Zytokeratin in ihrem Zytoskelett tragen, fällt die Antigen/Antikörper-Reaktion positiv aus und ist unter dem Mikroskop als braune Färbung sichtbar. Die Isotypkontrolle mit IgM aus menschlichem Serum der Firma Sigma-Aldrich wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (10µg und 20µg) mitgeführt und diente als Kontrolle von unspezifischen IgM-Bindungen. Als Negativkontrolle wurde reine PBS-Lösung verwendet. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte in einer feuchten Kammer für 90 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden diese mit Tris-NaCl dreimal gewaschen. Danach wurden die jeweiligen mit Peroxidase-gekoppelten Antikörper aufgetragen, die als Sekundärantikörper mit den passenden Primärantikörpern reagierten. Bevor die mit Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Antikörper auf die Gewebeschnitte aufgetragen werden konnten wurden sie zunächst entsprechend verdünnt. Der Antikörper für die Positivkontrolle war ein mit Peroxidase-gekoppelter polyklonaler Antikörper von Kaninchen, die gegen IgM von Mäusen gerichtet sind. Vor dem Auftragen wurde dieser in einer Konzentration von 1:50 verdünnt und mit Humanserum gemischt. Auf die restlichen Gewebsschnitte wurden die Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Antikörper von Kaninchen, die gegen menschliches IgM gerichtet sind, in einer 1:50 Konzentration verdünnt und mit Kaninchenserum gemischt, aufgetragen. Nach dem Pipettieren der Sekundärantikörper fand die Inkubation der Gewebeschnitte in der Feuchtkammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur statt. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift der Gewebeschnitte mit Tris-NaCl, bevor die Ruhephase in einer PBS-Lösung für 10 Minuten einsetzte. Währenddessen wurde die DAB-Substratlösung für die Peroxidase vorbereitet. Dabei wurden eine Tablette 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und eine

Wasserstoffperoxid-Tablette (SimaFAST™ DAB Tablets) in 1,5ml Leitungswasser aufgelöst. Pro Gewebeschnitt wurden 150 µl von der DAB-Substratlösung aufgetragen und bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte mit destilliertem Wasser aus dem Reinwassersystem MilliQ® gewaschen. Nun folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für 5 Minuten. Demnach wurden die Präparate für weitere 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Zum Schluss wurden die gefärbten Gewebeschnitte in destilliertem Wasser aufbewahrt und mittels Aquatex und Deckgläsern eingebettet.

Tabelle 1: Immunperoxidase-Färbung auf Paraffingewebeschnitten

Antikörper		Konzentration/ Verdünnung
Primärantikörper	PAT-SM6, IgM, Mensch	10µg/ml
	PAT-LM1, IgM, Mensch	20µg/ml
Isotypkontrolle	IgM, Mensch	10µg/ml bzw. 20µg/ml
Positivkontrolle	IgG Maus, anti-Mensch Zytokeratin AE ₁ /AE	1:20*
Negativkontrolle	PBS	kein Antikörper
Sekundär- antikörper	polyklonal Kaninchen, anti-Mensch IgM, HRP	1:50*
	polyklonal Kaninchen, anti-Maus IgM, HRP	1:50*

* verdünnt in PBS-Lösung

2.2.3 Einteilung der immunhistochemischen Färbeergebnisse in ein ‚Score‘- System

2.2.3.1 Einteilung der Anzahl angefärbter Tumorzellen durch PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörper

Die qualitative Einteilung angefärbter Tumorzellen erfolgte anhand der mikroskopischen Untersuchung der Gewebeschnitte. Als Positivkontrolle wurden IgG-Antikörper eingesetzt, welche gegen humane Zytokeratine des Zytosklettes gerichtet sind. Die von der Positivkontrolle angefärbten Zellen lassen sich mikroskopisch als braune Zellen darstellen. Dabei wurde das Verhältnis zwischen gefärbten und nicht gefärbten Zellen eines Gewebsschnittes in Prozenten angegeben. Dieselbe Methode wurde für die Tumorzellfärbung mit PAT-SM6 und PAT-LM1 IgM-Antikörper aus dem eigenen Labor verwendet. Dabei wurde die Menge der Antikörper-gebundenen und -nicht gebundenen Zellen unter dem Mikroskop quantifiziert und in Prozenten angegeben. Die Differenz der Prozente variierte je nach Untersuchern zwischen 5% bis 15%. Um diese Schwankungen so gering wie möglich zu halten wurden die Gewebeschnitte zunächst von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Bei größeren Abweichungen wurde ein Mittelwert aus allen Ergebnissen ermittelt.

Die Einteilung der Antikörper-gebundenen Tumorzellen in Prozent wurde in ein Score-System eingeteilt um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können. Insgesamt wurden vier Gruppen festgelegt. In Gruppe 1 sind 0%-50% der Tumorzellen eines Gewebepräparates mit PAT-SM6 oder PAT-LM1 Antikörpern gebunden. In Gruppe 2 hatten 60%-85%, in Gruppe 3 90%-95% und in Gruppe 4 über 95% der Tumorzellen den IgM-Antikörper gebunden.

2.2.3.2 Einteilung der Färbeintensität von PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern

Die Intensität der immunhistochemischen Färbung mit PAT-SM6 bzw. PAT-LM1 IgM-Antikörpern wurde in drei Einzelgruppen infolge verschiedener Färbeintensitäten eingeteilt. Die Zuordnung wurde unter dem Mikroskop festgelegt.

Gruppe 1 wies Tumorzellen mit einer schwachen braunen Färbung auf. Diese wurde mit einem „+“ gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu sind Tumorzellen der Gruppe 3 am intensivsten gefärbt und drei „+“ Zeichen zugeteilt. Die mittlere Färbeintensität der Tumorzellen wurde mit „++“ dargestellt.

III. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Patienteneinteilung nach Geschlecht und Lebensalter

Im vorgegebenen Zeitraum zwischen 1997 bis 2012 wurden aus dem PAS-System des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg insgesamt 41 Patienten für diese Arbeit rekrutiert. Alle Patientenfälle, die in dieser Studie eingeschlossen sind, unterlagen der Voraussetzung, dass sowohl der Primärtumor als auch die Fernmetastasen in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg reseziert wurden. Von den 41 Patienten waren 16 (39%) weiblich und 25 (61%) männlich. Des Weiteren wurden die Patienten anhand des Lebensalters während der Erstdiagnose in 4 Gruppen eingeteilt (Abb. 3.1). Die tabellarische Zusammenfassung (Anhang A) gibt einen Überblick des Patientenkollektives.

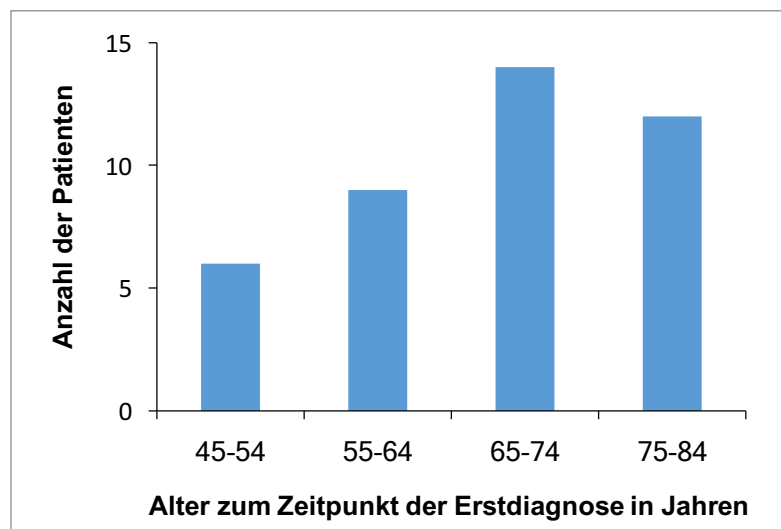


Abb. 3.1: Altersverteilung der rekrutierten Patienten bei der Erstdiagnose des Kolonkarzinoms

3.1.2 Einteilung der Metastasen

Von insgesamt 41 Fällen wiesen 23 der Betroffenen (56%) eine Fernmetastase auf. Davon wurden in 10 Fällen (24%) der Primärtumor und die Lebermetastase, und in 9 von 23 Fällen (22%) der Primärtumor mit den zugehörigen Lymphknoten- und Lebermetastasen untersucht. In weiteren 4 Fällen (10%) befanden sich die Fernmetastasen in anderen Organen, wie im weiblichen Geschlechtsorgan (Tuben bzw. Adnexe), im Duodenum oder Peritoneum. In den restlichen 18 Fällen (43,9%) wurden Kolonkarzinome mit Lymphknotenmetastasen untersucht (Abb. 3.2). Die UICC- und TNM-Stadien wurden tabellarisch zusammengefasst und den jeweiligen Patienten zugeordnet. Diese sind im Anhang A) dargestellt.

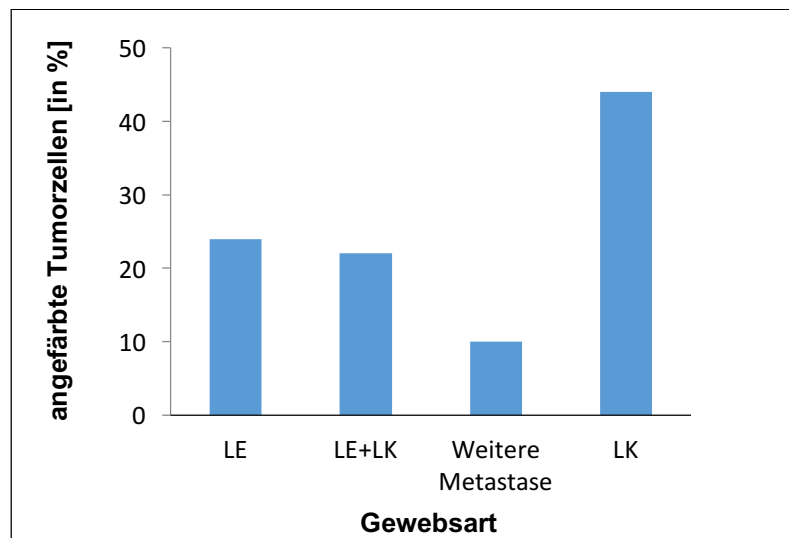


Abb. 3.2: Häufigkeitsverteilung der einzelnen Untergruppen hinsichtlich der Metastasen

Abkürzung: Lebermetastase (LE), Lymphknotenmetastase (LK)

3.2 Immunhistochemische Untersuchungen mit PAT-SM6 Antikörper

Der Primärtumor des Kolonkarzinoms war ein histologisch gesichertes Adenokarzinom. Die zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen erfüllten ebenfalls die histologischen Kriterien eines Adenokarzinoms. In den meisten Fällen waren mehr als 95% der Tumorzellen des Dickdarms mit PAT-SM6 angefärbt. Sie wurden der Gruppe 4 zugeordnet (siehe auch 2.2.3.1). In nur 3 von insgesamt 41 Fällen (7%) wurden weniger als 50% der Zellen des Tumors durch PAT-SM6 gefärbt. Die folgende Grafik (Abb. 3.3) stellt die Gruppenverteilung von Kolonkarzinomen anhand der Zahl der Tumorzellenfärbungen durch den PAT-SM6 Antikörper dar.

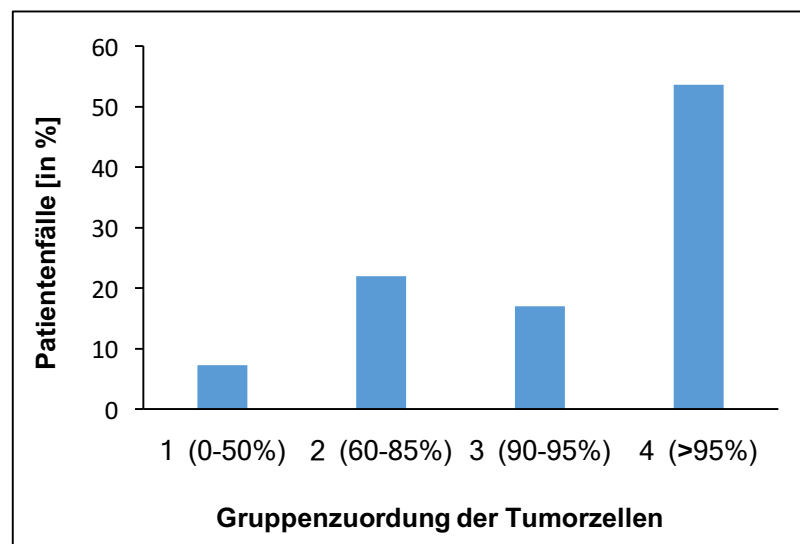


Abb. 3.3: Gruppenverteilung PAT-SM6-gefärbter Tumorzellen des Kolonkarzinoms (in Prozent)

Als Nächstes wurden die Lymphknotenmetastasen auf ihr Färbeverhalten mit PAT-SM6 untersucht. Im Vergleich mit dem Primärtumor zeigte sich hier ein ähnliches Färbeverhalten, indem die meisten Tumorzellen eines Paraffinschnittes positiv gefärbt waren. In nur einem von 28 Fällen (4%) sind weniger als 50% der Zellen der Lymphknotenmetastase von PAT-SM6 gefärbt

worden. Die Abbildung 3.4 verdeutlicht das Verteilungsmuster im Hinblick auf das Färbeergebnis der Lymphknotenmetastasen mit PAT-SM6.

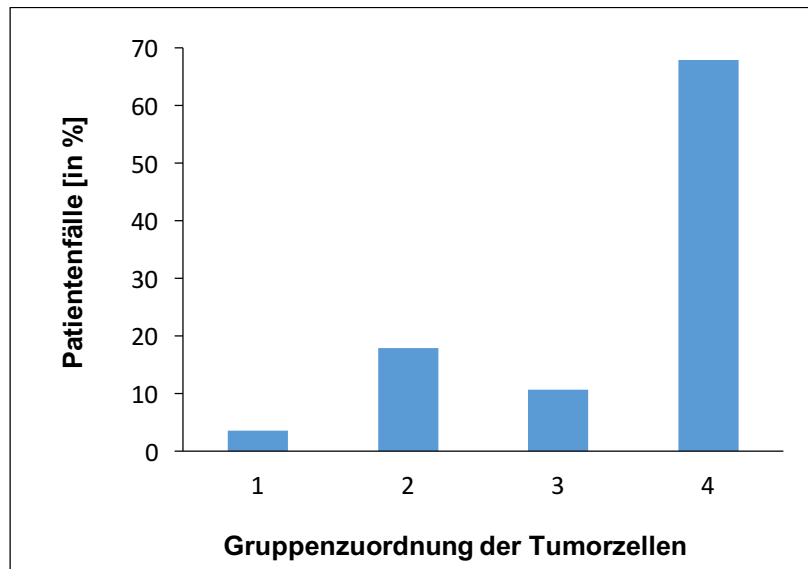


Abb. 3.4: Gruppenverteilung PAT-SM6-gefärbter Tumorzellen der regionalen Lymphknoten (in Prozent)

Anschließend wurde das Färbeverhalten von PAT-SM6 auf Fernmetastasen der Leber untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass Gruppe 4, in der über 95% aller Tumorzellen gefärbt wurden, am stärksten vertreten war. Im Vergleich dazu gab es keinen einzigen Fall, bei dem weniger als 90% der Tumorzellen eines Paraffinschnittes gefärbt waren. Die Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse der Antikörperfärbung der Lebermetastasen.

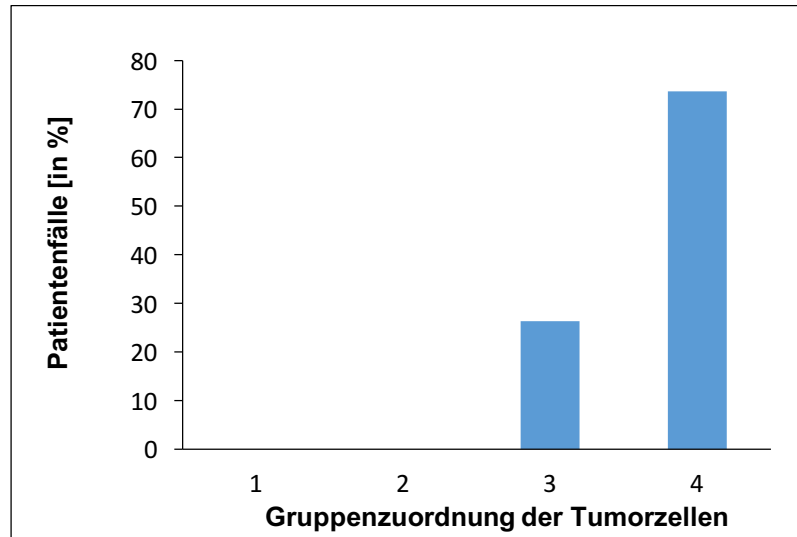


Abb. 3.5: Gruppenverteilung PAT-SM6-gefärbter Tumorzellen von Lebermetastasen (in Prozent)

Die Gegenüberstellung der Färberegebnisse von Kolonkarzinomen und der Lymphknoten- und Lebermetastasen verdeutlichte, dass unabhängig von der histologischen Herkunft der Gewebe über 95% aller Tumorzellen eines Präparates mit dem PAT-SM6 Antikörper gefärbt waren und dadurch die Mehrheit der Patientenzahl repräsentierte (Abb. 3.6).

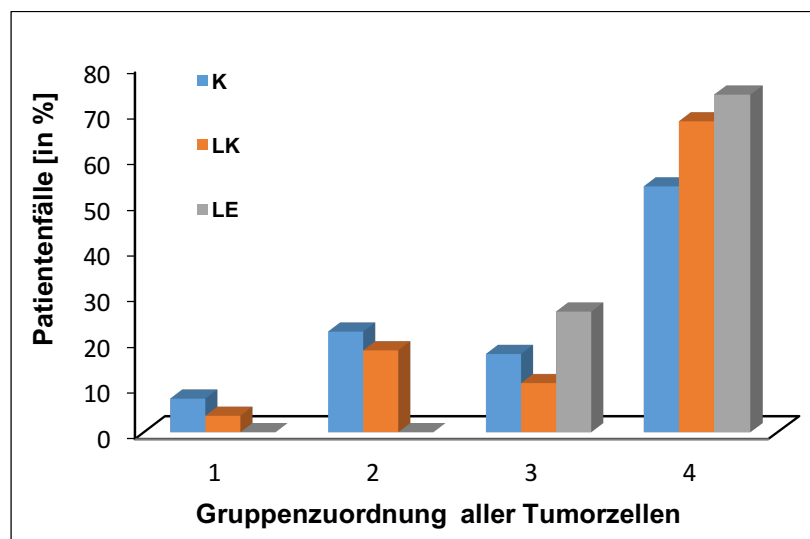


Abb. 3.6: Zusammenfassung der Gruppenverteilung PAT-SM6-gefärbter Tumorzellen

Abkürzung: Kolonkarzinom (K), Lymphknotenmetastase (LK), Lebermetastase (LE).

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen mit PAT-LM1 Antikörper

Die Gewebeschnitte von 41 Patienten wurden mit einem weiteren laboreigenen IgM-Antikörper, PAT-LM1, untersucht. Beim Primärtumor des Kolons fand in den meisten Fällen eine über 95 prozentige Antikörperfärbung der Tumorzellen statt. Nur in einer geringen Anzahl von Gewebeschnitten waren weniger als 50% der Tumorzellen mit dem PAT-LM1 Antikörper gefärbt (Abb. 3.9).

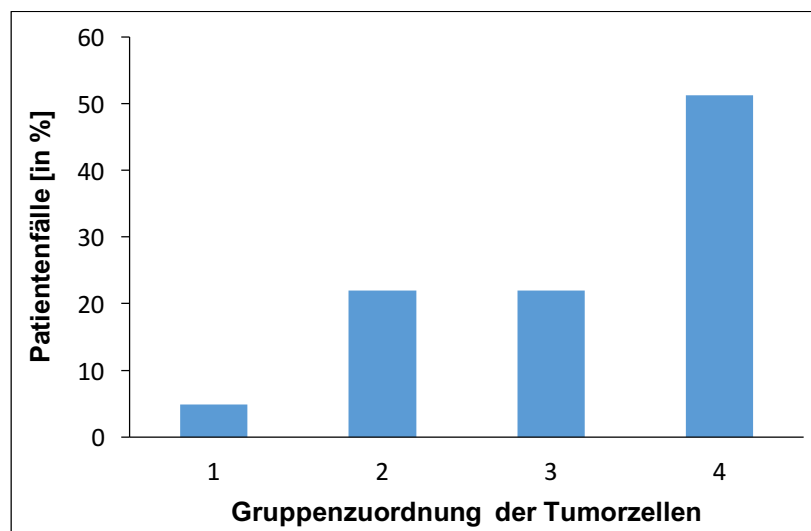


Abb. 3.9: Gruppenverteilung PAT-LM1-gefärbter Tumorzellen von Kolonkarzinomen (in Prozent)

Im Vergleich dazu ergab sich bei regionalen Lymphknotenmetastasen eine Verschiebung der Gruppenverteilung in Richtung Gruppe 3 und 4, bei denen mindestens 90% der Tumorzellen positiv gefärbt waren. Indessen wurden in nur einem Fall weniger als 50% der Tumorzellen durch PAT-LM1 angefärbt (Abb. 3.10).

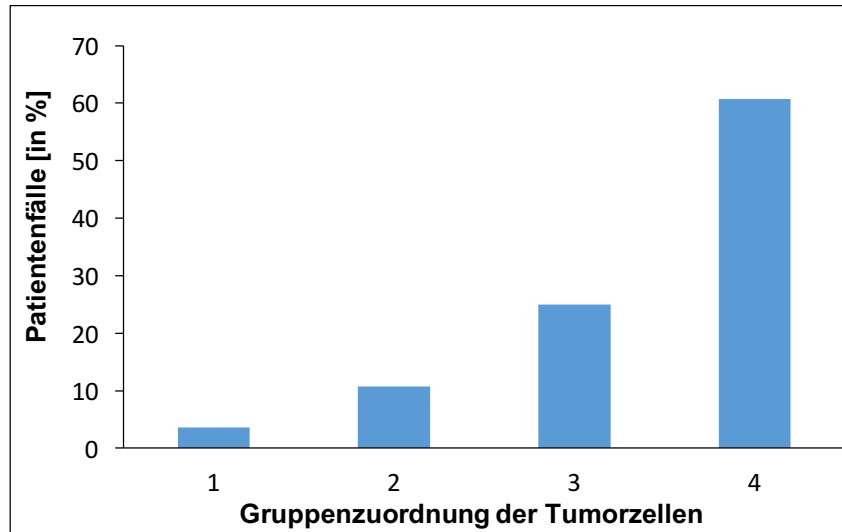


Abb. 3.10: Gruppenverteilung PAT-LM1-gefärbter Tumorzellen von regionalen Lymphknoten (in Prozent)

Des Weiteren wurde das Färbeverhalten des PAT-LM1 Antikörpers auf Lebermetastasen untersucht. Die Anzahl der Fälle, die in einem Paraffinschnitt eine Mindestanzahl von 90% angefärbter Tumorzellen aufwiesen, nahm stetig zu. Eine weniger als 50 prozentige Antikörperfärbung der Tumorzellen wurde in keinem einzigen Fall festgestellt (Abb. 3.11). Somit entsprach das Resultat der PAT-LM1 Antikörperfärbung von Lebermetastasen dem Ergebnis des PAT-SM6 Antikörpers.

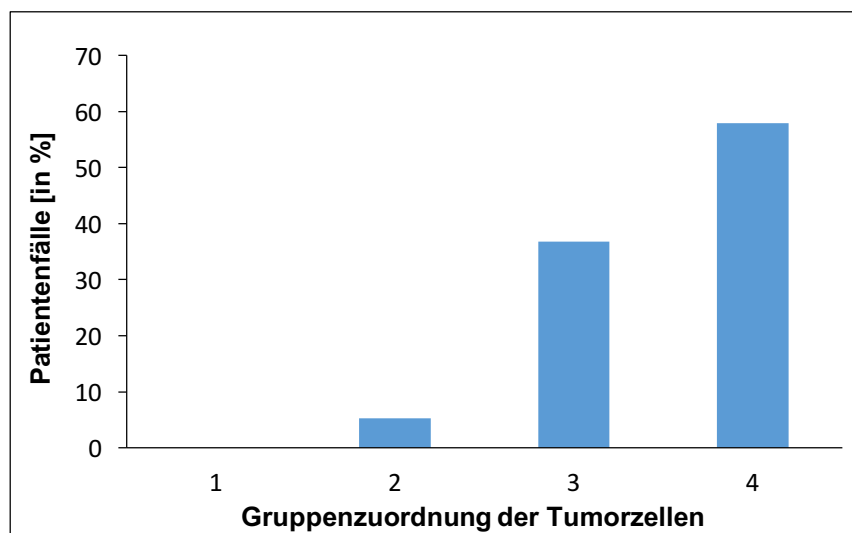


Abbildung 3.11: Gruppenverteilung PAT-LM1-gefärbter Tumorzellen von Lebermetastasen (in Prozent)

Die Abbildung 3.12 dient als Zusammenfassung der Ergebnisse der PAT-LM1 Antikörperfärbung. Sie zeigt eine zunehmende Anzahl von positiv gefärbten Tumorzellen, die nicht nur beim Primärtumor sondern auch bei den Lymphknoten- und Lebermetastasen vorkommen. Interessanterweise wurde die Ausprägung der PAT-LM1 Antikörperfärbung durch die verschiedenen Gewebstypen nicht beeinflusst und wies in allen drei Gewebetypen eine hohe Tumoraaffinität auf.

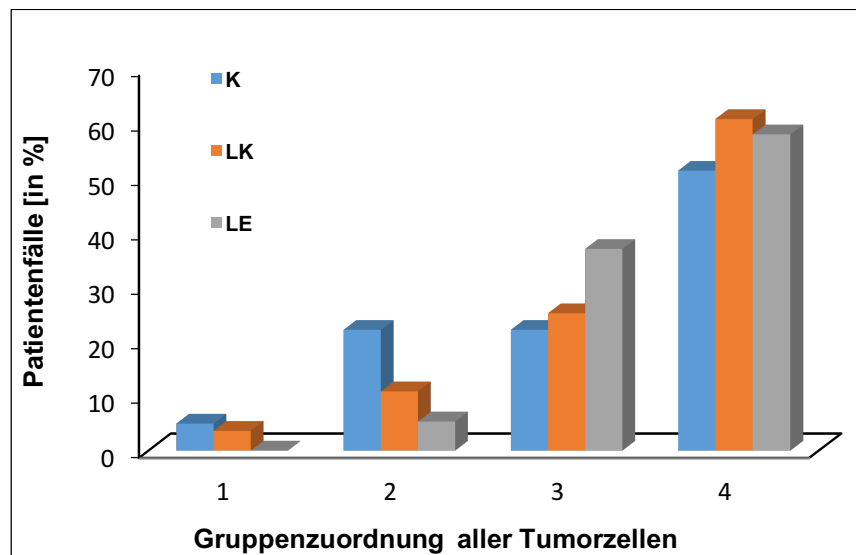


Abb. 3.12: Zusammenfassung der Gruppenverteilung PAT-LM1-gefärbter Tumorzellen

Die quantitative Analyse und die Gruppenzuordnung anhand der Färbeintensität vom PAT-LM1 Antikörper zeigte ein homologes Verteilungsmuster, wobei die Gruppe II mit einer Tumorzellfärbung von mittlerer Intensität die am stärksten vertretene Gruppe darstellte. Diese Feststellung traf sowohl für den Primärtumor als auch für dessen Metastasen zu. Dennoch zeigte sich bei genauer Betrachtung der Färbeergebnisse ein kleiner Unterschied in der Gruppenverteilung. Im Vergleich zu den Metastasen waren die Tumorzellen des Primärtumors häufiger im Bereich der schwachen Antikörperfärbung (+)

anzutreffen, wohingegen die Tumorzellen der Metastasen überwiegend mittelstark (++) oder sehr stark (+++) gefärbt waren (Abb. 3.13).

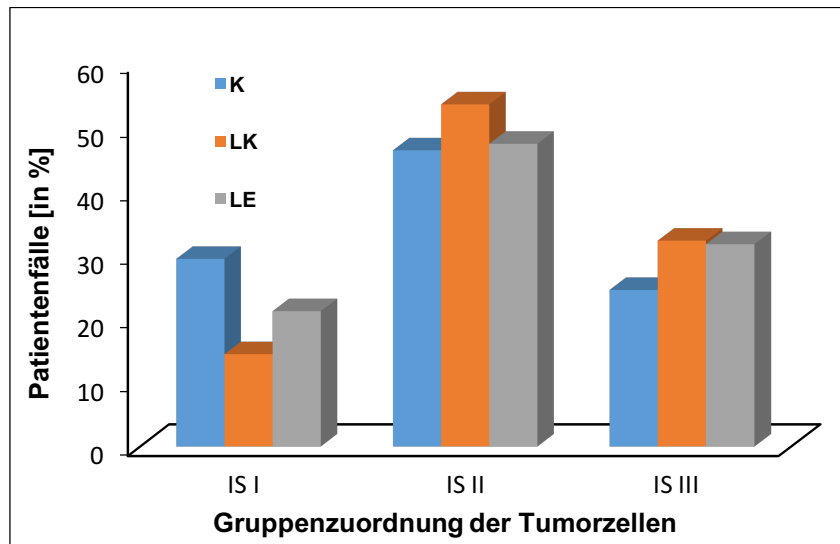


Abb. 3.13: Zusammenfassung der Gruppenverteilung PAT-LM1-gefärbter Tumorzellen hinsichtlich der Färbeintensität (IS)

3.4 Darstellung immunhistochemischer Färbungen mit PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern

Wie bereits in dieser Arbeit angeführt wurde die Intensität der Antikörperfärbung, erkennbar als braune Zellen, mit „+“-Zeichen zum Ausdruck gebracht. Je intensiver die Antikörperfärbung war, umso mehr „+“-Zeichen erhielt das Präparat. Ein „+“-Zeichen stellte die niedrigste Stufe der Färbeintensität dar, während „+++“-Zeichen die stärkste Färbeintensität kennzeichnet (Abb. 3.14).

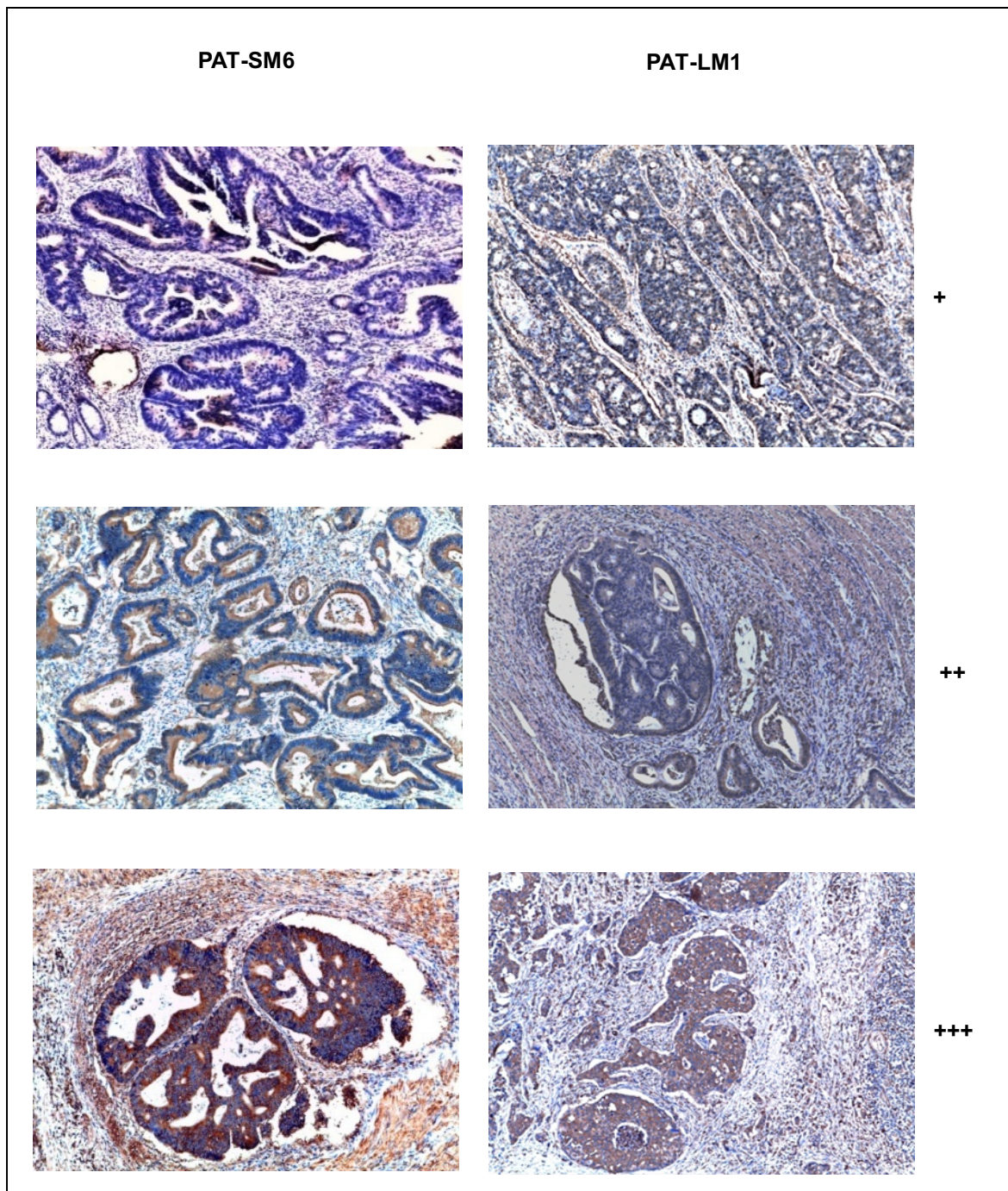


Abb. 3.14: Darstellung der verschiedenen Färbeintensitäten von PAT-SM6 Antikörper anhand von histologischen Präparaten des Kolonkarzinoms (mikroskopische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung)

3.5 Vergleich von PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern anhand der Tumorzellfärbung

3.5.1 Analyse der Anzahl gefärbter Tumorzellen

Das Färbeverhalten von PAT-SM6 und PAT-LM1 wurde anhand der Anzahl positiv gefärbte Tumorzellen miteinander verglichen. Mittels eines T-Tests wurde der Unterschied verdeutlicht. In der Gruppe 1 (0%-50% Tumorzell-bindung) ergab sich ein P-Wert von 0,77, somit war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Antikörperfärbungen festzustellen. Ebenso zeigte sich in der Gruppe 2 (60%-85% Tumorzellbindung) mit einem P-Wert von 0 kein signifikanter Unterschied. Die Differenz zwischen PAT-SM6 und PAT-LM1 war umso geringer, je weniger Tumorzellen eines Paraffinschnittes durch den jeweiligen Antikörper gefärbt waren. Allerdings war die Gruppe 4 (über 95% Tumorzellbindung) in beiden Antikörpern am häufigsten vertreten. Das ist auf eine starke Affinität von PAT-SM6 und PAT-LM1 für Tumorzellen zurückzuführen ist. Ein feiner Unterschied ließ sich zwischen den beiden Antikörpern dennoch feststellen. In den meisten Paraffinschnitten wurde 90% bis 95% der Tumorzellen durch PAT-LM1 gefärbt, während PAT-SM6 über 95% der Tumorzellen positiv färbte. Des Weiteren zeigte PAT-SM6 eine stärkere Bindung an Zellen der Metastasen, die insbesondere durch den Vergleich zwischen Primärtumor und Lebermetastasen deutlich wurde (Abb.3.15).

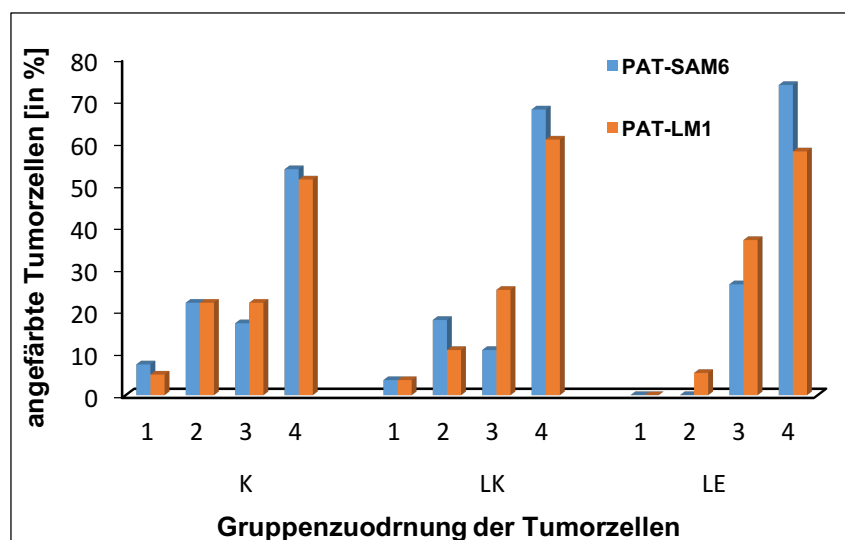


Abb. 3.15: Vergleich des Färbeverhaltens zwischen PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern

3.5.2 Analyse der Färbeintensität der Tumorzellen

Der Vergleich zwischen PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern hinsichtlich ihrer Färbeintensität von Gewebsschnitten ermöglicht die Analyse des Färbeverhaltens von beiden Antikörpern. Dabei wurden sowohl der Primärtumor als auch seine Metastasen in die Untersuchung eingeschlossen. Interessanterweise zeigten die Zellen des Primärtumors und der zugehörigen Metastasen eine besonders intensive Färbung (+++) durch PAT-SM6, wohingegen PAT-LM1 die Tumorzellen aller drei Gewebstypen überwiegend mit einer mittleren Intensität (++) färbte. Durch die Anwendung eines T-Tests wurde bei der geringen Färbeintensität (+) mit einem P-Wert von 0,211 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Antikörpern festgestellt. Jedoch wurde die Differenz beider Antikörper mit zunehmender Färbeintensität deutlich. In mittlerer Färbeintensität (++) unterschied sich der PAT-LM1 Antikörper mit einem P-Wert von 0,006 sehr stark vom Färbeverhalten von PAT-SM6. In der stärksten Färbeintensität (+++) ist ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen PAT-LM1 und PAT-SM6 Antikörpern festzustellen (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Hier betrug der P-Wert 0,025.

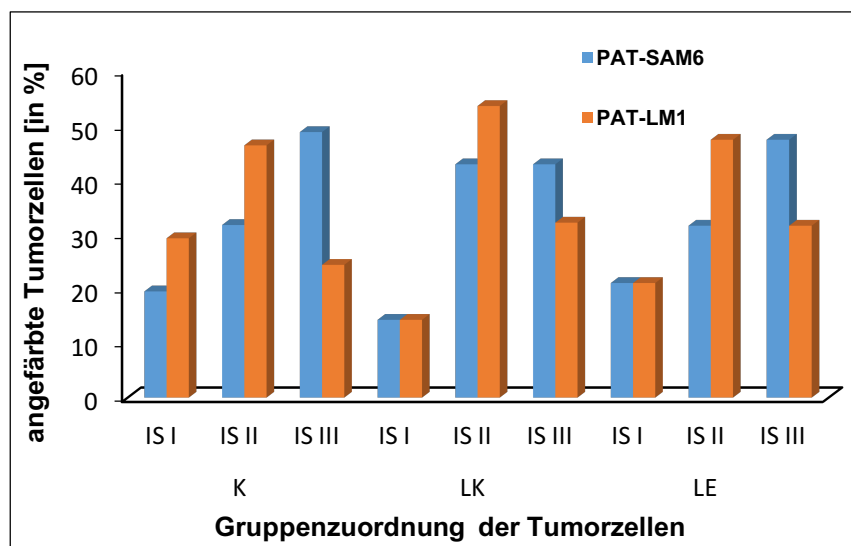


Abb. 3.16: Vergleich zwischen PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern anhand der Intensität (IS) angefarbter Tumorzellen

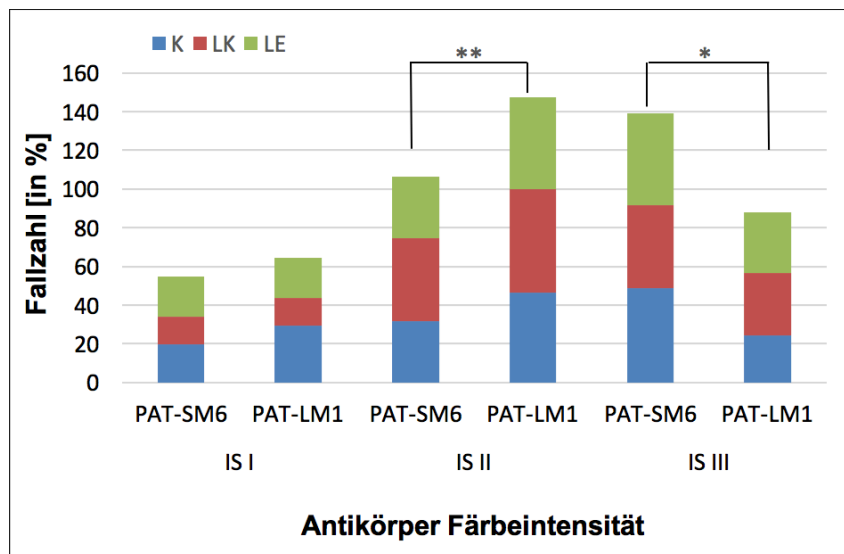


Abb. 3.17: Vergleich der Färbeintensität (IS) von PAT-SM6 mit PAT-LM1 Antikörpern (* P = 0,025, ** P = 0,006)

Abkürzung: Kolonkarzinom (K), Lymphknotenmetastase (LK), Lebermetastase (LE).

3.6 Analyse der Korrelation der immunhistochemischen Ergebnisse mit Patientendaten

3.6.1 Korrelation der Anzahl gefärbter Tumorzellen mit dem Überleben der Patienten

Aus dem Tumorregister des Universitätsklinikums Würzburg konnten 41 Patientenfälle in die Arbeit eingeschlossen werden. 39 Patienten wiesen vollständige Verlaufsdaten auf. In zwei Fällen wurde der Zeitpunkt der letzten klinischen Verlaufskontrolle nicht dokumentiert. Folglich mussten sie aufgrund fehlender Erfassung der Patientendaten aus der statistischen Verlaufsanalyse ausgeschlossen werden.

Zunächst wurde der Zeitpunkt der letzten Verlaufskontrolle am Universitätsklinikum Würzburg festgehalten. Von ursprünglich 39 Patienten sind 24 Patienten im Verlauf der klinischen Beobachtung verstorben. Bei genauer Betrachtung der Primärtumore, Lymphknoten- und Lebermetastasen dieser

Patientengruppe konnte festgestellt werden, dass von allen drei Gewebstypen mehr als 95 Prozent der Tumorzellen eines Paraffinschnittes durch PAT-SM6 positiv gefärbt waren. Die am zweithäufigsten vorkommende Gruppe war die Gruppe 2 mit einer 60 bis 85 prozentigen Antikörperfärbung der Tumorzellen pro Paraffinschnitt. Für die Färbung mit PAT-LM1 konnte ein vergleichbares Verteilungsmuster ermittelt werden.

Als Nächstes galt herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen der Anzahl gefärbter Tumorzellen und dem Patientenüberleben bestand. Dafür wurden die 15 Patientenfälle überprüft, die zum Zeitpunkt der letzten klinischen Kontrolle noch gelebt haben. Davon hatten 10 von insgesamt 15 Patienten eine Fernmetastase in der Leber. Einer von 15 Patienten besaß eine Fernmetastase außerhalb der Leber. Nur vier von 15 Patienten hatten einen Primärtumor ohne Metastasen. Die Patientendaten wurden mit den entsprechenden Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen in Kontext gesetzt. Das Ergebnis zeigte, dass die meisten Patienten zum Zeitpunkt der letzten klinischen Verlaufskontrolle eine mehr als 95 prozentige Tumorzellfärbung durch PAT-SM6 aufzeigten. Dies bedeutet, dass die Mehrzahl der Patienten, die zu jenem Zeitpunkt noch lebten, der Gruppe 4 zugeordnet werden konnten. In den übrigen sechs Fällen ist die Patientenverteilung zwischen der Gruppe 2 und 3 ausgeglichen. Für die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper PAT-LM1 wurde eine ähnliche Gruppenverteilung nachgewiesen. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass eine hohe Anzahl gefärbter Tumorzellen durch einen der beiden Antikörper nicht im Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten stand.

3.6.2 Vergleich der Färbeintensität mit dem Überleben der Patienten

Um eine Korrelation zwischen Färbeintensität und dem Patientenüberleben zu ermitteln, wurde die Intensität der immunhistochemischen Färbungen von verstorbenen versus lebenden Patienten analysiert. Interessanterweise stellte sich für die Antikörperfärbung mit PAT-LM1 heraus, dass Tumorzellen von Patienten, die während der klinischen Verlaufskontrolle verstorben sind,

überwiegend eine mittlere Färbeintensität aufwiesen. Diese Feststellung traf sowohl auf den Primärtumor als auch seine Metastasen zu. Davon abzugrenzen war der Primärtumor der lebenden Patienten. Diese zeigten eine Farbintensität in allen Abstufungen und somit ein heterogenes Färbeverhalten mit dem PAT-LM1 Antikörper. Die Ergebnisse der PAT-SM6 Antikörperfärbung stachen durch ein konträres Färbeverhalten im Vergleich zu PAT-LM1 hervor. Denn die Kolonkarzinome von sowohl verstorbenen als auch lebenden Patienten waren zum Zeitpunkt der letzten Kontrolluntersuchung durch PAT-SM6 Antikörper überwiegend sehr stark gefärbt (+++). Im Gegensatz dazu konnte für die Lymphknoten- und Lebermetastasen kein einheitliches Färbeverhalten mit dem PAT-SM6 Antikörper nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd gilt festzuhalten, dass eine mittlere Färbeintensität mit dem Antikörper PAT-LM1 bei verstorbenen Patienten häufig anzutreffen war, während für lebende Patienten keine einheitliche Aussage anhand der Immunhistochemie möglich war. Im Gegensatz dazu neigte der PAT-SM6 Antikörper in beiden Patientenkollektiven zu einem intensiveren Färbeverhalten.

3.6.3 Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Von allen 41 Patientenfällen wurde die immunhistochemische Färbung hinsichtlich der Anzahl und Intensität der Tumorzellen mit dem Lebensalter der Patienten bei der Erstdiagnose des Kolonkarzinoms verglichen. Dabei stellte sich für den Primärtumor heraus, dass Patienten zwischen 65-74 und 75-84 Jahren ein heterogenes Verhalten hinsichtlich Anzahl der gefärbten Tumorzellen durch den PAT-SM6 Antikörper aufzeigten. Für die Antikörperfärbung des Primärtumors mit PAT-LM1 Antikörpern wurde ein vergleichbares Ergebnis festgestellt. Die Lebermetastasen zeigten jedoch einen Unterschied zwischen Antikörperfärbungen mit PAT-SM6 oder PAT-LM1 in Hinblick auf das Patientenalter bei Erstdiagnose. Die höchste Anzahl an PAT-SM6 gefärbten Tumorzellen in Lebermetastasen wurde in der Altersgruppe 65-74 Jahren erzielt, während PAT-LM1 in der Altersgruppe 75-84 Jahren eine maximale Anzahl von

positiv gefärbten Tumorzellen aufwies. Bei Patienten, die jünger als 65 Jahren waren, ergab sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Lebensalter der Patienten und der Tumorzellfärbung.

Als nächster Schritt galt herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen Färbeintensität und Patientenalter bei der Erstdiagnose besteht. Der PAT-SM6 Antikörper zeigte in der Altersgruppe 55-64 Jahre eine mittelstarke Färbung. Diese Feststellung traf sowohl auf Tumorzellen des Primärtumors als auch auf die Metastasen zu. Hingegen variierte mit zunehmendem Lebensalter die Intensität der Antikörperfärbung. Der Primärtumor und die Lymphknotenmetastasen von Patienten zwischen 65-74 Jahren wiesen eine starke Färbung auf. Dagegen war die Färbeintensität von Lebermetastasen in dieser Altersgruppe stark variabel. In der Altersklasse zwischen 75-84 Jahren wurden Tumorzellen unabhängig vom Gewebetypus meist stark gefärbt. Für die Antikörperfärbung mit PAT-LM1 konnte kein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden.

3.6.4 Vergleich des TNM-Stadiums mit den Ergebnissen der Antikörperfärbungen

Mit der letzten Datenanalyse soll heraus gefunden werden ob eine Korrelation zwischen den unterschiedlichen TNM-Stadien des Tumors und den Ergebnissen der Antikörperfärbung existierte. Von den 41 Patientenfällen befand sich der Primärtumor überwiegend im T3- bzw. T4-Stadium, d.h., dass der Tumor entweder die Subserosa (T3) oder weitere Nachbarorgane wie beispielsweise das Peritoneum (T4), infiltriert hatte. Das N-Stadium erstreckte sich in dieser Arbeit von keinem Tumorbefall der regionalen Lymphknoten (N0), Tumorbefall in einem bis drei regionalen Lymphknoten (N1), Tumorbefall in vier oder mehr regionalen Lymphknoten (N2) bis hin zum Lymphknotenbefall entlang der Bauchgefäße. Als Resultat dieser Studie wurde festgestellt, dass Tumorzellen eines Primärtumors im T3N1-Stadium über 95% mit PAT-SM6 Antikörper gefärbt wurden. Diese zeigten darüber hinaus die höchste Färbeintensität (+++). Dagegen wurden 60% bis 85% der Zellen von Kolonkarzinomen im T4N2-Stadium durch PAT-SM6 gefärbt. Diese Tumorzellen zeigten außerdem eine

mittlere Färbeintensität. Ein ähnliches Färbeverhalten wurde bei den Lymphknotenmetastasen festgestellt. Während die Anzahl der von tumorbefallenen Lymphknoten anstieg, nahm die Tumorzellfärbung durch PAT-SM6 sowohl in Anzahl als auch in Intensität ab. Dabei waren die Zellen eines Tumor im T3N1-Stadium intensiver und häufiger durch PAT-SM6 gefärbt als ein Tumor im T3N2-Stadium. Für die Antikörperfärbung mit PAT-LM1 wurde diese Tendenz nicht festgestellt. Als Schlussfolgerung gilt festzuhalten, dass die Anzahl und Intensität der Antikörperfärbung je nach TNM-Stadien des Primärtumors variierte. Ein einheitlicher Trend ließ sich jedoch nicht feststellen.

IV. Diskussion

4.1 Übersicht

Im Mittelpunkt dieser Studie stand die immunhistochemische Analyse der monoklonalen IgM-Antikörper PAT-SM6 und PAT-LM1. Hierfür wurden Paraffinschnitte von primärem Kolonkarzinomen, nodulären und/oder hepatischen Metastasen von 41 Patienten des Universitätsklinikums Würzburg immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. Das Ziel dieser Arbeit war das Verhalten der beiden Antikörper in Hinblick auf die Färbeintensität und die Anzahl der gefärbten Tumorzellen zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigten anhand der Anzahl gefärbter Tumorzellen eine starke Bindung beider Antikörper. Diese war unabhängig davon, ob es sich um einen Primärtumor oder eine Metastase handelte. Die Analyse der Färbeintensität ergab deutlich signifikante Unterschiede zwischen beiden Antikörpern. Dabei zeigte der PAT-SM6 Antikörper eine stärkere Färbung der Tumorzellen, während die Tumorzellen durch PAT-LM1 Antikörper überwiegend in mittlerer Intensität gefärbt wurden. Der Vergleich immunhistochemischer Färbeergebnisse mit Patientendaten ergab einen tendenziellen Anstieg an Anzahl und Intensität der Antikörperfärbung hinsichtlich des zunehmenden Patientenalters. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Patientenüberleben und den Daten der immunhistochemischen Färbungen konnte in dieser Studie jedoch nicht eindeutig festgestellt werden. Ebenso scheint das TNM-Stadium des Tumors in keiner direkten Korrelation mit den Ergebnissen der Antikörperfärbung zu stehen. Wie auch in den vorausgegangenen Arbeiten wurde anhand der Immunhistochemie deutlich, dass PAT-LM1 und PAT-SM6 Antikörper spezifisch mit Tumorzellen, nicht aber mit gesunden Epithelzellen interagierten.

4.2 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt nach Mamma- und Zervix-Karzinomen bei Frauen und Lungen- und Prostata-Karzinomen bei Männern zu den dritthäufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. Für die Entstehung von KRK werden exogene und endogene Risikofaktoren verantwortlich gemacht. Chronische Entzündungen des Dickdarmepithels stellen eine der wichtigsten endogenen Risikofaktoren dar. Beispielsweise führt die Familiäre Adenomatosis Polyposis (FAP) zur Entstehung von multiplen Dickdarmpolypen im jungen Erwachsenenalter. Im Laufe der Jahre können die Dickdarmpolypen eine zunehmende Entartungstendenz aufzeigen und das Risiko eines KRK erhöhen (Burt et al, 1990).

4.3 Tiefeninvasion und Metastasierung des Kolonkarzinoms

Maligne Tumore zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung in gesundes Gewebe aus. Dabei ist das Zusammenspiel zwischen Tumor- und angrenzenden Stroma-Zellen von großer Bedeutung. Um die Vorgänge der Tumorzelleninvasion besser zu verstehen, untersuchten Bassi und Kollegen die extrazelluläre Matrix der Tumorumgebung. Die Autoren fanden, dass eine Kollagenmutation von Typ 4 in den Zellen vorlag, welche eine Zerstörung der Basalmembranintegrität verursachte. Dadurch wurde die Migration von Tumorzellen in das umliegende Gewebe erleichtert. Sobald die Basalmembran durchbrochen war, handelte es sich per Definition um ein invasives Karzinom (Bassi et al, 2005). Die Metastasierung von Tumorzellen in ein anderes Organ stellt einen weiteren wichtigen Schritt der Tumorausbreitung dar. Hierfür werden Blut- und Lymphgefäße als Transportmedium für die Tumorzellen genutzt. Des Weiteren sind Tumorzellen in der Lage, die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) oder Lymphgefäßen (Lymphangiogenese) zu induzieren, indem sie durch gesteigerten Energieverbrauch eine Hypoxie in der Umgebung erzeugen, die ihrerseits den Anstieg des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) auslöst (Egeblad et al, 2010). Stacker und Kollegen fanden, dass VEGF-D, ein Subtyp des VEGFs, die Fähigkeit besaß,

die Lymphangiogenese anzustoßen. Die Tumorzellen wurden über die neu entstandenen Lymphgefäße in die nächste Lymphknotenstation transportiert, wo sie sich in das gesunde Gewebe einnisteten (Seeding) und dort als Lymphknotenmetastase (primäre Metastasierung) heranwuchsen (Stacker et al, 2001). Des Weiteren löste die Bindung von VEGF an den VEGF-2-Rezeptor der endothelialen Zellen eine Signalkaskade aus, die schließlich in die Bildung neuer Blutgefäße mündete. Im Gegensatz zu Blutgefäßen im gesunden Gewebe befanden sich die neuen Gefäße überwiegend im dilatierten Zustand (Bergers & Benjamin, 2003), wodurch der Blutfluss verlangsamt und das Thromboserisiko gesteigert wurde. Darüber hinaus besaßen Blutgefäße in der Tumorumgebung einen schlecht differenzierten Gefäßwandaufbau. Dieser führte zur gesteigerten Gefäßpermeabilität für intravasale Flüssigkeit und Proteine (Bergers & Benjamin, 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde der Übertritt von Tumorzellen aus der Blutbahn ins umliegende Gewebe erleichtert. Um in einem gesunden Organ überleben zu können (sekundäre Metastasierung), müssen Tumorzellen mit Zellen von gesunden Geweben interagieren. Zvibel und Kollegen untersuchten den Einfluss von gesundem Lebergewebe auf Tumorzellen und fanden, dass insbesondere Tumorzellen mit ausgeprägtem Metastasierungspotenzial durch das gesunde Lebergewebe in ihrer Expansion unterstützt wurden. Im Gegensatz dazu wurden Tumorzellen, die eine schwache Metastasierungstendenz aufzeigten, kaum durch das umliegende Lebergewebe in ihrem Wachstum beeinflusst (Zvibel et al, 2000). Grimm und Kollegen zeigten in Ihrer Arbeit, dass maligne Zellen die Fähigkeit besaßen sich der Elimination durch das körpereigene Immunsystem zu entziehen. Zum Beispiel wurde der MHC-Klasse-I-Komplex durch Tumorzellen herunterreguliert. Die Anzahl von Rezeptoren, wie TRAIL und FAS, die in der Zellapoptose eine Rolle spielen, nahm ab. Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass das Verhältnis zwischen den T-Helferzellen zu Gunsten von Th2-Helferzellen hochreguliert wurde. Die Th2-Helferzellen produzierten unter anderem Interleukin-4 und -5 (IL-4 und -5), die wiederum den Tumorprogress unterstützten (Grimm et al, 2010). Vidal et al. zeigten, dass die Tumorzellen die erworbene Immunität in gesundem Lebergewebe hemmten, um das eigene Überleben und Wachstum zu sichern. Insbesondere war der TGF- β Inhibitor

BAMBI in ca. der Hälfte der metastasierten Primärtumore und Metastasen stärker exprimiert als in Tumoren ohne Metastasen. Des Weiteren fanden die Autoren, dass eine erhöhte Konzentration an BAMBI mit einem stärkeren Metastasierungspotenzial in Lymphknoten und Leber assoziiert war (Vidal-Vanaclocha, 2011). Auf diesen Ergebnissen aufbauend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Kolonkarzinome, die Lebermetastasen aufweisen, ein anderes Rezeptorprofil und dadurch möglicherweise ein stärkeres Malignitätspotenzial besitzen als Kolonkarzinome ohne Lebermetastasen.

4.4 Therapiemöglichkeiten von Kolonkarzinomen und deren Limitationen

Zur Behandlung von Kolonkarzinomen sind in den letzten 10 Jahren umfangreiche Studien durchgeführt worden. Insbesondere ist die Antikörpertherapie im Sinne einer zielgerichteten Behandlung immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Dennoch bleibt die vollständige chirurgische Tumorresektion mit mikroskopisch nachgewiesener Tumorfreiheit (R0-Resektion) der therapeutische Goldstandard. Die Empfehlung zur Einleitung einer adjuvanten Chemotherapie hängt vom UICC-Stadium des Tumors ab. Patienten mit Kolonkarzinomen im UICC-Stadium III wird nach der vollständigen chirurgischen Tumorresektion eine adjuvante Chemotherapie nach dem FOLFOX-Schema (5-Floururacil, Folinsäure und Oxaliplatin) empfohlen. In einer klinischen Studie wurde im Vergleich zu Patienten der Kontrollgruppe, bei der eine alleinige chirurgische Tumorresektion durchgeführt wurde, ein signifikanter Überlebensvorteil von Patienten nachgewiesen, die nach der Operation eine adjuvante Chemotherapie erhielten (Schmiegel et al, 2008). Im Gegensatz dazu wird der Einsatz adjuvanter Chemotherapie bei Patienten mit Kolonkarzinomen im UICC-Stadium II immer noch kontrovers diskutiert (Gill, 2014). Die Studie von Morse und Kollegen zeigte eine minimale Besserung des „Disease Free Survival“ (DFS), jedoch keinen Anstieg des „Overall Survival“ (OAS), bezogen auf eine Beobachtungsdauer von 5 Jahren (Morse et al., 2005). Andererseits soll die Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie bei Kolonkarzinomen im

UICC-Stadium II dann ausgesprochen werden, wenn es sich um eine „Risikosituation“ handelt. Unter „Risikosituation“ werden Notfalloperationen, Tumorperforation oder -einriss während der Operation, Tumore im T4-Stadium oder ein unzureichend untersuchter Lymphknotenstatus mit weniger als 12 Lymphknoten verstanden (Morse, 2005; Schmiegel et al, 2008; Gill, 2014). Es wird davon ausgegangen, dass bei diesen Patienten das Risiko für die Bildung von Mikrometastasen erhöht ist, so dass die adjuvante Chemotherapie dem entgegen wirken soll. Dennoch bleibt die Durchführung der adjuvanten Chemotherapie bei Kolonkarzinomen im UICC-Stadium II eine individuelle Therapieentscheidung, die ein ausführliches Patientengespräch über die Vorteile und Nebenwirkungen der Behandlung voraussetzt.

Eine weitere Herausforderung bei der Therapie von Kolonkarzinomen stellen Lebermetastasen dar. Die komplette Resektion von Lebermetastasen mit einer mikroskopisch nachgewiesenen Tumorfreiheit (R0-Resektion) gilt nach wie vor als die wichtigste Voraussetzung für einen kurativen Therapieansatz. Allerdings kann das restliche Lebergewebe eine Lokalrezidivrate bis zu 75% aufweisen (Zhang & Song, 2014). Somit stellt sich die Frage, ob eine adjuvante Therapie zur Senkung der Rezidivrate führen kann. Eine einheitliche Therapieempfehlung nach R0-Resektion von Lebermetastasen existiert allerdings noch nicht. Zwar bewirkt die adjuvante Chemotherapie nach dem FOLFOX4-Regime eine Verbesserung des „Progress Free Survival“ (PFS), jedoch erbrachte sie im Vergleich zur alleinigen chirurgischen Entfernung der Metastase keinerlei Vorteile hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Zhang & Song, 2014). Die Anwendung von Chemotherapie nach dem FOLFIRI-Schema (5-Fluoruracil, Folinsäure und Irinotecan) ist aufgrund des negativen Resultats in der Phase III Studie nicht zu empfehlen. Neben der systemischen Chemotherapie besteht die Möglichkeit, diese lokal zu applizieren. Dazu zählt die „Hepatische Arterielle Infusion“ (HAI). Floxuridine werden dabei über ein Pumpsystem in die Leberarterie injiziert und dort in sein Endprodukt, das 5-Fluoruracil, metabolisiert. Durch die Kombination von systemischer Chemotherapie und HAI konnte in einigen Studien eine Besserung des PFS belegt werden. Allerdings konnte nur in einer Studie eine Besserung des OAS festgestellt werden (Ota et al, 1999). Nicht zu vernachlässigen sind dabei die medikamentösen

Nebenwirkungen durch die HAI, wie z. B. die biliäre Sklerose (Ito et al, 2012), sowie technisch bedingte Komplikationen, wie eine Katheterdislokation (Heinrich et al, 2003). Darüber hinaus stellt die Implantation des Pumpsystems einen chirurgischen Eingriff dar, dessen Erfolg sehr von der Expertise des Operateurs abhängt (Allen et al, 2005). Dennoch scheint es möglich, dass Patienten mit einer hohen Rezidivrate oder einem Residualtumor der Leber von einer HAI in Kombination mit systemischer Chemotherapie profitieren (Zhang & Song, 2014). Die Wirkung von Bevacizumab (Avastin®) in Kombination mit HAI und einer systemischen Chemotherapie wurde anhand einer randomisierten Phase-II-Studie untersucht. Das Ergebnis erbrachte bei einer Beobachtungsdauer von 4 Jahren keine Zunahme des „Recurrence Free Survival“ (RFS). Im Gegensatz dazu stellten die Autoren eine steigende biliäre Toxizität durch die Kombinationstherapie fest. Insgesamt schienen die Patienten von dieser Therapieoption nicht zu profitieren (Kemeny et al, 2011).

4.5 PAT-LM1 Antikörper und NONO^{PAT-LM1}

PAT-LM1 ist ein humaner monoklonaler Antikörper der IgM-Klasse, der von einem an Lungenkarzinom erkrankten Patienten isoliert wurde (Brändlein et al, 2003a). Als Bindungsstelle für den PAT-LM1 Antikörper wird NONO^{PAT-LM1} auf der Tumorzelloberfläche angesehen. Hierbei handelt es sich um ein tumorspezifisches Epitop des CFR-1/PAM-1 Rezeptors, welches vor allem auf Zellen von epithelialen Karzinomen, nicht aber auf gesunden Zellen, exprimiert wird (Brändlein et al, 2003a; Vollmers & Brändlein, 2007). In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen von Kolonkarzinomen und zugehörigen Lymphknoten- und Lebermetastasen durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben, dass nahezu alle Tumorzellen eines Paraffinschnittes durch PAT-LM1 Antikörper gefärbt werden konnten. Die meisten Tumorzellen besaßen eine mittelstarke Färbeintensität. Somit kann die immunhistochemische Färbung der Präparate durch PAT-LM1 Antikörper als ein (indirekter) Nachweis für die Existenz von NONO^{PAT-LM1} verstanden werden. Interessanterweise konnte ein Färbeunterschied zwischen dem Primärtumor und seiner Metastasen

beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass die Zellen der Metastasen sowohl in der Anzahl als auch in der Intensität durch den PAT-LM1 Antikörper noch stärker angefärbt wurden als der Primärtumor. Diese Feststellung ist ein Hinweis darauf, dass Metastasen im Vergleich zum Primärtumor eine höhere Dichte von NONO^{PAT-LM1} auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Eine plausible Erklärung hierfür ist der intrazelluläre Wirkmechanismus von NONO, ein Protein der DBHS-Familie (*Drosophila melanogaster* Behaviour Human Splicing). In der Arbeit von Passon und Mitarbeitern wiesen die Autoren nach, dass DHBS-Proteine das Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung unterstützen (Passon et al, 2012). Somit kann eine erhöhte Dichte an NONO^{PAT-LM1} auf Metastasen, welche anhand der immunhistochemischen Färbungen mit PAT-LM1 Antikörper nachgewiesen wurden, als ein Beleg für die intrazelluläre Veränderung der Tumorzellen verstanden werden.

4.6 PAT-SM6 Antikörper und GRP78^{PAT-SM6}

Einige Autoren beobachteten in ihren experimentellen Arbeiten, dass Tumorzellen von Brust- und Prostatakarzinomen im Vergleich zu gesunden Zellen eine erhöhte Expression an „Glucose-Related Protein“ (GRP)-78 zeigten. Dabei kann der Anstieg von GRP78 im endoplasmatischen Retikulum als Antwort auf den tumorbedingten zellulären Stress verstanden werden (Lee, 2007). Als Ursachen wurden sowohl die durch den gesteigerten Energieverbrauch induzierte Hypoxie der Tumorumgebung als auch der erhöhte Glukoseverbrauch durch den Tumor selbst verantwortlich gemacht (Lee, 2007; Ni et al, 2011).

In dieser Arbeit wurde die Überexpression von GRP78^{PAT-SM6} - ein Isotyp des GRP78 - anhand immunhistochemischen Färbungen auf Paraffinschnitten von Kolonkarzinomen und zugehörigen Lymphknoten- und Lebermetastasen untersucht. Dabei diente der neue IgM-Antikörper PAT-SM6 als Ligand für GRP78^{PAT-SM6}. Interessanterweise zeigten Tumorzellen der Lebermetastasen im Vergleich zu Tumorzellen der Kolonkarzinome eine stärkere Affinität gegenüber PAT-SAM6, so dass sie einen deutlichen Unterschied zum Färbeverhalten des

Primärtumors aufwiesen. Diese Feststellung wird durch das Ergebnis von Lee und Kollegen unterstützt, die in Ihrer Arbeit mit Zellen von Prostata-karzinomen experimentierten. Die Autoren zeigten, dass Zelllinien mit Metastasen im Vergleich zum Primärtumor eine stetig steigende GRP78-Konzentration aufwiesen. Insbesondere wurde eine sehr hohe Konzentration an GRP78 in schnell metastasierenden Tumorzellen nachgewiesen. Dort fand sich GRP78 auf der Zelloberfläche und übernahm die Funktion eines Rezeptors. Die Bindung von α -Mikroglobulin an den GRP78-Rezeptor aktivierte PAK-2, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wurde, die schließlich in Migration und Invasion von Tumorzellen mündete (Lee, 2007).

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht anhand der immunhistochemischen Färbungen mit PAT-SM6 Antikörper, dass GRP78^{PAT-SM6} häufiger in Lebermetastasen vorkommt als im primären Kolonkarzinom, da die Lebermetastasen durch den Antikörper intensiver angefärbt wurden. Möglicherweise ist die steigende GRP78^{PAT-SM6}-Konzentration ein Hinweis auf die zelluläre Veränderung der Metastasen, die zugleich auf eine zunehmende Malignität der Zellen hindeutet. Diese Eigenschaft kann nun durch die Antikörperfärbung mit PAT-SM6 optisch dargestellt werden.

4.7 PAT-LM1 als ein möglicher prognostischer Faktor für das Patientenüberleben

Es stellt sich nun die Frage, ob eine hohe Dichte an GRP78^{PAT-SM6} oder NONO^{PAT-LM1} in Tumorzellen auch einen prognostischen Faktor für das Überleben der Patienten darstellt. Dabei wurden beide Antikörper anhand der Zahl und Intensität angefärbter Tumorzellen von lebenden bzw. verstorbenen Patienten einzeln untersucht. Es ergab anhand der PAT-SM6 Antikörperfärbung kein eindeutiger positiver Trend hinsichtlich des Patientenüberlebens. Es zeigte sich, dass sowohl die Anzahl als auch die Färbeintensität der Tumorzellen nicht in Relation zur Überlebenschance der Patienten stand.

Im Gegensatz dazu scheint eine Korrelation zwischen der Zahl der angefärbten Tumorzellen durch den PAT-LM1 Antikörper und der Patientenmortalität zu

existieren. Insbesondere zeigte die PAT-LM1 Antikörperfärbung der Lebermetastasen, dass die verstorbenen Patienten eine höhere Anzahl an gefärbten Tumorzellen aufwiesen als lebende Patienten. Eine Erklärung hierfür ist, dass die erhöhte Anzahl an NONO^{PAT-LM1}-Epitopen mit einem erhöhten Potenzial an Tumorprogression verbunden ist (Passon et al, 2012). Dies scheint auch eine der limitierenden Faktoren für das Patientenüberleben zu sein. Des Weiteren fanden Tsofack und Mitarbeiter, dass niedrige NONO-Konzentrationen mit einer gesteigerten Sensitivität von Kolonkarzinomen gegen Oxaliplatin vergesellschaftet sind (Tsofack et al, 2011). Möglicherweise kann diese Eigenschaft zukünftig bei Patienten mit Kolonkarzinom und Metastasen im klinischen Alltag eingesetzt werden, indem mit Hilfe von PAT-LM1 Antikörper die Konzentrationsbestimmung an NONO vor der Therapie stattfindet, um eine Einschätzung der therapeutischen Wirkung von Oxaliplatin zu ermöglichen. Die Bestimmung eines Rezeptorstatus vor dem Therapiebeginn hat bereits Einzug in die Behandlung einiger Krebserkrankungen gehalten. Als bekanntes Beispiel ist der HER2/neu-Rezeptor bei Mammakarzinom zu nennen. Zwar bedeutet ein positiver Rezeptornachweis eine schlechte Überlebenschance der Patientinnen, die jedoch durch die Antikörpertherapie mit Trastuzumab, welches sich an das HER2/neu-Rezeptor bindet, verbessert wird (Lianos et al, 2014). Folglich wäre es interessant und wichtig, wenn NONO^{PAT-LM1} durch PAT-LM1 Antikörper ausgeschaltet werden könnte, um das Leben der Patienten mit Lebermetastasen verlängern zu können.

4.8 PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörper als Therapeutikum zur Behandlung von Dickdarmkarzinom

Das Bestreben, natürliche IgM-Antikörper zur Behandlung von bösartigen Tumoren einzusetzen, ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Insbesondere stachen die Ergebnisse der klinischen Studien mit malignem Melanom und Multiplem Myelom (MM) hervor. In der Phase I/IIa Studie mit multiresistentem MM fanden die Autoren, dass durch die Therapie mit PAT-SM6 Antikörper ein „stable disease“ bei 33% der Probanden erreichen

werden konnte (Rasche et al, 2015). Die Pharmakokinetik und -dynamik von PAT-SM6 Antikörper wurde im Rahmen einer klinischen Studie mit dem Rezidiv eines in-transit Melanoms untersucht. Es wurde festgestellt, dass die kurze Halbwertszeit von 6 Stunden möglicherweise auf den Substanzabbau im Darm zurückzuführen war. Bei der *in-vivo* Studie wurde keine Antikörperbildung gegen den verabreichten PAT-SM6 Antikörper in den Probanden beobachtet. Eine Einzeldosisgabe vom PAT-SM6 Antikörper zwischen 0,15 bis 0,60 mg pro Kilogramm Körpergewicht wurde von den Probanden gut vertragen (Hensel et al, 2013). Außer in Melanomen wurde eine erhöhte GRP78-Epitop Konzentration in weiteren Tumorarten, wie Dickdarm-, Lunge-, Brust-, Magen-, und Speiseröhrenkrebs, nachgewiesen (Rauschert et al, 2008). Demnach stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit PAT-SM6 Antikörper bei Patienten mit Kolonkarzinom ebenfalls erfolgversprechende Ergebnisse erzielen würde. Dieser Gedanke wurde durch die Arbeit von Roller und Kollegen unterstützt. Darin konnten die Autoren zeigen, dass eine hohe GRP78-Expression mit zunehmender Therapieresistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika korreliert (Roller & Maddalo, 2013). In einer weiteren Arbeit wurde eine herabgesetzte Wirksamkeit von Doxorubicin gegenüber Burstkrebiszellen nachgewiesen, die eine erhöhte GRP78-Konzentration aufwiesen. Demzufolge sank auch das rezidivfreie Überleben der Betroffenen (Lee et al, 2011). Daraus resultiert die Vermutung, dass Kolonkarzinome, die eine hohe GRP78^{PAT-SM6}-Expression aufweisen, eine gesteigerte Resistenz gegen konventionellen Chemotherapeutika aufweisen könnten. Die immunhistochemische Färbung der Präparate mit PAT-SM6 Antikörper stellt somit eine Möglichkeit dar, um mehr Information über das Ausmaß der GRP78^{PAT-SM6}-Konzentration zu gewinnen und dadurch eine Einschätzung der Chemotherapie bezüglich der Tumorwirksamkeit und schließlich eine gezielte, dem Tumorprofil angepasste Therapie zu ermöglichen.

Sinnvoll wäre auch, den PAT-SM6 oder PAT-LM1 Antikörper zur Detektion von Mikrometastasen einzusetzen, da vor allem Mikrometastasen nach einer R0-Resektion der Lebermetastasen für die Lokalrezidive verantwortlich gemacht werden (Morse, 2005). Illert und Kollegen konnten bereits anhand eines Mausmodells zeigen, dass SC-1, ein weiterer IgM-Antikörper, sowohl im Blut als

auch im Knochenmark die Anzahl von disseminierten Tumorzellen eines Magenkarzinoms reduzieren konnte (Illert et al, 2005). In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde festgestellt, dass Lebermetastasen eine stärkere GRP78^{PAT-SM6}-Expression aufwiesen als das primäre Kolonkarzinom. Diese Eigenschaft macht den Einsatz von PAT-SM6 bei der Antikörpertherapie von Lebermetastasen besonders attraktiv. Einerseits bedeutet eine erhöhte Konzentration von GRP78^{PAT-SM6} auf Metastasen das Vorhandensein ausreichender Zielstrukturen für den PAT-SM6 Antikörper, andererseits ermöglicht der Einsatz von PAT-SM6 eine Tumorthherapie mit geringerem Nebenwirkungsprofil. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass GRP78^{PAT-SM6} auf Tumorzellen jedoch nicht auf gesunden Zellen exprimiert war. Durch die zielgerichtete Therapie können Zytostatika-assoziierte Nebenwirkungen, wie die periphere Neuropathie, Panzytopenie, Müdigkeit sowie Übelkeit und Erbrechen, reduziert (Saif & Reardon, 2005; Kurniali et al, 2014) und Lebensqualität und Compliance der Patienten während der Behandlung verbessert werden. Insbesondere sind ältere Patienten aufgrund ihrer Komorbidität im Vergleich zu jüngeren Patienten in der Behandlungsbreite eingeschränkt (Lieu et al, 2014; Kordatou et al, 2014). In der AVEX-Multizenterstudie wurde auf die Fragestellung eingegangen, ob eine zusätzliche Anwendung von Antikörpern zum Chemotherapeutikum ein Überlebensvorteil für ältere Patienten mit metastasierten Kolonkarzinomen hat. Als Ergebnis hielten die Autoren fest, dass die Kombination von Bevacizumab mit Capecitabine eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens ermöglichte (Cunningham et al, 2013). Die Autoren schlussfolgerten, dass die Kombinationstherapie eine gute Möglichkeit zur Behandlung metastasierter Kolonkarzinome von älteren Patienten darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden, dass Tumorzellen von Patienten ab dem 65. Lebensjahr eine ausgeprägte Antikörperbindung mit PAT-SM6 und PAT-LM1 aufwiesen. Möglicherweise könnte diese Eigenschaft in der Therapie von metastasierten Dickdarntumoren älterer Patienten von Vorteil sein.

Trotz einer Reihe interessanter Ergebnisse, die durch diese experimentelle Arbeit erbracht wurden, sind die Resultate mit Limitationen behaftet. Anzuführen

ist unter anderem die relativ kleine Fallzahl des Kollektivs mit insgesamt 41 untersuchten Patienten. Darüber hinaus wären weitere klinische Studien mit einer ausgewogenen Verteilung beider Geschlechter von Vorteil.

Die Analyse dieser immunhistochemischen Studie bestätigt die bisherigen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet und gibt gleichzeitig Anlass für weiterführende Untersuchungen mit den Antikörpern PAT-SM6 und PAT-LM1. Die tumorspezifische Bindung der IgM-Antikörper sowie ihre funktionelle Aktivität legen einen therapeutischen Einsatz nahe und könnten in Zukunft zur Behandlung von Kolonkarzinomen beitragen.

V. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt die dritthäufigste Tumorerkrankung weltweit dar. Die Risikofaktoren sind vielseitig und werden in exogene und endogene Faktoren eingeteilt. Eine wichtige Präventionsmaßnahme von Kolonkarzinom ist die komplette endoskopische Koloskopie, die ab dem 55. Lebensjahr empfohlen wird. Der Goldstandard zur Behandlung von Kolonkarzinom ist nach wie vor die chirurgische Tumorsektion mit mikroskopisch nachgewiesener Tumorfreiheit. Eine chirurgische Sanierung der Fernmetastasen, welche am häufigsten in der Leber vorkommen, ist bei betroffenen Patienten anzustreben. Eine adjuvante Chemotherapie wird je nach UICC-Stadium des Tumors durchgeführt. Im Gegensatz zur Behandlung einiger maligner Tumorerkrankungen ist der Einsatz von Antikörpern noch kein fester Bestandteil der Therapie von Kolonkarzinomen.

In dieser Arbeit wurde Untersuchungsmaterial von 41 Patienten mit Kolonkarzinom, die am Universitätsklinikum Würzburg in den Jahren 1997 bis 2012 behandelt wurden, analysiert. Dabei wurden Paraffinschnitte vom Primärtumor, regionalen Lymphknotenmetastasen und Lebermetastasen der einzelnen Patienten mit 2 verschiedenen monoklonalen IgM-Antikörpern, PAT-SM6 und PAT-LM1, gefärbt und mikroskopisch untersucht. Der Antikörper PAT-SM6 wurde aus einem an einem Magenkarzinom erkrankten Patienten isoliert und bindet an eine Isotyp-Form des 'Glucose-Related' Protein (GRP)-78^{PAT-SM6}. Als Zielstruktur des PAT-LM1 Antikörpers wurde eine tumorspezifische Form von NONO (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) identifiziert (NONO^{PAT-LM1}). Für beide Rezeptor-Isoformen wurde nachgewiesen, dass sie nur auf malignen epithelialen Zellen, nicht aber auf gesunden Zellen exprimiert werden. Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PAT-SM6 die Tumorzellen der Lebermetastasen stärker anfärbte als Zellen des Primärtumors. Für die PAT-LM1 Antikörperfärbung wurde ein ähnliches Resultat erzielt. In Bezug auf das Lebensalter der Patienten wiesen die Tumorzellen von älteren Patienten (ab dem 65. Lebensjahr) eine stärkere Antikörperbindung durch PAT-SM6 und PAT-LM1 auf. Interessant war auch die Feststellung, dass die

Tumorzellen der Lebermetastasen von verstorbenen Patienten durch PAT-LM1 stärker gefärbt waren, als die von zum Untersuchungszeitpunkt noch lebenden Patienten. Die Bindungsunterschiede zwischen PAT-SM6 und PAT-LM1 könnten neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten bei Kolonkarzinomen bieten und somit zukünftig eine individuelle Tumorthherapie ermöglichen.

VI Literaturverzeichnis

Allen PJ, Nissan A, Picon AI, Kemeny N, Dudrick P, Ben-Porat L, Espat J, Stojadinovic A, Cohen AM, Fong Y, Paty PB (2005) Technical complications and durability of hepatic artery infusion pumps for unresectable colorectal liver metastases: an institutional experience of 544 consecutive cases. *Journal of the American College of Surgeons* **201**: 57-65

Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, Tucker JP, Tekawa IS, Cuff T, Pauly MP, Shlager L, Palitz AM, Zhao WK, Schwartz JS, Ransohoff DF, Selby JV (2007) Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *Journal of the National Cancer Institute* **99**: 1462-1470

Arkenau HT, Bermann A, Rettig K, Strohmeyer G, Porschen R, Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale O (2003) 5-Fluorouracil plus leucovorin is an effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: long-term follow-up results of the adjCCA-01 trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **14**: 395-399

Bassi DE, Lopez De Cicco R, Cenna J, Litwin S, Cukierman E, Klein-Szanto AJ (2005) PACE4 expression in mouse basal keratinocytes results in basement membrane disruption and acceleration of tumor progression. *Cancer research* **65**: 7310-7319

Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* **3**: 401-410

Bingham SA, Hughes R, Cross AJ (2002) Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *The Journal of nutrition* **132**: 3522S-3525S

Boes M (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular immunology* **37**: 1141-1149

Brandlein S, Beyer I, Eck M, Bernhardt W, Hensel F, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2003a) Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer research* **63**: 2052-2061

Brandlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2003b) Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer research* **63**: 7995-8005

Brandlein S, Rauschert N, Rasche L, Dreykluft A, Hensel F, Conzelmann E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2007) The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Molecular cancer therapeutics* **6**: 326-333

Burt RW, Bishop DT, Lynch HT, Rozen P, Winawer SJ (1990) Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bulletin of the World Health Organization* **68**: 655-665

Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, Jonker D, Osborne S, Andre N, Waterkamp D, Saunders MP, investigators As (2013) Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology* **14**: 1077-1085

Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Gasmi M, Nanni I, Gaudart J, Garcia S, Ouafik L, Seitz JF, Milano G (2011) Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *Bmc Cancer* **11**: 496

Dasgupta P, Chellappan SP (2006) Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. *Cell cycle* **5**: 2324-2328

Denham LJ, Kerstetter JC, Herrmann PC (2012) The complexity of the count: considerations regarding lymph node evaluation in colorectal carcinoma. *Journal of gastrointestinal oncology* **3**: 342-352

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**: 526-535

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Dev Cell* **18**: 884-901

Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *The New England journal of medicine* **323**: 1228-1233

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* **127**: 2893-2917

Fox AH, Lamond AI (2010) Paraspeckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a000687

Galiatsatos P, Foulkes WD (2006) Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology* **101**: 385-398

Gill S (2014) Adjuvant therapy for resected high-risk colon cancer: Current standards and controversies. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology* **35**: 197-202

Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC (1995) Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* **122**: 327-334

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **1**: 1311-1318

Goss KH, Groden J (2000) Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**: 1967-1979

Grimm M, Gasser M, Bueter M, Strehl J, Wang J, Nichiporuk E, Meyer D, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Thalheimer A (2010) Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases. *Bmc Cancer* **10**: 82

Heinrich S, Petrowsky H, Schwinnen I, Staib-Sebler E, Gog C, El-Ganainy A, Gutt C, Muller HH, Lorenz M (2003) Technical complications of continuous intra-arterial chemotherapy with 5-fluorodeoxyuridine and 5-fluorouracil for colorectal liver metastases. *Surgery* **133**: 40-48

Hensel F, Eckstein M, Rosenwald A, Brandlein S (2013) Early development of PAT-SM6 for the treatment of melanoma. *Melanoma research* **23**: 264-275

Hurrell T, Outhoff K (2013) The in vitro influences of epidermal growth factor and heregulin-beta1 on the efficacy of trastuzumab used in Her-2 positive breast adenocarcinoma. *Cancer cell international* **13**: 97

Illert B, Otto C, Vollmers HP, Hensel F, Thiede A, Timmermann W (2005) Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Oncology reports* **13**: 765-770

Islam R, Chyou PH, Burmester JK (2013) Modeling efficacy of bevacizumab treatment for metastatic colon cancer. *Journal of Cancer* **4**: 330-335

Ito K, Ito H, Kemeny NE, Gonen M, Allen PJ, Paty PB, Fong Y, Dematteo RP, Blumgart LH, Jarnagin WR, D'Angelica MI (2012) Biliary sclerosis after hepatic arterial infusion pump chemotherapy for patients with colorectal cancer liver metastasis: incidence, clinical features, and risk factors. *Annals of surgical oncology* **19**: 1609-1617

Joosen AM, Kuhnle GG, Aspinall SM, Barrow TM, Lecommandeur E, Azqueta A, Collins AR, Bingham SA (2009) Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis* **30**: 1402-1407

Kemeny NE, Jarnagin WR, Capanu M, Fong Y, Gewirtz AN, Dematteo RP, D'Angelica MI (2011) Randomized phase II trial of adjuvant hepatic arterial infusion and systemic chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected hepatic metastases from colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**: 884-889

Kordatou Z, Kountourakis P, Papamichael D (2014) Treatment of older patients with colorectal cancer: a perspective review. *Therapeutic advances in medical oncology* **6**: 128-140

Lee AS (2007) GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer research* **67**: 3496-3499

Lee CS, Ronan L, O'Morain C, McNamara D (2012) Screening for colorectal cancer: what fits best? *Expert review of gastroenterology & hepatology* **6**: 301-312

Lee E, Nichols P, Groshen S, Spicer D, Lee AS (2011) GRP78 as potential predictor for breast cancer response to adjuvant taxane therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* **128**: 726-731

Lianos GD, Vlachos K, Zoras O, Katsios C, Cho WC, Roukos DH (2014) Potential of antibody-drug conjugates and novel therapeutics in breast cancer management. *OncoTargets and therapy* **7**: 491-500

Lieu CH, Renfro LA, de Gramont A, Meyers JP, Maughan TS, Seymour MT, Saltz L, Goldberg RM, Sargent DJ, Eckhardt SG, Eng C (2014) Association of Age With Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Analysis From the ARCAD Clinical Trials Program. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*

Mahipal A, Kothari N, Gupta S (2014) Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **21**: 74-79

Mendelsohn J, Baselga J (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **19**: 6550-6565

Morse MA (2005) Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future developments. *Clinics in colon and rectal surgery* **18**: 224-231

Nazato DM, Matos LL, Waisberg DR, Souza JR, Martins LC, Waisberg J (2009) Prognostic value of carcinoembryonic antigen distribution in tumor tissue of colorectal carcinoma. *Arquivos de gastroenterologia* **46**: 26-31

Ni M, Zhang Y, Lee AS (2011) Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *The Biochemical journal* **434**: 181-188

Ota M, Masui H, Tanaka K, Ichikawa Y, Yamaguchi S, Togo S, Ike H, Oki S, Shimada H (1999) [Efficacy of adjuvant hepatic arterial infusion chemotherapy following resection of colorectal liver metastases]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* **26**: 1698-1701

Passon DM, Lee M, Rackham O, Stanley WA, Sadowska A, Filipovska A, Fox AH, Bond CS (2012) Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 4846-4850

Pohle T, Brandlein S, Ruoff N, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2004) Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer research* **64**: 3900-3906

Rasche L, Duell J, Castro IC, Dubljevic V, Chatterjee M, Knop S, Hensel F, Rosenwald A, Einsele H, Topp MS, Brandlein S (2015) GRP78-directed immunotherapy in relapsed or refractory multiple myeloma - results from a phase 1 trial with the monoclonal immunoglobulin M antibody PAT-SM6. *Haematologica* **100**: 377-384

Rasche L, Duell J, Morgner C, Chatterjee M, Hensel F, Rosenwald A, Einsele H, Topp MS, Brandlein S (2013) The natural human IgM antibody PAT-SM6 induces apoptosis in primary human multiple myeloma cells by targeting heat shock protein GRP78. *PloS one* **8**: e63414

Rauschert N, Brandlein S, Holzinger E, Hensel F, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP (2008) A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **88**: 375-386

Roller C, Maddalo D (2013) The Molecular Chaperone GRP78/BiP in the Development of Chemoresistance: Mechanism and Possible Treatment. *Frontiers in pharmacology* **4**: 10

Rosenes Z, Mok YF, Yang S, Griffin MD, Mulhern TD, Hatters DM, Hensel F, Howlett GJ (2013) Simultaneous binding of the anti-cancer IgM monoclonal antibody PAT-SM6 to low density lipoproteins and GRP78. *PloS one* **8**: e61239

Saif MW, Reardon J (2005) Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Therapeutics and clinical risk management* **1**: 249-258

Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C (2008) [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* **46**: 799-840

Schmitz KR, Ferguson KM (2009) Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions. *Experimental cell research* **315**: 659-670

Segota E, Bukowski RM (2004) The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific. *Cleveland Clinic journal of medicine* **71**: 551-560

Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, Smith DB, Shepherd S, Maraveyas A, Ferry DR, Meade AM, Thompson L, Griffiths GO, Parmar MK, Stephens RJ, Investigators FT, National Cancer Research Institute Colorectal Clinical Studies G (2007) Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet* **370**: 143-152

Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Butler J, Garcia-Closas M, Weil R, Hoover RN, Rothman N (1999) Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer research* **59**: 4320-4324

Sliwkowski MX, Mellman I (2013) Antibody therapeutics in cancer. *Science* **341**: 1192-1198

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nature medicine* **7**: 186-191

Stein B, Anderson JC, Rajapakse R, Alpern ZA, Messina CR, Walker G (2010) Body Mass Index as a Predictor of Colorectal Neoplasia in Ethnically Diverse Screening Population. *Digest Dis Sci* **55**: 2945-2952

Tsofack SP, Garand C, Sereduk C, Chow D, Aziz M, Guay D, Yin HH, Lebel M (2011) NONO and RALY proteins are required for YB-1 oxaliplatin induced resistance in colon adenocarcinoma cell lines. *Molecular cancer* **10**: 145

Vidal-Vanaclocha F (2011) The liver prometastatic reaction of cancer patients: implications for microenvironment-dependent colon cancer gene regulation. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **4**: 163-180

Vollmers HP, Brandlein S (2007) Natural antibodies and cancer. *Journal of autoimmunity* **29**: 295-302

Yu H, Son GM, Joh YG (2013) The clinical significance of preoperative serum levels of carbohydrate antigen 19-9 in colorectal cancer. *Journal of the Korean Surgical Society* **84**: 231-237

Zeichner SB, Raj N, Cusnir M, Francavilla M, Hirzel A (2012) A De Novo Germline APC Mutation (3927del5) in a Patient with Familial Adenomatous Polyposis: Case Report and Literature Review. *Clinical Medicine Insights Oncology* **6**: 315-323

Zhang W, Song T (2014) The progress in adjuvant therapy after curative resection of liver metastasis from colorectal cancer. *Drug discoveries & therapeutics* **8**: 194-200

Zhao JH, Zhu Y, Wang PP, West R, Buehler S, Sun ZY, Squires J, Roebathan B, McLaughlin JR, Campbell PT, Parfrey PS (2012) Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer risk: a case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada. *BMC public health* **12**

Zurawska U, Baribeau DA, Giilek S, Victor C, Gandhi S, Florescu A, Verma S (2013) Outcomes of her2-positive early-stage breast cancer in the trastuzumab era: a population-based study of Canadian patients. *Current oncology* **20**: e539-e545

Zvibel I, Mintz Y, Brill S, Halpern Z, Papa M (2000) The role of the liver environment in the regulation of colon cancer metastasis. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* **2**: 48-51

VII. Anhang

Anhang A: Darstellung einzelner Patientendaten, Gruppenzuordnung und Färbintensität vom Antikörper PAT-SM6 in der Gesamtübersicht.

Fall	UICC-Stadium	TNM-Stadium	Alter/Geschlecht	Gewebsart	Intensität	angefärbte Tumorzellen in Prozent	Gruppen-einteilung
1	IV	pT4N3M1 G2-3	49/M	K	+++	>95	4
				LK	++	>95	4
2	IV	pT4N2M1 G3	78/W	K	++	80	2
				Taben	+	90	3
3	IV	pT4N2M1 G2	62/W	K	++	85	2
				LE	+++	>95	4
4	IV	pT4N2M1 G2	65/W	K	+++	95	3
				LK	+++	>95	4
5	IV	pT3N1M1 G2	78/M	K	++	>95	4
				LK	++	>95	4
				LE	+++	95	3
6	IV	pT4N1M1 G3	45/M	K	+++	>95	4
				LK	+	85	2
				LE	+	95	3
7	IV	pT4N2M1 G3	70/W	K	+++	80	2
				LK	+++	>95	4
8	IV	pT3N2M1 G2	68/M	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
				LE	+	>95	4
9	IV	pT4N2M1 G2	76/M	K	++	>95	4
				LK	++	>95	4
10	IV	pT3N2M1 G2	69/M	K	+++	>95	4
				LK	++	>95	4
				LE	+	>95	4
11	IV	pT3N2M1 G3	71/W	K	+	70	2
				LK	+++	95	3
12	IV	pT3N2M1 G2	75/M	K	++	70	2
				LK	++	>95	4
				LE	++	>95	4
13	IV	pT3N1M1 G2	83/M	K	+++	>95	4
				LE	+	>95	4
14	IV	pT3N0M1 G2	65/M	K	+++	>95	4
				LE	+++	>95	4

15	IV	pT3N0M1 G3	59/M	K	++	>95	4
				LE	+++	90	3
16	IV	pT3N2M1 G2	78/M	K	+++	70	2
				LE	+++	>95	4
17	IV	pT3N1M1 G2	64/W	K	++	>95	4
				Adnexe	+++	>95	4
18	III	pT3N2Mx G2	51/W	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
19	IV	pT4N1M1 G2	76/W	K	+	80	2
				LE	+++	90	3
20	IV	pT3N1M1 G2	77/M	K	+++	>95	4
				LE	+++	>95	4
21	IV	pT3N2M1 G2	71/W	K	+	50	1
				LK	+	10	1
22	IV	pT3N1M1 G2	73/M	K	+++	>95	4
				LK	+	90	3
				LE	++	>95	4
23	IV	pT3N0M1 G2	69/M	K	+++	>95	4
				LE	++	>95	4
24	III	pT3N1Mx G2	48/W	K	++	90	3
				LK	++	>95	4
25	IV	pT3N2M1 G2	68/M	K	+	70	2
				LK	++	80	2
				LE	+++	>95	4
26	III	pT3N1M0 G2	78/W	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
27	III	PT3N1M0 G2	78/M	K	+++	90	3
				LK	+++	95	3
28	IV	pT3N0M1 G2	79/M	K	++	60	2
				LE	++	95	3
29	IV	pT3N1M1 G2	69/M	K	+	>95	4
				LK	++	>95	4
30	III	pT3N1M0 G2	64/M	K	+++	95	3
				LK	++	85	2
31	IV	pT4N1M1 G2	63/M	K	+	30	1
				LK	++	80	2
				Dünndarm	++	90	3
32	IV	pT4N2M1 G3	45/W	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
33	IV	pT3N1M1 G2	84/M	K	+++	>95	4
				LE	+++	>95	4
34	III	pT3N1M0 G2	65/W	K	++	>95	4
				LK	+	>95	4

35	IV	pT3N2M1 G2	55/M	K	+++	90	3
				LK/Netz	+++	>95	4
36	IV	pT3N2M1 G2	59/W	K	++	95	3
				LK	++	>95	4
				LE	++	>95	4
37	IV	pT3N2M1 G2	47/W	K	+	90	3
				Taben	++	70	2
				Netz	+++	>95	4
38	IV	pT3N2M1 G2	69/W	K	++	50	1
				LK	++	>95	4
39	IV	pT4N2M1 G3	80/M	K	+++	>95	4
				LK	+++	70	2
40	IV	pT4N1M1 G2	56/W	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
41	IV	pT3N2M1 G2	63/W	K	+	>95	4
				LK	+++	>95	4
				LE	++	>95	4

Anhang B: Darstellung einzelner Patientendaten, Gruppenzuordnung und Färbintensität vom Antikörper PAT-LM1 in der Gesamtübersicht.

Fall	UICC-Stadium	TNM-Stadium	Alter/Geschlecht	Gewebsart	Intensität	angefärbte Tumorzellen in Prozent	Gruppen-einteilung
1	IV	pT4N3M1 G2-3	49/M	K	++	95	3
				LK	+	75	2
2	IV	pT4N2M1 G3	78/W	K	+	70	2
				Taben	+	85	2
3	IV	pT4N2M1 G2	62/W	K	++	85	2
				LE	+++	>95	4
4	IV	pT4N2M1 G2	65/W	K	+	95	3
				LK	++	>95	4
5	IV	pT3N1M1 G2	78/M	K	++	90	3
				LK	++	90	3
				LE	+++	>95	4
6	IV	pT4N1M1 G3	45/M	K	+++	>95	4
				LK	++	80	2
				LE	+	95	3
7	IV	pT4N2M1 G3	70/W	K	++	85	2
				LK	+++	>95	4
8	IV	pT3N2M1 G2	68/M	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
				LE	+	>95	4
9	IV	pT4N2M1 G2	76/M	K	++	70	2
				LK	++	>95	4
10	IV	pT3N2M1 G2	69/M	K	+++	95	3
				LK	++	>95	4
				LE	++	>95	4
11	IV	pT3N2M1 G3	71/W	K	+	80	2
				LK	++	95	3
12	IV	pT3N2M1 G2	75/M	K	+	>95	4
				LK	+++	>95	4
				LE	++	>95	4
13	IV	pT3N1M1 G2	83/M	K	++	>95	4
				LE	+	>95	4
14	IV	pT3N0M1 G2	65/M	K	+++	>95	4
				LE	+++	95	3
15	IV	pT3N0M1 G3	59/M	K	+	>95	4
				LE	++	90	3

16	IV	pT3N2M1 G2	78/M	K	++	80	2
				LE	++	>95	4
17	IV	pT3N1M1 G2	64/W	K	++	>95	4
				Adnexe	++	>95	4
18	III	pT3N2Mx G2	51/W	K	+++	>95	4
				LK	+++	>95	4
19	IV	pT4N1M1 G2	76/W	K	+	90	3
				LE	++	90	3
20	IV	pT3N1M1 G2	77/M	K	++	>95	4
				LE	+++	>95	4
21	IV	pT3N2M1 G2	71/W	K	+	50	1
				LE	++	90	3
22	IV	pT3N1M1 G2	73/M	K	+++	>95	4
				LK	+	95	3
				LE	+++	>95	4
23	IV	pT3N0M1 G2	69/M	K	+++	>95	4
				LE	++	90	3
24	III	pT3N1Mx G2	48/W	K	+	90	3
				LK	++	>95	4
25	IV	pT3N2M1 G2	68/M	K	+	90	3
				LK	++	95	3
				LE	++	90	3
26	III	pT3N1M0 G2	78/W	K	++	>95	4
				LK	+++	>95	4
27	III	PT3N1M0 G2	78/M	K	++	80	2
				LK	+++	95	3
28	IV	pT3N0M1 G2	79/M	K	++	70	2
				LE	+	80	2
29	IV	pT3N1M1 G2	69/M	K	+	>95	4
				LK	++	>95	4
30	III	pT3N1M0 G2	64/M	K	++	90	3
				LK	++	90	3
31	IV	pT4N1M1 G2	63/M	K	+	>95	4
				LK	+++	>95	4
				Dünndarm	+	70	2
32	IV	pT4N2M1 G3	45/W	K	+++	>95	4
				LK	++	>95	4
33	IV	pT3N1M1 G2	84/M	K	++	>95	4
				LE	++	95	3
34	III	pT3N1M0 G2	65/W	K	+++	>95	4
				LK	+	>95	4
35	IV	pT3N2M1 G2	55/M	K	++	>95	4
				LK/Netz	++	>95	4
36	IV	pT4N2M1 G2	59/W	K	++	80	2
				LK	++	>95	4
				LE	++	>95	4

37	IV	pT3N2M1 G2	47/W	K	++	>95	4
				Tuben	++	>95	4
				Netz	+++	>95	4
38	IV	pT3N2M1 G2	69/W	K	++	30	1
				LK	++	60	2
39	IV	pT4N2M1 G3	80/M	K	+++	90	3
				LK	+++	90	3
40	IV	pT4N1M1 G2	56/W	K	++	>95	4
				LK	++	>95	4
41	IV	pT3N2M1 G2	63/W	K	+	>95	4
				LK	+++	>95	4
				LE	+++	>95	4

Anhang C: Gegenüberstellung der T- und N-Stadien des Kolonkarzinoms und der Färbegergebnisse mit PAT-SM6 und PAT-LM1 Antikörpern.

Fall	T- und N-Stadium	PAT-SM6		PAT-LM1	
		Gruppe	Intensität	Gruppe	Intensität
1	pT4N3	4	++	3	++
2	pT4N2	2	++	2	+
3	pT4N2	2	++	2	++
4	pT4N2	3	+++	3	+
5	pT3N1	4	++	3	++
6	pT4N1	4	+++	4	+++
7	pT4N2	2	+++	2	++
8	pT3N2	4	+++	4	+++
9	pT4N2	4	++	2	++
10	pT3N2	4	+++	3	+++
11	pT3N2	2	+	2	+
12	pT3N2	2	++	4	+
13	pT3N1	4	+++	4	++
14	pT3N0	4	+++	4	+++
15	pT3N0	4	++	4	+
16	pT3N2	2	+++	2	++
17	pT3N1	4	++	4	++
18	pT3N2	4	+++	4	+++
19	pT4N1	2	+	3	+
20	pT3N1	4	+++	4	++
21	pT3N2	1	+	1	+
22	pT3N1	4	+++	4	+++
23	pT3N0	4	+++	4	+++
24	pT3N1	3	++	3	+
25	pT3N2	2	+	3	+
26	pT3N1	4	+++	4	++
27	pT3N1	3	+++	2	++
28	pT3N0	2	++	2	++
29	pT3N1	4	+	4	+
30	pT3N1	3	+++	3	++
31	pT4N1	1	+	4	+
32	pT4N2	4	+++	4	+++
33	pT3N1	4	+++	4	++
34	pT3N1	4	++	4	+++
35	pT3N2	3	+++	4	++
36	pT4N2	3	++	2	++

37	pT3N2	3	+	4	++
38	pT3N2	1	++	1	++
39	pT4N2	4	+++	3	+++
40	pT4N1	4	+++	4	++
41	pT3N2	4	+	4	+