

# Vergleichende Analyse der diagnostischen und prognostischen Bedeutung der intestinalen Transkriptionsfaktoren SATB2 und CDX2 im Kolorektalen Karzinom

**Maxime Philipp Schmitt**

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Moritz Jesinghaus
2. Prof. Dr. Maximilian Reichert

Die Dissertation wurde am 29.09.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 06.02.2024 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
<b>2.</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b> .....	11
<b>3.</b>	<b>Einleitung</b> .....	13
<b>3.1</b>	<b>Das Kolorektale Karzinom</b> .....	15
3.1.1	Epidemiologie.....	15
3.1.2	Klinisches Bild, Diagnostik und Screening.....	17
3.1.3	Ätiologie des Kolorektalen Karzinoms.....	17
3.1.4	Pathogenese der Kolorektalen Karzinome.....	18
<b>3.2</b>	<b>Klinische Implikationen der histopathologischen Diagnostik des Kolorektalen Karzinoms</b> .....	21
3.2.1	Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome gemäß der TNM -Klassifikation.....	22
3.2.2	Zentrale histomorphologische Parameter des Kolorektalen Karzinoms.....	24
3.2.2.1	WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts als diagnostisches Richtlinienwerk.....	24
3.2.2.2	Histologische Subtypen des Kolorektalen Karzinoms.....	26
3.2.2.3	WHO-Grading.....	29
3.2.2.4	Tumour Budding.....	31
<b>3.3</b>	<b>CDX2 und SATB2 als Marker kolorektaler Differenzierung</b> .....	32
3.3.1	Caudal-related Homeobox Transcription Factor CDX2.....	32
3.3.1.1	Physiologie und Pathophysiologie von CDX2.....	32
3.3.1.2	Stellenwert von CDX2 bei der histopathologischen Begutachtung.....	33
3.3.2	Special AT-rich Sequence-binding Protein 2 (SATB2).....	34
3.3.2.1	Physiologie und Pathophysiologie von SATB2.....	34
3.3.2.2	Stellenwert von SATB2 bei der histopathologischen Begutachtung.....	35
<b>4.</b>	<b>Fragestellung, Hypothese und eigener Forschungsansatz dieser Arbeit</b> .....	37
<b>5.</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	39
<b>5.1</b>	<b>Kohorten-Zusammensetzung und Probenakquisition</b> .....	39
<b>5.2</b>	<b>Evaluation der zentralen pathologisch-histomorphologischen Diagnosekriterien</b> .....	40
<b>5.1</b>	<b>Immunhistochemische Aufbereitung und Evaluation</b> .....	40
5.1.1	Evaluation der CDX2-Expression.....	41
5.1.2	Evaluation der SATB2-Expression.....	44
5.1.3	Evaluation des dMMR-Status.....	46
<b>5.2</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	47

<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	49
<b>6.1</b>	<b>Allgemeine Charakteristika der untersuchten Kohorte</b> .....	49
<b>6.2</b>	<b>Statistische Auswertung von CDX2 als kolorektaler Differenzierungsmarker</b> .	51
6.2.1	Deskriptive Statistik der Expression von CDX2.....	51
6.2.1.1	Expressionsverteilung von CDX2 in der Gesamtkohorte und CDX2- Gruppenformation .....	51
6.2.1.2	Expressionsverteilung von CDX2 nach Gruppenstratifizierung in zentrale Diagnosekriterien der WHO.....	54
6.2.1.2.1	Korrelation der CDX2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern .....	54
6.2.1.2.2	CDX2-Expression unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter.....	57
6.2.1.2.3	CDX2-Expression unter Betrachtung des Mikrosatellitenstatus .....	59
6.2.2	Überlebenszeitanalyse der Expression von CDX2 in univariaten Analysen.....	59
6.2.2.1	Prognostische Relevanz der CDX2-Gruppen in der Gesamtkohorte.....	59
6.2.2.2	Prognostische Relevanz von CDX2 stratifiziert nach Parametern der Ausbreitungsdiagnostik und UICC-Stadien.....	60
6.2.2.3	Prognostische Relevanz von CDX2 in Gruppen der zentralen morphologischen Parameter.....	60
6.2.2.4	Prognostische Relevanz von CDX2 stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus ..	62
6.2.2.5	Prognostische Relevanz von CDX2 nach Tumorlokalisierung .....	64
6.2.3	Multivariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression.....	66
<b>6.3</b>	<b>Statistische Auswertung von SATB2 als kolorektaler Differenzierungsmarker</b> .....	68
6.3.1	Deskriptive Statistik der Expression von SATB2.....	68
6.3.1.1	Expressionsverteilung von SATB2 in der Gesamtkohorte und SATB2- Gruppenformation .....	68
6.3.1.2	Expressionsverteilung von SATB2 nach Gruppenstratifizierung in zentrale Diagnosekriterien der WHO.....	71
6.3.1.2.1	Korrelation der SATB2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern.....	71
6.3.1.2.2	SATB2-Expression unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter.....	74
6.3.1.2.3	SATB2-Expression unter Betrachtung des Mikrosatellitenstatus .....	78
6.3.2	Überlebenszeitanalyse der Expression von SATB2 in univariaten Analysen.....	78
6.3.2.1	Prognostische Relevanz der SATB2-Gruppen in der Gesamtkohorte.....	78
6.3.2.2	Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Parametern der Ausbreitungsdiagnostik und UICC-Stadien.....	79

6.3.2.3	Prognostische Relevanz von SATB2 in Gruppen der zentralen morphologischen Parameter.....	80
6.3.2.4	Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus	84
6.3.2.5	Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Tumorlokalisierung .....	85
6.3.3	Multivariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expression.....	85
<b>6.4</b>	<b>Vergleichende Analyse der kolorektalen Differenzierungsmarker CDX2 und SATB2 .....</b>	<b>88</b>
6.4.1	Vergleichende Analyse der Expressionshäufigkeiten von SATB2 und CDX2.....	88
6.4.2	Vergleichende Analyse der prognostischen Relevanz von SATB2 und CDX2 in ihren komplementären Expressionsgruppen .....	89
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationsverzeichnis Maxime Schmitt.....</b>	<b>130</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>132</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
a	Autopsie
ACVR2A	Activin-Rezeptor-Typ-2A-Gen
APC	Adenomatose-Polyposis-Coli-Gen
AXIN2	Axin-2-Gen
BAT25	Mononukleotid-Repeat BAT25 (Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker)
BAT26	Mononukleotid-Repeat BAT 26 (Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker)
BCL9	B-Zell-CLL/Lymphom-9-Gen
Bd	Tumour Budding
BRAF (V600E)	Proto-Onkogen B-Raf (mit Mutation im Codon 600 und Aminosäureaustausch von Valin gegen Glutaminsäure)
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-Dependent-Kinase
Cdk2	Cyclin-Dependent-Kinase-2-gene
CDKN2D	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor-2D-gene
CDX2	Caudal-related Homeobox Transcription Factor 2
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIMP	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp
CIN	Chromosomale Instabilität

CK	Zytokeratin
CMMRD	Konstitutionelle Mismatch-Reparatur-Defizienz-Syndrom
CMS	Consensus Molecular Subtype
c-Myc	Proto-Onkogen c-Myc
CUP	Carcinoma of unknown primary
D17S250	Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker D17S250
D2S123	Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker D2S123
D5S346	Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker D5S346
DAB	Diaminobenzidin
DFS	Krankheitsfreies Überleben/ Disease free survival
DNA	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
DSS	Krankheitsspezifisches Überleben/ Disease specific survival
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
EPCAM	Epithelzell-Adhäsions-Molekül EpCAM
ERK5	Extracellular-signal-regulated Kinase 5
Exo1	Exonuklease-1-Gen
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FBXW7	F-box/WD-repeat-containing-protein-7-gene
FFPE	Formalin-fixed Paraffin-embedded/Formalinfixiertes Paraffingewebe
FHIT(3p)	Fragile-histidine-triad-gene (auf Chromosom 3p)

FoxP2	Forkhead-box-protein-2-gene
G	WHO-Grading
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ -Gen
HDI	Human Development Index
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGIEN	High-grade intraepitheliale Neoplasie
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish peroxidase/ Meerrettich-Peroxidase
i.d.R.	in der Regel
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHC	Immunhistochemie
ITBCC	International Tumour Budding Consensus Conference
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten-rat-sarcoma-viral-onkogene
KRK	Kolorektales Karzinom
L	Lymphgefäßinvasion
LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom
LGIEN	Low-grade intraepitheliale Neoplasie
lncRNA	Long non-coding RNA

LRRFIP2	Leucin-rich-repeat-flightless-interacting-protein-2-gene
m	multiple Primärtumore
MANEC	Gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MARs	Nuclear-Matrix-Attachment-Regions
MEIS2	Meis-Homeobox-2-Gen
MEN1	Multiple-endokrine-Neoplasie-Typ-1-Gen
miRNA	MicroRNA
MLH1	MutL-Proteinhomolog 1
MLH3	MutL-Proteinhomolog 3
(d)MMR	(deficient) Mismatch-Repair-Proteine
MRI	Klinikum rechts der Isar, München
mRNA	messengerRNA
MSH2	MutS-Homolog 2
MSH3	MutS-Homolog 3
MSH6	MutS-Homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MUC1	Mucin-1-Gen
MUC2	Mucin-2-Gen

MUCDHL	Mucin-and-cadherin-like-protein-gene
mut	mutiert
MUTYH	MutY-DNA-Glykosylase-Gen
NANOG	Nanog-Homeobox-Gen
NAP	NTHL1-assoziierte Polyposis
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NOS	nicht anderweitig spezifiziertes Adenokarzinom
NOTCH3	Neurogenic-locus-notch-homolog-protein-3-gene
NRAS	Neuroblastoma-RAS-viral-oncogene-homolog
NTHL1	NTH-like-DNA-glycosylase-1-gene
OS	Gesamtüberleben/ Overall survival
p	p-Wert
p21	Cyclin-Dependent-Kinase-Inhibitor 1
p27kip1	Cyclin-Dependent-Kinase-1B-gene
PAPP	Polymerase-Korrekturlese-assoziierte Polyposis
PD-L1	Programmed Cell Death Protein-Ligand 1
PE	Probeexzision

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase-catalytic-subunit alpha-gene
PMS2	PMS1-Homolog 2
Pn	Perineuralscheideninvasion
POLD1	Polymerase D1
POLE	Polymerase E
R	Resektionsstatus
r	Rezidiv-Situation
RB1	Retinoblastom-Protein-Gen
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
SATB2	Special AT-rich Sequence-binding Protein 2
SCNEC	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom
SD	Standardabweichung
SLC9A9	Solute-Carrier-Family-9-Member-A9-gene
SMAD4	MAD-Homolog-4-Gen
SMARCA4	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4-gene
SNAIL	Zink-Finger-Transkriptionsfaktor-Familie Snail
sog.	sogenannt
SOX2	sex-determining-region-Y-box-2-gene
SSTR2A	Somatostatin-Rezeptor-2A-Gen
STR	Short Tandem Repeat/ Mikrosatelliten

Tcf4	Transcriptionfactor-4-gene
TCF7L2	Transcription-factor-7-like-2-gene
TGFBR2	Transforming-growth-factor-beta-receptor-2-gene
TH1	TH1-Helferzelle
TMA	Tissue Microarray
(p)TNM	(pathologisch) Tumor-Nodus-Metastasen
TP53	Tumor Protein p53-Gen
TRM	Tumorregister München
TUM	Technische Universität München
u.a.	unter anderem
UICC	Union For International Cancer Control
USA	United States of America/ Vereinigte Staaten von Amerika
V	Venengefäßinvasion
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wachstumsfaktor Wnt, <b>W</b> ingless-/ <b>I</b> nt-1-Gen
y	Zustand nach neoadjuvanter Therapie
z.B.	zum Beispiel

## 2. Zusammenfassung der Arbeit

Der intestinale Transkriptionsfaktor SATB2 (*Special AT-rich Sequence-binding Protein 2*) wird in der klinisch-pathologischen Tumordiagnostik zunehmend als komplementärer Marker zum Standardmarker CDX2 (*Caudal-related Homeobox Transcription Factor 2*) zur Sicherung einer kolorektalen Differenzierung eingesetzt, da beide in hoher Frequenz in Kolorektalen Karzinomen (KRK) exprimiert werden. Neben Ihrem Einsatz in der histologischen Differentialdiagnostik, wird einem Expressionsverlust beider Transkriptionsfaktoren zunehmend auch eine prognostische Relevanz zugesprochen.

Diese Dissertationsschrift untersuchte in einer klinisch-pathologisch umfassend charakterisierten Kohorte von 1039 KRK vergleichend die Expression von SATB2 und CDX2. Hierbei wollten wir herausarbeiten, welcher der beiden Transkriptionsfaktoren im KRK häufiger einen Expressionsverlust zeigt und zudem nachvollziehen, ob wir die Expressionsfrequenz von CDX2/ SATB2 mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern – z.B. dem Tumorstadium oder spezifischen Karzinomsubtypen – assoziieren können. Des Weiteren untersuchten wir die Bedeutung von CDX2 und SATB2 als prognostische Biomarker. Dies ebenso nicht nur im direkten Vergleich der beiden Transkriptionsfaktoren untereinander, sondern auch in Relation zu den bereits etablierten konventionell-histologischen Prognoseparametern (KRK-Subtyp, Grading, Tumour Budding), die in der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts (5. Auflage) definiert werden.

Entgegen unseren Erwartungen war ein Verlust von SATB2 deutlich häufiger als ein Verlust von CDX2 zu beobachten (SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 22.2% vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 10.2%), wodurch SATB2 hinsichtlich der diagnostischen Sensitivität zur Sicherung einer kolorektalen Differenzierung hinter CDX2 zurückblieb.

Aus prognostischer Sicht stellte sich SATB2 in der Analyse der Gesamtkohorte gegenüber CDX2 als deutlich überlegener Biomarker heraus, wobei Patienten mit einem SATB2-Verlust einen deutlich schlechteren Verlauf in univariaten Analysen aufwiesen (z.B. SATB2: DSS:  $p < 0.001$  vs. CDX2: DSS:  $p = 0.006$ ). Im Vergleich zu den konventionellen histologischen Parametern war jedoch auch SATB2 diesen in seiner prognostischen Demarkationsfähigkeit in der Gesamtkohorte unterlegen. Dies bestätigte sich auch in weitergehenden multivariaten Analysen der Gesamtkohorte unter Einbeziehung des Tumorstadiums und der zentralen WHO-Kriterien, in denen die etablierten Parameter hochgradig prognostisch blieben, aber weder SATB2 noch CDX2 ihre prognostische Relevanz beibehalten konnten. Allerdings konnten wir in weitergehenden Subgruppenanalysen aufzeigen, dass ein Verlust von SATB2 biologisch besonders aggressive Karzinome in morphologischen Hoch-Risiko-Subgruppen kennzeichnete und in diesen auch in multivariaten Analysen prognostisch relevant blieb. Somit

ist ein SATB2-Verlust in der Lage prognostische Subpopulationen zu identifizieren, die durch die gängigen Parameter nicht erfasst werden. CDX2 wies hingegen in keiner dieser Subgruppenanalysen eine prognostische Relevanz auf.

Zusammenfassend zeigt unsere vergleichende Analyse, dass sowohl CDX2 als auch SATB2 eine wichtige Rolle in der histopathologischen Diagnostik einnehmen. SATB2 ist als der wesentlich stärkere prädiktiv-prognostische Marker anzusehen, der insbesondere in Hoch-Risiko-Karzinomen eine nochmals optimierte prognostische Stratifizierung gewährleistet. Kontrastierend dazu ist CDX2 als wesentlich sensitiverer Transkriptionsfaktor zur Sicherung einer kolorektalen Differenzierung einzustufen, dem hingegen in der Prognoseabschätzung eine deutlich geringere Bedeutung zukommt. Da beide Parameter sehr gut ergänzende Stärken aufweisen und ein kompletter Ausfall beider Marker nur in einem Bruchteil der KRK auftritt, weist unsere Analyse auf eine kombinierte Anwendung beider Transkriptionsfaktoren als vielversprechendsten Ansatz hin. Ausblickend müssen weitere Studien folgen, um KRK-Subgruppen, die mit einem prognostisch ungünstigen SATB2-Verlust einhergehen, weiter bezüglich ihrer molekularen Grundlagen zu charakterisieren und um potentielle therapeutische Angriffspunkte ableiten zu können.

### 3. Einleitung

Das Kolorektale Karzinom (KRK) ist eine der häufigsten Tumoridentitäten weltweit, mit nach wie vor beträchtlicher tumorspezifischer Mortalität [3, 4]. Bei malignomsuspekten Läsionen im Kolon und Rektum stellt dabei i.d.R. prätherapeutisch neben Koloskopie und bildgebenden Verfahren die histopathologische Diagnostik den Ausgangspunkt aller weiteren diagnostischen und therapeutischen Überlegungen dar, welche nach Resektion des Tumors vor allem vom post-operativen Tumorstadium nach UICC und der finalen Tumorklassifizierung komplementiert wird [5, 6]. Aus Sicht des Pathologen stellt der Begriff KRK einen Oberbegriff für eine heterogene Gruppe maligner epithelialer Tumore der Dickdarmschleimhaut dar, deren überwiegenden Teil die Adenokarzinome mit ihren zahlreichen Subtypen bilden [7, 8]. Diese unterscheiden sich wiederum nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie, sondern auch in ihren (molekular)biologischen Charakteristika ebenso wie in teils gravierender Weise bezüglich ihrer klinischen Prognose [9-11]. Daher wurden in den letzten Jahren neben dem Ausbau von Screeningprogrammen auch massive Bestrebungen unternommen, das KRK genauer hinsichtlich seiner histomorphologischen und molekularpathologischen Eigenschaften immer präziser zu charakterisieren. Hierbei wird vor allem nach Biomarkern gesucht, welche prognostische Aussagen erlauben, eine genauere Tumoreinordnung gewährleisten oder Angriffspunkte für weitere Therapieoptionen darstellen könnten [7, 12]. Neben molekularpathologischen Untersuchungen kommen dabei auch vielfach immunhistochemische Untersuchungen zum Einsatz [13].

Vor diesem Hintergrund ist für das KRK der intestinale Transkriptionsfaktor CDX2 (*Caudal-related Homeobox Transcription Factor 2*) als sensitiver Marker einer intestinalen Differenzierung in den Fokus gerückt, dem auch in hochrangigen Publikationen - u.a. im *New England Journal of Medicine* - eine hohe prognostische Relevanz zugesprochen wurde [13-16]. Komplementär dazu hat in den letzten Jahren auch der intestinale/osteogene Transkriptionsfaktor SATB2 (*Special AT-rich Sequence-binding Protein 2*) Einzug in die KRK-Diagnostik erhalten, für den eine besonders hohe Spezifität postuliert wurde [13, 17-19].

In dieser Dissertation haben wir in einer vergleichenden Analyse die Expression der intestinalen Transkriptionsfaktoren CDX2 und SATB2 in einer großen Kohorte von 1039 Kolorektalen Karzinomen untersucht. Wir betrachteten nicht nur den Zusammenhang der Expression von CDX2 und SATB2 miteinander, sondern auch mögliche Korrelationen des Expressionsverhaltens mit den zentralen histomorphologischen Parametern der WHO-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms (Histologischer Subtyp, Tumour Budding, Grading), molekularpathologischen Charakteristika, dem Tumorstadium sowie dem klinischen Verlauf.

Mit unseren Analysen wollten wir insgesamt fünf zentrale Fragestellungen beantworten: Welcher der beiden Transkriptionsfaktoren ist insgesamt häufiger in Kolorektalen Karzinomen exprimiert (1) und welche spezifischen histopathologischen Charakteristika weisen Karzinome auf, die eine verminderte oder fehlende Expression entweder von CDX2 oder SATB2 aufweisen (2)? Zudem wollten wir herausfinden, wie sich die prognostische Relevanz eines Expressionsverlusts von CDX2 und SATB2 darstellt (3) und wie diese im Vergleich mit den zentralen histologischen WHO-Kriterien des Kolorektalen Karzinoms einzuordnen ist (4). Im letzten Schritt unserer Analysen wollten wir abschließend herausarbeiten, ob durch einen der beiden Marker distinkte Prognosegruppen herausgearbeitet werden können, die durch konventionelle Prognosefaktoren, wie die WHO-Kriterien oder das Tumorstadium, nicht identifiziert werden (5).

## 2.1 Das Kolorektale Karzinom

### 2.1.1 Epidemiologie

Mit weltweit geschätzt 1,9 Millionen neu diagnostizierten Fällen und über 900 000 Todesfällen stellte das Kolorektale Karzinom (KRK) im Jahr 2020 geschlechtsübergreifend den dritthäufigsten malignen Tumor und die zweithäufigste Krebs-assoziierte Todesursache dar [3] (siehe Abbildung 1). Daraus leitete die „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine weltweite Inzidenz von 19,5 bzw. eine Mortalität von 9,0 pro 100000 Einwohner ab. Dabei zeigen sich neben teils deutlichen geographischen Verteilungsunterschieden und einer Abhängigkeit von der wirtschaftlichen und soziokulturellen Entwicklung eines Landes [3, 20-24] auch hinsichtlich des Geschlechts erkennbare Unterschiede. Obwohl das Lebenszeitrisko für beide Geschlechter annähernd vergleichbar ist, liegt die Inzidenzrate bei Männern um bis zu 31% höher als bei Frauen [25, 26].

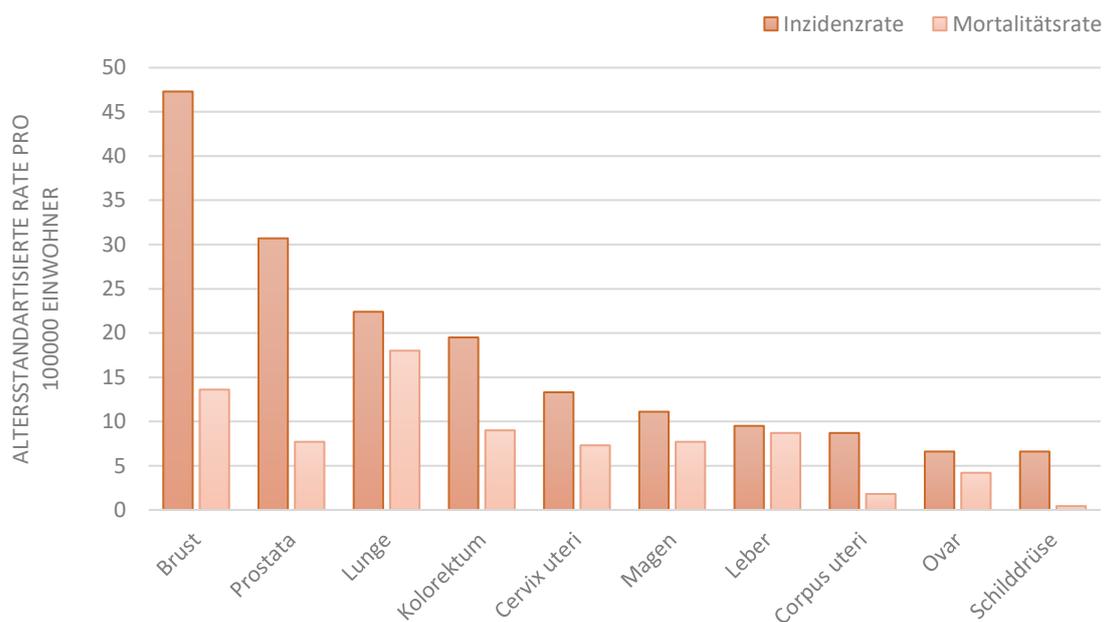


Abbildung 1: Geschätzte altersstandardisierte Krebs-Inzidenz- und -Mortalitätsrate im Jahr 2020, weltweit, geschlechtsunspezifisch über allen Altersgruppen (modifiziert nach [4]).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate des KRK hängt stark von der Tumorausdehnung zum Diagnosezeitpunkt ab und variiert zwischen ca. 90% für lokal begrenzte und ca. 14% für ausgedehnte Erkrankungsstadien [26]. In Deutschland lag die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit gemittelt über alle UICC-Stadien im Jahr 2018 bei ca. 65% (Frauen) bzw. 63% (Männer) [27]. Obwohl das KRK eher als eine Krebserkrankung des

betagteren Menschen gilt mit einer maximalen altersspezifischen Inzidenz in der Altersgruppe über 85 [26] und einem mittleren Erkrankungsalter in Deutschland von 72 Jahren (Männer) bzw. 75 Jahren (Frauen) [27], zeigt sich seit Jahren eine zunehmende Entwicklung hin zu jüngeren Patienten [28]. Zwar ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines KRK im jüngeren Alterskollektiv gegenüber der älteren Vergleichsgruppe immer noch verhältnismäßig gering (8,5 pro 100000 vs. 159,6 pro 100000; Jahr 2018), so hat sich dennoch im Zeitraum von 2000 bis 2018 die Inzidenzrate beispielsweise in den USA in der Altersgruppe unter 50 Jahren um 30,6% gesteigert [29]. Hierbei zu beachten ist, dass sich die Altersgruppen hinsichtlich Symptomatik, Ätiologie, Risikofaktoren und Krankheitsverlauf unterscheiden [30, 31].

Auch hinsichtlich der Inzidenz in den einzelnen Kolonabschnitten bzw. im Rektum zeigen sich erhebliche Unterschiede. Mit Abstand am häufigsten ist das KRK im Kolon sigmoideum und Rektum lokalisiert, wohingegen Karzinome im Kolon descendens und transversum vergleichsweise selten auftreten [32].

Jedoch unterliegt die Verteilung einem Wandel mit Abnahme der linksseitigen und Zunahme der rechtsseitigen KRKs, was wahrscheinlich in der forcierteren präventiven Versorgung und der Zunahme rechtsseitiger Karzinome mit steigendem Lebensalter bei demographischer Alterung begründet liegt [7, 32, 33]. Abbildung 2 stellt das Verteilungsmuster Kolorektaler Karzinome in einer von Jesinghaus et al. kürzlich durchgeführten und mehr als tausend Karzinome umfassenden Studie dar.

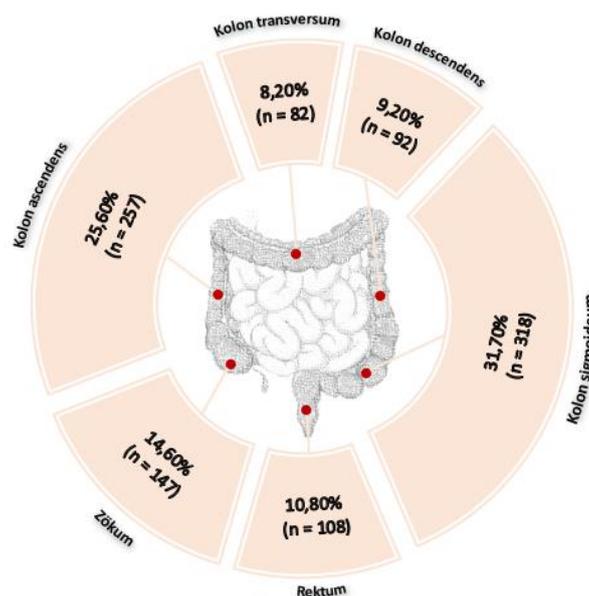


Abbildung 2: Verteilung der Karzinome in Kolon und Rektum: Die Verteilung auf linksseitiges und rechtsseitiges Kolon ist bei einer Gesamtzahl von  $n = 1004$  nahezu ausgewogen (modifiziert nach [11]).

### 2.1.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Screening

In den allermeisten Fällen verlaufen Kolorektale Karzinome initial klinisch inapparent und werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium auffällig, womit es keine verlässlichen Frühsymptome gibt [34]. Unspezifische Allgemeinsymptome und B-Symptomatik können erste Hinweise auf ein KRK sein. Zu den klassischen Symptomen werden rektale Blutungsabgänge und Änderungen der Stuhlgewohnheiten gezählt. Eisenmangelanämie, Flatulenzen und Tenesmen werden ebenfalls beschrieben. Als Zeichen einer bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankung können sich abdominelle Schmerzen, rektal/abdominell tastbare Raumforderungen oder Komplikationen mit Ileussyndromatik, Perforation und Fistelbildungen zu benachbarten Organen einstellen. Das Auftreten und die Charakteristika der Symptome hängen dabei auch im Wesentlichen von der Lokalisation des Tumors ab [32, 35, 36].

Einzelne Symptome eines KRK sind letztlich unspezifisch, steigern jedoch in Kombination und unter Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren (beispielsweise männliches Geschlecht und Alter) den Positiven Prädiktiven Vorhersagewert [37].

Bei der diagnostischen Abklärung kommen neben einer explorativen Anamnese, bei der v.a. individuelle Risikofaktoren und familiäre Erkrankungen erfragt werden sollten, der digital-rektalen Untersuchung und der kompletten hohen Koloskopie eine entscheidende Rolle zu. Letztere besitzt nicht nur die höchste Sensitivität und Spezifität als Suchtest, sondern ermöglicht auch eine Probengewinnung zur histopathologischen Diagnosesicherung und die Möglichkeit zur Abtragung adenomatöser Vorläuferläsionen. [5]

Nach histopathologischer Diagnosesicherung schließt sich in der Regel eine Reihe verschiedener bildgebender Verfahren zur Ausbreitungsdiagnostik an, da diese von besonderer Bedeutung bezüglich Prognose und Therapieplanung ist [38]. Der Nachweis von Tumormarkern, wie CEA, spielt in der Verlaufkontrolle und bei der prognostischen Abschätzung eine Rolle und kann Hinweise auf Tumorresiduen/-rezidive geben, zeigt jedoch insgesamt eine geringe Sensitivität und Spezifität [39-42].

### 2.1.3 Ätiologie des Kolorektalen Karzinoms

Der Großteil der KRK entsteht sporadisch, für bis zu 5-10% der Patienten werden genetisch definierte hereditäre Syndrome als pathogenetisch ursächlich betrachtet. Eine anamnestisch eruierbare familiäre Häufung ohne definierbare Keimbahnalteration wird für bis zu 30% aller Patienten beschrieben [43-46]. Zu den modifizierbaren Risikofaktoren des KRK zählen allen voran Lifestyle-Faktoren, die mit zunehmendem HDI an Bedeutung gewinnen [25]. Unter diesen spielen neben bestimmten Ernährungsweisen, die mit einer gesteigerten Aufnahme

von prozessiertem und rotem Fleisch, von Alkohol und von hochkalorischer Nahrung bei geringerer Zufuhr von beispielsweise Gemüse, Fisch, Vollkorn-, und Milchprodukten einhergehen, auch der Konsum von Tabakprodukten eine Rolle [43, 47-53]. In diesem Zusammenhang ist insbesondere auch das Metabolische Syndrom mit seinen Komponenten hervorzuheben, bei dem nicht nur die Ernährungsweise, sondern auch zahlreiche Stoffwechselfvorgänge und endokrine Prozesse eine kanzerogene Wirkung haben [43, 54, 55]. Bei Krebserkrankungen generell konnte in zahlreichen Studien als protektiver Faktor körperlich Aktivität bestätigt werden [56-59]. Zu den wichtigsten nicht-modifizierbaren Risikofaktoren gehören neben Alter und männlichem Geschlecht zudem eine positive Familienanamnese, interessanterweise unabhängig davon ob ein genetisch definierter Hintergrund bekannt ist [60]; [44, 45, 53, 61, 62]. Zunehmend rückt auch die Frage nach dem Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die Karzinogenese in den Vordergrund. So konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms variiert und u.a. über proinflammatorische und immunsupprimierende Mechanismen, epigenetische Einflüsse sowie durch Metabolite auf das Dickdarmepithel einwirkt und somit an der Karzinogenese beteiligt sein könnte [43, 63-66]. Darüber hinaus ist bekannt, dass zahlreiche primär nicht-neoplastische Erkrankungen mit einem erhöhten KRK-Risiko einhergehen [7]. Darunter fallen in erster Linie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, die aufgrund der anhaltenden Entzündungsreaktion in Kombination mit weiteren Faktoren ein prokarzinogenes und mutationsförderndes Milieu bieten [67-74].

#### 2.1.4 Pathogenese der Kolorektalen Karzinome

Wie die allermeisten malignen epithelialen Tumoren, ist das KRK eine durch mehrschrittige genetische Veränderungen bedingte Tumorerkrankung. Initiale Mutationen klassischer genetischer Treiber (*APC*, *BRAF*) führen hier zunächst zur Ausbildung von adenomatösen Vorläuferläsionen mit zunächst geringgradigen zytologischen und strukturellen Abnormalitäten (klassische Adenome / serratierte Läsionen/Adenome). Bei Hinzukommen weiterer genetischer Alterationen (z.B. *KRAS*, *TP 53*) findet man korrespondierend histologisch eine progrediente intraepitheliale Neoplasie (high-grade) in den Vorläuferläsionen, welche folglich ein hohes Risiko einer Progression zum invasiven KRK aufweisen [75-77].

Basierend auf dem genetischen Profil der KRK können grundsätzlich drei wesentliche Karzinogenesewege bei den sporadischen KRK unterschieden werden:

Der häufigste sog. „*konventionelle Karzinogeneseweg*“ ist mit einem hohen Maß an *chromosomaler Instabilität (CIN)* verbunden und zeigt typischerweise eine Akkumulation klassischer Genalterationen während der Progression von Adenom zu Karzinom. Am Beginn

dieses Prozesses steht typischerweise die Inaktivierung des *APC*-Tumorsuppressorgens, welches über die *Wnt-Signalkaskade* als sog. „*gatekeeper*“-Gen an der Regulation von Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose beteiligt ist sowie bei der Chromosomensegregation die Chromosomenstabilität gewährleistet [32, 78, 79]. Im weiteren Verlauf sind dann neben *APC* klassischerweise auch die Suppressorgene *TP53*, *SMAD4*, *FBXW7*, *TCF7L2* und *PIK3CA*, die Onkogene *KRAS* und *NRAS* sowie progredient in geringerem prozentualem Ausmaß weitere Gene affiziert [7, 80].

Daneben gibt es den *Mikrosatelliteninstabilen-Karzinogeneseweg*, der entweder durch Keimbahnmutationen (vgl. *Lynch-Syndrom*), durch somatische Mutationen oder durch (epigenetische) Hypermethylierung der MMR-Gene hervorgerufen wird und als „*hypermultiert*“ bezeichnet wird [62, 81]. Durch den Funktionsverlust der MMR-Proteine können fehlgepaarte Basen und Insertions-/Deletionsschleifen während der DNA-Replikation nicht mehr erkannt und durch fehlerfreie neusynthetisierte DNA-Abschnitte ersetzt werden. Eine Akkumulation von Mutationen ist die Folge und Tumorsuppressorgene oder Onkogene werden in ihrer Funktion beeinflusst [82]. Da in kurzen repetitiven Nukleotid-Sequenzen, den sog. *Short Tandem Repeats (STR)* oder auch *Mikrosatelliten* genannt, die Fehlpaarungswahrscheinlichkeit besonders hoch ist, kommt es hier zum Phänotyp der *Mikrosatelliteninstabilität (MSI)* [81]. Zu den relevanten MMR-Proteinen werden *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (sowie seltener *MLH3*, *MSH3* und *Exo1*) gezählt [82]. Vergleichsweise neu bei diesem Karzinogeneseweg ist die Erkenntnis, dass auch epigenetische Modifikationen Einfluss auf die Genexpression haben können und sich im *CpG-Insel-Methylator-Phänotyp (CIMP)* widerspiegeln [83]. Von dieser Hypermethylierung ist in besonderem Ausmaß die Promotorregion von *MLH1* betroffen und repräsentiert sich in einem *MLH1/PMS2*-Ausfall [84-86]. Karzinome der hypermethylierten Gruppe bzw. CIMP-Gruppe sind mit dem phänotypischen Erscheinungsbild des serratierten Karzinogenesewegs assoziiert und gehen häufig mit *BRAF V600E*-Mutationen einher [32, 78, 87].

Von der Pathogenese der „*hypermultierten Karzinome*“ ist als dritter Karzinogeneseweg die Gruppe der „*ultramultierten Karzinome*“ mit über 40 Mutationen pro Megabasen abzugrenzen, die durch eine inaktivierende Mutation im Gen der DNA-Korrekturlese-Untereinheiten *Polymerase E (POLE)* oder seltener *D1 (POLD1)* des DNA-Replikations-Enzymkomplexes verursacht werden [78].

„*Hypermultierte*“ und „*ultramultierte Karzinome*“ weisen ein anderes Gen-Alterationsprofil auf als *CIN-Karzinome* und sind überproportional häufig in den Genen *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *BRAF*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* und *TCF7L2* mutiert [80].

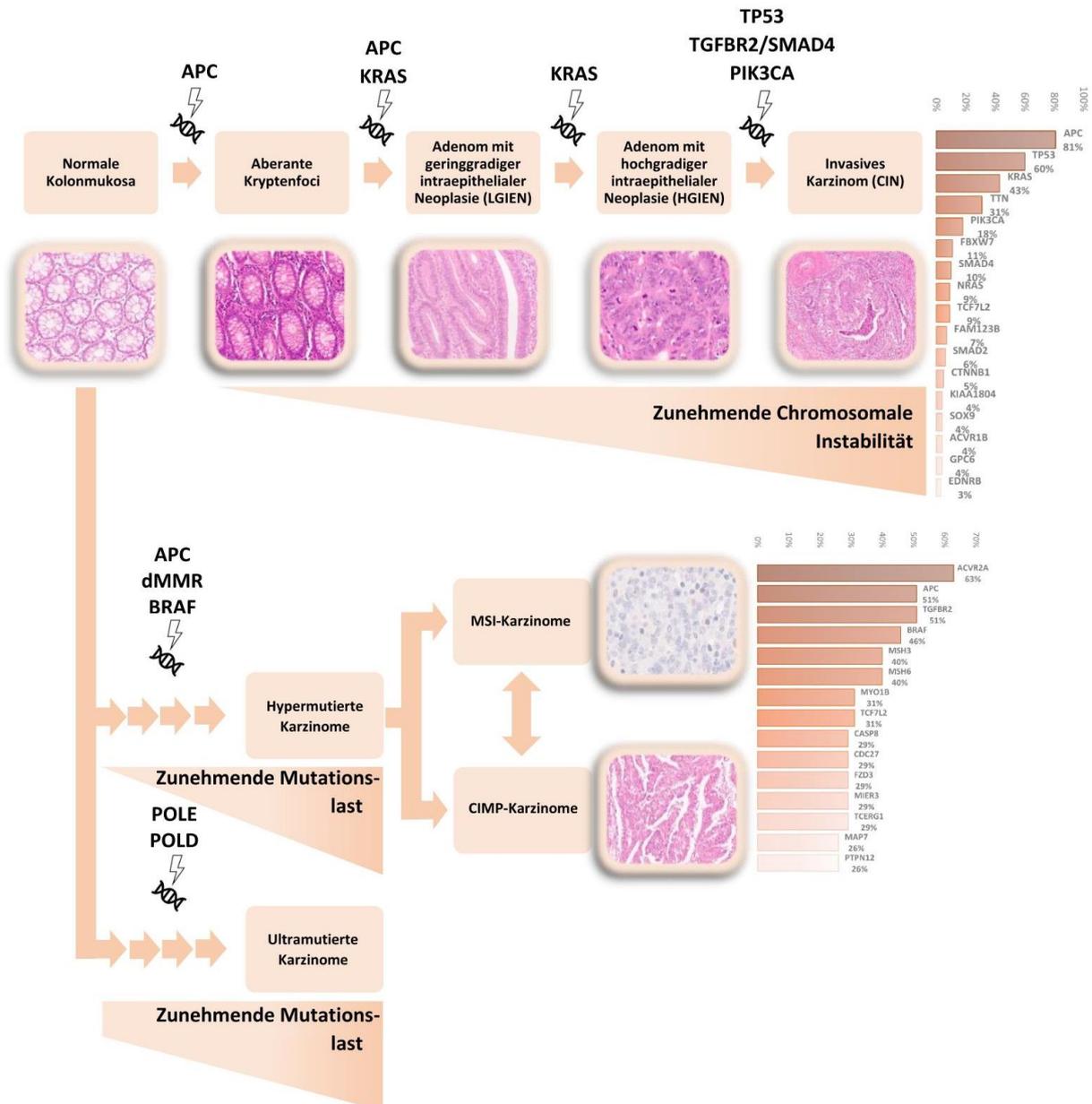


Abbildung 3: Schematische Darstellung der stufenweisen Karzinogenese Kolorektaler Karzinome gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz unter Berücksichtigung weiterer alternativer Karzinogenesewege (modifiziert nach [62, 75, 78, 80, 83]).

Abzugrenzen von der Pathogenese klassischer KRK ist zudem auch der Karzinogeneseweg im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Hier sind die klassischen Treibermutationen der Initiationsphase sporadischer KRKs (*APC*, *KRAS*, *BRAF*) erst in

fortgeschrittenen Neoplasien nachweisbar und es stehen schon initial *TP53*-Alterationen im Vordergrund [88-90].

Ganz entscheidend ist zudem noch die Abgrenzung von den KRK, die im Rahmen hereditärer Syndrome auftreten. Die beiden häufigsten Vertreter dieser Gruppe stellen dabei das *Lynch-Syndrom* sowie die *familiäre adenomatöse Polyposis coli* dar, die jedoch insgesamt mit ca. 4,5% bzw. 1% vergleichsweise nur einen geringen Anteil aller KRK ausmachen [91, 92].

Erstere ist eine autosomal-dominant vererbte, mono-allele Mutationserkrankung der DNA-Mismatch-Reparatur-Gene, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines KRKs einhergeht [61, 93, 94]. In absteigender Reihenfolge der Inzidenz sind vor allem die MMR-Gene *MSH2* und seltener *MLH1*, *MSH6*, *PMS2* sowie vereinzelt benachbarte Genabschnitte (z.B. *EPCAM*, *LRRFIP2*) betroffen [94-97].

Die *familiäre adenomatöse Polyposis coli* ist ebenfalls ein autosomal-dominantes Syndrom, welchem eine Keimbahnmutation im *Adenomatosis-Polyposis-coli*-Tumorsuppressorgen (*APC*) zugrunde liegt und charakteristischerweise mit bis zu über 100 adenomatösen Polypen im Kolorektum und anderen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts einhergeht. Diese entwickeln sich im Laufe der Zeit im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz analog sporadischer KRK mit einer nahezu 100%igen Penetranz bis zur fünften Lebensdekade zu invasiven KRK [94, 98].

## 2.2 Klinische Implikationen der histopathologischen Diagnostik des Kolorektalen Karzinoms

Bei der Diagnostik und Behandlung von Patienten mit KRK stellt die pathologische Begutachtung einen zentralen Akteur in der medizinischen Versorgungskette dar. Dabei spielt sie nicht nur präoperativ bei der initialen differentialdiagnostischen Abklärung und Diagnosesicherung Malignom-verdächtiger Läsionen eine Rolle, welche bei der KRK-Diagnostik i.d.R. in Form einer Biopsie im koloskopischen Setting erfolgt, sondern ist auch richtungsweisend für die Wahl des weiteren Therapiekonzeptes. Dies sollte in einem interdisziplinären Tumorboard erarbeitet werden. Wird schließlich das KRK im Rahmen eines operativen Vorgehens reseziert, werden auf Grundlage des pathologischen Befundes die Behandlungsoptionen postoperativ reevaluiert und ggf. angepasst [5]. Hierbei konzentrieren sich die pathologischen Angaben im Wesentlichen auf zwei Gesichtspunkt:

Zum einen werden Aussagen über die Ausdehnung des Tumorgeschehens getroffen und damit die präoperativ (auch durch andere Modalitäten der Diagnostik) begonnene Ausbreitungsdiagnostik durch die Stadieneinteilung der pTNM-Klassifikation komplementiert.

Zusätzlich wird dies durch Angaben über eine Lymph- (L), Gefäß- (V) oder Perineuralscheideninvasion (Pn) und zum Resektionsstaus (R) ergänzt [6].

Zum anderen ist es nun Aufgabe der Pathologie den Tumor weiter anhand seiner morphologischen Eigenschaften zu typisieren. Dabei stellt die WHO-Klassifikation das Standardrichtlinienwerk zur histomorphologischen Charakterisierung dar und gibt zentrale morphologische Kriterien vor. Diese umfassen die Bestimmung des histologischen KRK-Subtyps, der Tumordifferenzierung durch das WHO-Grading-System (G) sowie die Kapazität zur zellulären Dissoziation, die durch den Parameter Tumour Budding (Bd) abgebildet wird [7].

### 2.2.1 Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome gemäß der TNM - Klassifikation

Hinsichtlich der pathologischen Ausbreitungsdiagnostik der KRK hat sich die Klassifikation nach dem TNM-System gegenüber anderen Klassifikationssystemen, wie dem Staging-System nach Dukes oder der Astler-Coller-Klassifikation, weltweit weitestgehend durchgesetzt und stellt einen der effektstärksten prognostischen Faktoren dar [11, 99-101]. Hierbei beschreibt das Akronym mit „T“ die lokale Ausbreitung des Primärtumors, welche sich überwiegend an den anatomisch-histologischen Wandschichten des Kolorektums orientiert, mit „N“ das Ausmaß des Befalls regionärer Lymphknoten, wobei bei der pathologischen Begutachtung mindestens 12 Lymphknoten erfasst werden sollten, sowie mit „M“ die Ausprägung von Fernmetastasen [6]. Hierbei sollte die pathologische Klassifikation (gekennzeichnet durch das Präfix „p“) nur Anwendung finden, wenn ein von klinischer Seite beschriebener auffälliger Befund (gekennzeichnet durch das Präfix „c“) auch durch vorausgegangener Probenentnahme histologisch als Karzinom gesichert worden ist [7]. Entsprechend des diagnostischen Settings kann die TNM-Klassifikation mit weiteren Präfixen präzisiert werden: a (Autopsie), r (Rezidiv-Situation), m (multiple Primärtumoren) sowie y (Zustand nach neoadjuvanter Therapie) [6]. Basierend auf der TNM-Klassifikation kann die pathologische Stadieneinteilung nach UICC abgeleitet werden, die alle Aspekte der TNM-Klassifikation in ein kombiniertes Tumorstadium translatiert. Aufgrund ihrer prognostischen Relevanz dient diese als Hilfsmittel zur Stratifizierung von Patientengruppen und stellt das Fundament der postoperativen Therapieentscheidung dar. So kann ab einem UICC-Stadium II optional eine adjuvante Chemotherapie unter Nutzen-Risiko-Abschätzung in Erwägung gezogen werden, während hingegen ab einem UICC III-Stadium bei Resektion in kurativer Absicht i.d.R. eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen wird [5, 6]. Tabelle 1 stellt die Kriterien der TNM-Klassifikation und Tabelle 2 die hieraus korrelierende UICC-Stadieneinteilung dar. Aufgrund der herausragenden prognostischen Relevanz der Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome gemäß der TNM -Klassifikation

Invasionstiefenbestimmung gab es über die vergangenen Jahre immer wieder Bestrebungen das T-Stadium (v.a. pT1 und pT3) bei der pathologischen Evaluation noch weiter kleinschrittig zu unterteilen [101-109]. Außerdem gibt es immer wieder Kritik daran, dass derzeit Tumorknötchen – diskontinuierliche Absiedelungen von Tumorzellen im Lymphabflussgebiet ohne Nachweis von regionären Lymphknotenstrukturen, entsprechend N1c nach der aktuellen TNM-Klassifikation - keine ausreichende Berücksichtigung in der Stadieneinteilung finden [110-112].

Tabelle 1: Klinische TNM-Klassifikation Kolorektaler Karzinome (modifiziert nach [6]).

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

Tabelle 2: Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome nach Union For International Cancer Control (UICC) (modifiziert nach [6])

UICC-Stadien - Kolon und Rektum			
<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium I</b>	T1, T2	N0	M0
<b>Stadium II</b>	T3, T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
<b>Stadium III</b>	Jedes T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
Stadium IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1c

## 2.2.2 Zentrale histomorphologische Parameter des Kolorektalen Karzinoms

### 2.2.2.1 WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts als diagnostisches Richtlinienwerk

Als diagnostisches Richtlinienwerk zur pathologischen Beurteilung von Tumoren gilt die mehrere Bände umfassende, von der „*International Agency for Research on Cancer*“ (IARC) herausgegebene WHO-Klassifikation der Tumore, welche in regelmäßigen Abständen aktualisiert wird und neben einem kurzen Abspann zu Klinik, Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese alle essenziellen diagnostisch-pathologischen Kriterien zusammenfasst. In der 2019 erschienenen 5. Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts richten die Autoren neben den histopathologischen Kriterien nun einen verstärkten Fokus auch auf molekularpathologische Eigenschaften [12]. Im entsprechenden Kapitel zu den Kolorektalen Karzinomen finden sich einschneidende Änderungen im Vergleich zur Vorausgabe aus dem Jahr 2010, welche die drei zentralen histomorphologischen Diagnosekriterien Tumorsubtypisierung, WHO-Grading und Tumour Budding betreffen.

So ist hinsichtlich Subtypisierung das *Kribriform-Komedo-ähnliche Adenokarzinom* nun nicht mehr vertreten und auch das Unterkapitel zu den sehr seltenen Varianten des KRK entfällt, welches u.a. das *Klarzellige Karzinom* und das *Panethzellreiche Papilläre Adenokarzinom* beinhaltet [11, 113, 114]. Neu hingegen ist die explizite Erwähnung des *Adenom-ähnlichen Adenokarzinoms* und die Umbenennung des *Spindelzell-Karzinoms* in *Karzinom mit sarkomatoider Komponente* [7, 114]. Das *Adenosquamöse Karzinom* und das *Undifferenzierte Karzinom* werden nun nicht mehr als eigenständige Entität betrachtet, sondern als Subtypen der Adenokarzinome eingeordnet [113, 114]. Eine genaue Auflistung der aktuell in der WHO-Klassifikation beschriebenen histopathologischen Subtypen sowie deren Charakteristika erfolgt im Kapitel „Histologische Subtypen des Kolorektalen Karzinoms“ dieser Arbeit.

Eine weitere wichtige Neuerung der aktuellen Ausgabe betrifft die Beschränkung des früher dreigliedrigen Grading-System in Grad 1 bis Grad 3 auf eine Einteilung in „*low-grade*“ und „*high-grade*“, bei der nun unabhängig vom prozentualen Tumoranteil der geringste Differenzierungsgrad abseits der Invasionsfront entscheidend ist [7, 113, 114]. Die Aufnahme von *Tumour Budding (Bd1 bis Bd3)* als eigenständiges dreigliedriges diagnostisch-prognostisches Kriterium und alternativem morphologischem Parameter ist ebenfalls neu und wird nach dem von der „*International Tumour Budding Consensus Conference*“ (ITBCC) definiertem Scoring-System evaluiert [7, 11]. Dabei kann Tumour Budding als ein morphologisches Korrelat der Entdifferenzierung im Sinne der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) angesehen werden, stellt einen unabhängigen prognostischen Marker hinsichtlich des Überlebens und Progressionsrisikos dar und sollte daher bei der Therapieentscheidung berücksichtigt werden [102, 115-118].

In einer vorausgegangenen Arbeit zur klinischen Relevanz dieser morphologischen Kriterien der überarbeiteten WHO-Klassifikation konnten wir zeigen, dass diese drei zentralen morphologischen Kriterien die Überlebensparameter der Patienten umfassend beeinflussen. Darüber hinaus konnten wir herausarbeiten, dass die Subtypisierung der KRK sowie insbesondere die Evaluation des Bd-Grades von herausragendem Stadien-unabhängigem prognostischem Wert sind, während hingegen das WHO-Grading nur eine untergeordnete prognostische Rolle bei den verschiedenen Subtypen des KRK spielt [11].

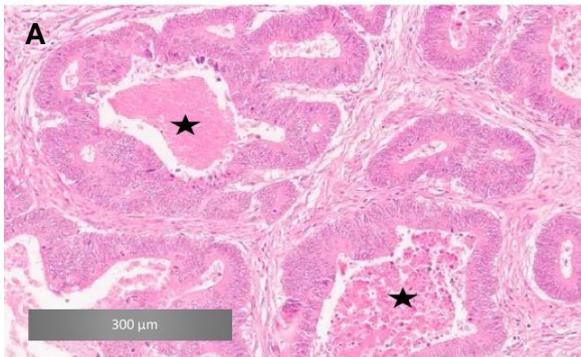
### 2.2.2.2 Histologische Subtypen des Kolorektalen Karzinoms

Adenokarzinome machen deutlich mehr als 90% aller Malignome des Kolons und Rektums aus. Neben dem *klassischen Adenokarzinom vom kolorektalen Typ (nicht anderweitig spezifiziert, Adenokarzinom NOS)* werden die Subtypen *Muzinöses Adenokarzinom, Mikropapilläres Adenokarzinom, Adenom-ähnliches Adenokarzinom, Serratiertes Adenokarzinom, Medulläres Adenokarzinom, Siegelringzelliges Karzinom, Adenosquamöses Karzinom, undifferenziertes Karzinom* und *Karzinom mit sarkomatoider Komponente* unterschieden [7]. Die WHO-Klassifikation listet in der aktuellen Ausgabe *Neuroendokrine Karzinome (NEC)* und deren Unterform *gemischte adenoneuroendokrine Karzinome (MANEC)* als schlecht differenzierte Formen der *neuroendokrinen Neoplasien (NEN)*. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass diese den Adenokarzinomen genetisch sehr nahestehen [119], werden sie in dieser Arbeit bei unseren Analysen unter den Subtypen der Karzinome mit aufgenommen. Daneben machen andere Tumorarten einen vergleichsweise geringen Anteil aus. Hierzu gehören neben dem seltenen *primären Plattenepithelkarzinom* [120, 121] und weiteren seltenen Karzinomen, die anderem Ursprungsgewebe ähneln, beispielsweise auch nicht-epitheliale Tumoren und *primäre Melanome* [9, 113]. Innerhalb der histologischen Subtypen des Adenokarzinoms zeigen sich nicht nur eine erhebliche Varianz bezüglich der Tumorbiologie und des klinischen Verlaufs, sondern auch deutliche Unterschiede in Bezug auf die Verteilung weiterer prognostischer Marker, wie etwa dem Tumour Budding, dem Grading oder dem TNM-/UICC-Stadium. Folglich stellt die histologische Subtypisierung einen wichtigen prognostischen Faktor dar [11, 122, 123].

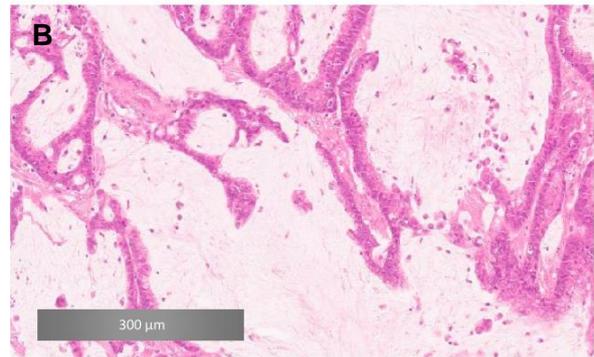
Das *klassische Adenokarzinom NOS* wird durch tubulär bis kribriforme und irregulär konfigurierte Drüsenverbände aus atypischen Epithelzellen mit umgebender desmoplastischer Stromareaktion und typischerweise intraluminal gelegenen nekrotischen Zellanteilen, den sog. *Schmutz- oder Komedonekrosen*, gekennzeichnet [92]. Dieser Karzinomtyp weist in der Regel noch eine verhältnismäßig hohe epitheliale Differenzierung auf und zeigt sich immunhistochemisch häufig positiv für Zytokeratin 20 und intestinale Transkriptionsfaktoren [14, 17, 124, 125]. Die zahlreichen hiervon abweichenden morphologischen Subtypen zeigen jeweils für sie spezifische Charakteristika, die in Tabelle 3 sowie Abbildung 4 veranschaulicht werden.

Tabelle 3: Übersicht über wesentliche Charakteristika der Subtypen des Kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach [7, 9, 126-129])

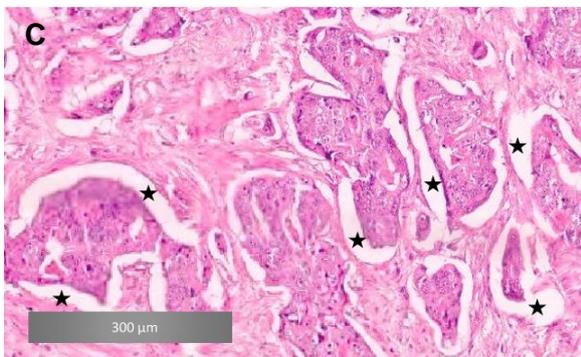
Histologischer Subtyp nach WHO-Klassifikation (2019)	Diagnostische Kriterien	Subtypenspezifisches Immunprofil	Molekulares Profil	Prognostischer Verlauf	Dominante Lokalisation	Mittleres Alter bei Erstdiagnose
Muzinöses Adenokarzinom	reichlich extrazelluläre Muzinablagerungen in >50% der Tumorgesamtfläche	dMMR, PDL1 +	KRAS <sup>mut</sup> , BRAF <sup>mut</sup> , MSI	vergleichbar Adenokarzinom NOS	Rechtes Kolon	60
Siegelringzelliges Karzinom	Siegelringzellen mit intrazytoplasmatischer Schleimbildung in >50% der Tumorgesamtfläche	dMMR, PDL1 +	KRAS <sup>mut</sup> , BRAF <sup>mut</sup> , MSI	aggressiv	Keine Seitenpräferenz	65
Mikropapilläres Adenokarzinom	Kleine, gering differenzierte Drüsen und Zellcluster mit invertierter Zellpolarität ("insight-out"-Struktur) und lakunenartigen Zwischenräumen am Epithel-Stroma-Übergang	invertierte MUC1-Expression, SOX2 +, NOTCH3 +, MUC2 -, alteriertes E-Cadherin	TP53 <sup>mut</sup> , KRAS <sup>mut</sup> , BRAF <sup>mut</sup> , CIN	aggressiv	Rechtes Kolon und Rektum	69
Medulläres Karzinom	solides, synzyiales Wachstumsmuster mit "pushing border"-Charakter an der Invasionsfront, auffallende intra- und peritumorale Lymphozyteninfiltration	dMMR, CDX2 -, CK20 -, Calretinin +	MSI, BRAF <sup>mut</sup>	günstig	Rechtes Kolon	70
Serratiertes Adenokarzinom	sägezahnartige Drüsenkonfiguration, eosinophiles Zytoplasma, Vesikuläre Kerne bei erhaltener Polarität		KRAS <sup>mut</sup> , BRAF <sup>mut</sup> , (MSI)	aggressiv	Rechtes Kolon und Rektum	67
Adenom-ähnliches Adenokarzinom	villöse Drüsen mit low-grade Atypien in >50% der Tumorgesamtfläche		KRAS <sup>mut</sup>	günstig	Linkes Kolon	66
Karzinom mit sarkomatoider Komponente	biphasisches Karzinom mit glandulär-epithelialen Anteile neben mesenchymalen Komponenten mit myxoid erscheinendem Stroma, Spindel- und Riesenzellen sowie rhabdoiden Zellen	Vimentin +, CK +		aggressiv	Linkes Kolon und Rektum	70
Adenosquamöses Karzinom	Plattenepithelial differenzierte neben glandulär differenzierter Komponente	p63 +, CK5/6 +, CD44 +		aggressiv	Rechtes Kolon	60
Undifferenziertes Karzinom	epitheliale, allenfalls minimale glanduläre Differenzierung	CK +, andere Differenzierungsmarker -		aggressiv	Keine Seitenpräferenz	70
Neuroendokrines Karzinom/ MANEC	schlecht differenzierte klein- (SCNEC) oder großzellige (LCNEC), solide-organoid konfigurierte Epithelverbände mit trabekulärem bis rosetten-, nest- oder palisadenartigem Wachstumsmuster, schwere Kernatypien, hohe Mitoseaktivität, ggf. gemischt mit Anteilen einer Adenokarzinomkomponente in mindestens 30% der Tumorgesamtfläche (MANEC)	Synaptophysin +, Chromogranin +, CD56 +, Neuronenspezifische Enolase +, (SSTR2A +), hohe Ki-67-Proliferationsrate	TP53 <sup>mut</sup> , RB1 <sup>mut</sup> , APC <sup>mut</sup> , KRAS <sup>mut</sup> , BRAF <sup>mut</sup> , SMAD4 <sup>mut</sup> , FHIT (3p) <sup>mut</sup> , DCC <sup>mut</sup> , MEN1 <sup>mut</sup> , FOXP2 <sup>mut</sup> , SMARCA4 <sup>mut</sup> , BCL9 <sup>mut</sup>	aggressiv	Rechtes Kolon	65



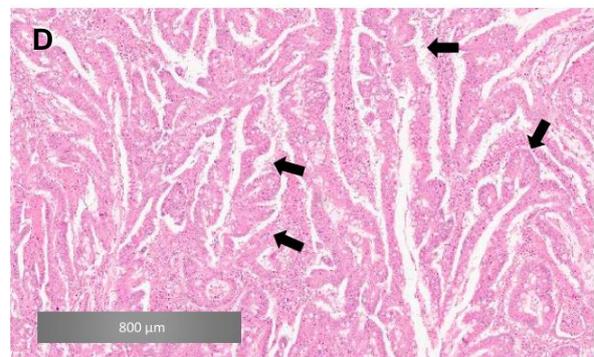
(A) Adenokarzinom NOS mit hier gut differenzierten Drüsenanschnitten (low-grade), Stromadesmoplasie und intraluminal gelegenen Komedonekrosen (Stern).



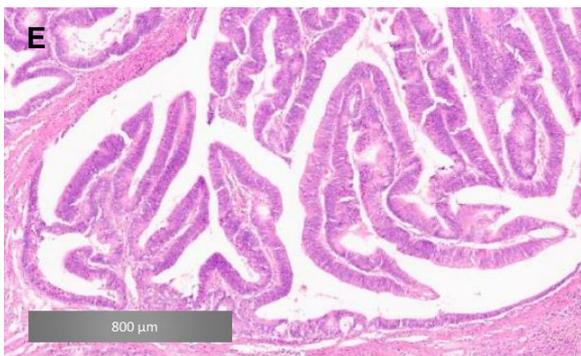
(B) Muzinöses Adenokarzinom. Es zeigen sich zwischen geschichtet gelagerten malignen Epithelzellen extrazelluläre Schleimmassen und darin eingestreut einzelne Tumorzellen.



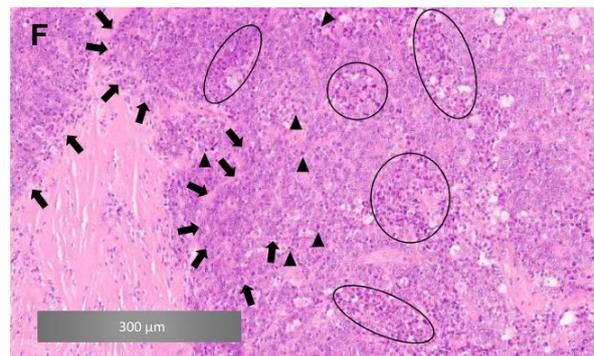
(C) Mikropapilläres Adenokarzinom mit charakteristischerweise kleindrüsigem Erscheinungsbild und Zwischenräumen (Sterne) am Übergang vom Drüsenepithel zum Stroma.



(D) Serratiertes Adenokarzinom mit typischer sägezahnartiger Drüsenarchitektur (Pfeile) bei erhaltener Polarität der Kerne und reichlich eosinophilem Zytoplasma.



(E) Adenom-ähnliches Adenokarzinom mit villös anmutenden gut differenzierten Drüsenanteilen und geringer Desmoplasie an der Invasionsfront.



(F) Medulläres Adenokarzinom mit solidem Tumorwachstum gering differenzierter Drüsen. Bei genauerer Betrachtung zeigen die malignen Zellen ein synzytiales Wachstumsmuster mit vesikulären Kernen, prominenten Nukleoli und reichlich eosinophilem Zytoplasma (Pfeile). Außerdem kommen sowohl intraepithelial (Pfeilspitzen) als auch intratumoral (Kreis) zahlreiche Lymphozyten zur Darstellung.

Abbildung 4: Histomorphologische Übersicht über die häufigsten Subtypen des Kolorektalen Karzinoms (jeweils in HE-Färbung).

### 2.2.2.3 WHO-Grading

Das *WHO-Grading* richtet sich beim KRK rein morphologisch nach dem Grad der Drüsenausbildung, wobei die am wenigsten differenzierteste Komponente abseits der Invasionsfront entscheidungsgebend sein sollte [7]. Entgegen den vorausgegangenen WHO-Empfehlungen wird derzeit nur noch eine dichotome Einteilung in „*low-grade*“- und „*high-grade*“- Karzinome vorgenommen. Die ehemals dreigliedrige Einteilung, die unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils an der Tumorgesamtfläche in gut (G1; >95%), moderat (G2; 50-95%) und schlecht (G3; <50%) differenzierte, wurde verlassen [7, 113, 130]. Jedoch ist die Anwendbarkeit des Grading-Systems formal auf Adenokarzinome vom NOS-Typ limitiert und die rein drüsenorientierte Betrachtungsweise wurde wiederholt kritisiert. Einige Subtypen (v.a. das Medulläre Karzinom) weisen eine geringe Drüsenausbildung aus, obwohl sie i.d.R. eine günstige Prognose an den Tag legen, während hingegen andere Subtypen mit ausgeprägter Drüsenarchitektur (z.B. das Mikropapilläre Adenokarzinom) vergleichsweise schlechte Prognoseparameter zeigen [11, 113, 129, 131]. Auch wird des Öfteren argumentiert, dass mikrosatelliteninstabile Karzinome, die u.a. auch eine statistische Häufung in bestimmten Subtypen mit geringer Drüsendifferenzierung (vgl. Medulläre Karzinome, Siegelringzellige Karzinome oder Muzinöse Adenokarzinome) aufweisen, prognostisch signifikant besser verlaufen als ihr mikrosatellitenstabiles Pendant. Deshalb sollte von diesem Standpunkt aus betrachtet auch der Mikrosatellitenstatus im Grading-System Berücksichtigung finden, was in der aktuellen WHO-Klassifikation nicht der Fall ist [92, 114, 130, 132-135]. Das Grading der NECs folgt ebenfalls diesen Grading-Kriterien, womit sie definitionsgemäß immer als „*high-grade*“ zu klassifizieren sind [136].

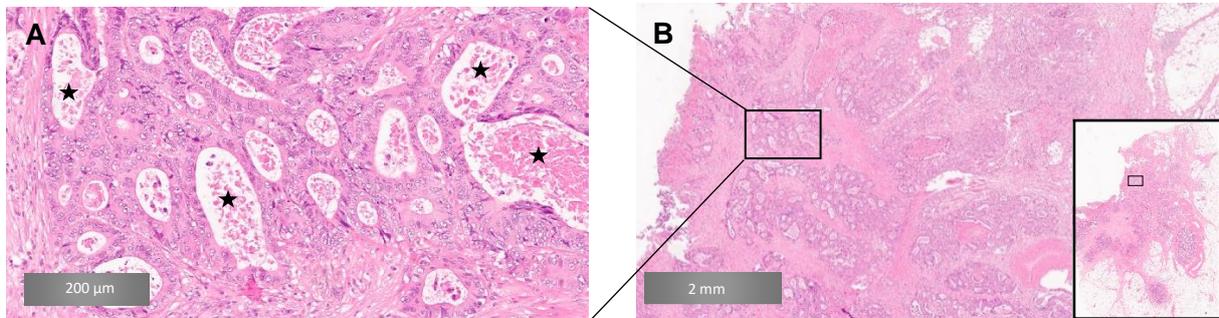


Abbildung 5: Low-grade Adenokarzinom NOS (jeweils HE-Färbung)

(A) Es zeigen sich gut differenzierte Drüsenabschnitte eines low-grade Adenokarzinoms NOS des Kolon ascendens mit deutlich erkennbarem Lumen und dort gelegenen Komedonekrosen (Sterne).

(B) Auch in der Übersichtsaufnahme wird deutlich, dass der Tumor bis in die Tela subserosa reichend von diesen gut differenzierten glandulären Strukturen aufgebaut wird. Das Fenster verdeutlicht noch einmal die subserosale Infiltration entsprechend eines pT3-Stadiums.

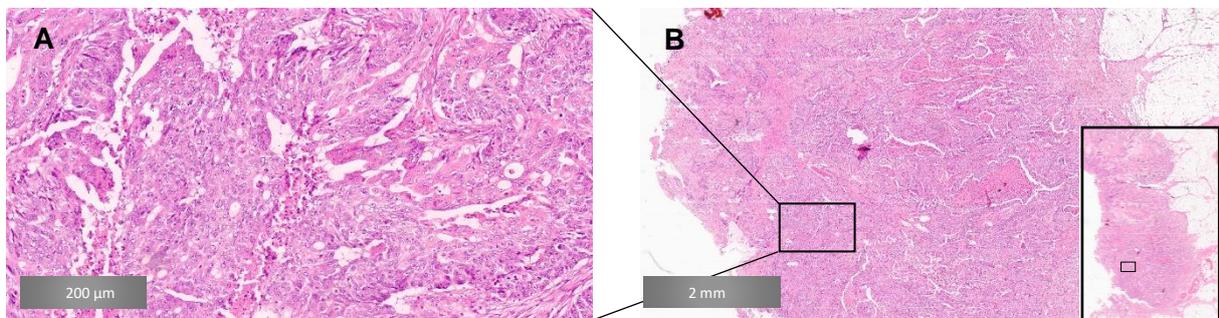


Abbildung 6: High-grade Adenokarzinom NOS (jeweils HE-Färbung)

(A) Es zeigen sich zwischen nur noch spärlichen Stromaanteilen gering differenzierte Drüsenanschnitte eines high-grade Adenokarzinoms NOS des Kolon sigmoideums.

(B) In der Übersichtsaufnahme wird das zellreiche Wachstumsmuster dieses Adenokarzinoms mit kaum noch glandulärer Differenzierung in nahezu der gesamten Tumormasse deutlich. In diesem Fall infiltriert die Neoplasie die Tela subserosa entsprechend eines pT3-Stadiums (Fenster).

#### 2.2.2.4 Tumour Budding

Als *Tumour Budding (Bd)* wird das Vorhandensein von invasiven Einzelzellen oder Tumorzellverbänden  $< 5$  Zellen bezeichnet, die von einer desmoplastischen Reaktion begleitet werden [7, 137]. Obwohl *Tumour Budding* schon seit längerer Zeit als prognostisch-morphologischer Marker zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen hat, findet es erst seit der Aktualisierung der WHO-Klassifikation im Jahr 2019 unter den diagnostischen Kriterien des KRK Berücksichtigung [7]. *Tumour Budding* wird im KRK nach einem dreigliedrigen Scoring-System bewertet, welches auf einem internationalen Konsensus-System (ITBCC) basiert. Die Evaluation der *Budding*-Aktivität erfolgt am HE-Schnitt mittels eines standardisierten Vorgehens in der 20x-Vergrößerung ( $\cong 0,785 \text{ mm}^2$ ) im Areal, welches in der Übersichtsvergrößerung suspekt auf die höchste *Budding*-Aktivität ist. Demnach werden Karzinome, die zwischen 0 bis 4 Buds an ihrer Invasionsfront zeigen als *Bd1*, jene mit 5 bis 9 Buds als *Bd2* und jene über 10 Buds als *Bd3* klassifiziert [116]. Wir konnten in vorausgegangenen Analysen nachweisen, dass *Tumour Budding* ein extrem starker Prognosefaktor ist, der die Prognosekraft des klassischen WHO-Gradings deutlich übersteigt [11]. Außerdem ist eine gesteigerte *Budding*-Aktivität mit weiteren prognostisch ungünstigen morphologischen Parametern korreliert [11, 102, 115, 117, 138, 139]. Auf molekularbiologischer Ebene wird *Tumour Budding* als Ausdruck der *Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT)* angesehen und wird mit einer Matrix-Metalloproteinase-

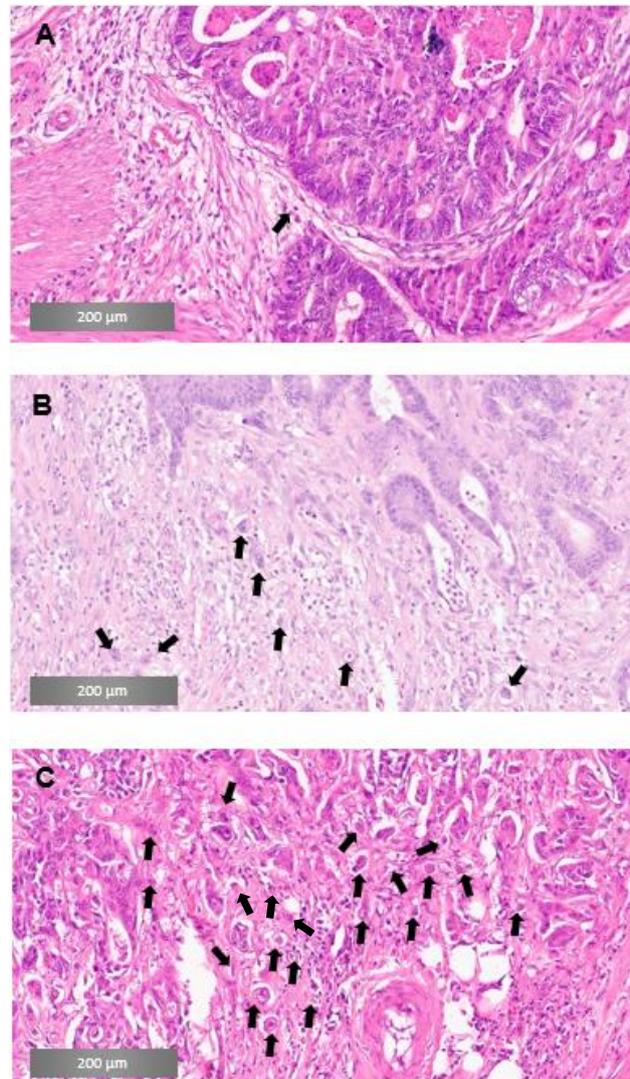


Abbildung 7: *Tumour Budding* in verschiedenen Stadien (jeweils in HE-Färbung)

(A) *Bd1*-Tumor (geringgradig) mit allenfalls geringer *Budding*-Aktivität (Pfeil) im Stroma an der Invasionsfront.

(B) Dieser Tumor zeigt mehrere Buds (Pfeile) an seiner Invasionsfront und sollte als *Bd2* (mäßiggradig) klassifiziert werden.

(C) *Bd3*-Tumor (hochgradig) mit weit über 10 Buds (Pfeile) an der Invasionsfront eines Mikropapillären Adenokarzinoms.

Überaktivität, einem Verlust von Adhäsionsmolekülen sowie Veränderungen im Zellzyklus und in Zellsignalwegen in Verbindung gebracht [140-146]. Da aufgrund dieser Eigenschaften hohe *Budding-Grade* eines Tumors mit fortgeschrittenen Tumorstadien und kürzeren Überlebensparametern einhergehen und von einer Anpassung des Therapieregimes profitieren, sollte eine entsprechende Evaluation in der histologisch-pathologischen Begutachtung eines KRK unter Berücksichtigung Subtypen-spezifischer Besonderheiten erfolgen [11, 102, 116, 117, 139, 147-154].

## 2.3 CDX2 und SATB2 als Marker kolorektaler Differenzierung

### 2.3.1 Caudal-related Homeobox Transcription Factor CDX2

#### 2.3.1.1 Physiologie und Pathophysiologie von CDX2

Der ***Caudal-related Homeobox Transcription Factor 2 (CDX2)*** ist auf Chromosom 13 q12.2 lokalisiert und gehört entsprechend seines Namens zur Gruppe der Homeobox-Gene, die für ein spezifisches Protein, die Homeodomaine, kodieren. Homeodomänen können als Transkriptionsfaktoren spezifisch an DNA-Sequenzen binden und spielen bei der Differenzierung und Ausreifung von Organen und Zellen in der Morpho- und Histogenese im Allgemeinen eine wichtige Rolle [155, 156]. Dem Transkriptionsfaktor CDX2 speziell wird eine Funktion bei der intestinalen Differenzierung und Zellproliferation zugeschrieben und kann bereits embryonal in den Zellen des Entoderms und frühzeitig im Epithel des sich daraus entwickelnden unteren Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden [156-163]. Darüber hinaus nimmt es eine Steuerfunktion bei der plazentaren Entwicklung und beim axialen embryonalen Wachstum ein [157, 164-166]. In zahlreichen (experimentellen) Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von CDX2 weitestgehend auf das Epithel des unteren Gastrointestinaltrakts begrenzt ist und der Grad der Expression mit der epithelialen Differenzierung in den Kolonkrypten korreliert [158, 167-170].

Aus biologischer Sicht ist jedoch nach wie vor unklar, wie die Rolle von CDX2 in der Karzinogenese des KRK einzustufen ist. Während einige Autoren CDX2 eine tumorsuppressive Wirkung zuschreiben [171, 172], ordnen andere CDX2 der Gruppe der Abstammungslinien-spezifischen Onkogene, sog. „*lineage-survival-oncogene*“, zu [173] und wieder andere reihen CDX2 in die Gruppe der *Proto-Onkogene mit Tumorsuppressor-Funktion* ein, die kontextabhängig sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressorgene agieren und entweder zu einer Hoch- oder Herunterregulation assoziierter weiterer Proteine führen [174].

Dementsprechend ist CDX2 an einer Vielzahl zentraler Genregulationsvorgängen beteiligt [175], die die Enhancer- oder Promotorbereiche zahlreicher Gene (u.a. *APC*, *GSK-3 $\beta$* , *AXIN2*, *MUCDHL*) entscheidender Signalwege der Karzinogenese des KRK betreffen [176-179]. Daneben ist CDX2 in ein komplexes Netzwerk weiterer „Hallmarks of cancer“ [180] integriert, das neben einer Beeinflussung der Zellapoptose, Zellproliferation und des Zellzyklus auch bei der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT), Metastasierung und den Wechselwirkungen mit dem Tumormilieu eine Rolle spielt [176, 179, 181-193] und durch nicht-transkriptionelle Mechanismen sowie epigenetische Modifikationen in weitere Signalkaskaden eingreifen kann [185, 188, 189, 194-196].

Morphologisch gibt es einige Hinweise dafür, dass CDX2 bzw. dessen Verlust eine Assoziation zu bestimmten Karzinomgruppen und einer distinkten Pathogenese aufweist. So wurde eine defiziente CDX2-Expression von einigen Studien in Verbindung mit Karzinomen gebracht, die eine Mikrosatelliteninstabilität, BRAF-Mutationen, einen CIMP-Phänotyp sowie eine serratierte oder gering differenzierte, großzellige Morphologie aufwiesen [197-206]. Außerdem können diese meist dem molekularen Subtypen CMS1 zugeordnet werden [207, 208].

Dalerba und Kollegen gelang es schließlich in einer im *New England Journal of Medicine* publizierten Arbeit einen CDX2-Verlust mit einem ungünstigen prognostischen Verlauf im UICC II/III-Stadium zu assoziieren [209] und einige andere Studien attribuierten CDX2-defizienten Karzinomen weitere prognostisch ungünstige Eigenschaften (z.B. fortgeschrittene Tumorstadien, Grading, Gefäßinvasion, Fernmetastasen), wenngleich diese Aussagen zwischen den Studien teils variieren [14, 16, 197, 198, 200, 201, 209-216].

#### 2.3.1.2 Stellenwert von CDX2 bei der histopathologischen Begutachtung

Da sich die Expression von CDX2 weitestgehend auf den unteren Intestinaltrakt beschränkt und sich (bis auf Ausnahmen) spezifisch für Karzinome des Kolorektums immunreaktiv zeigt, wird CDX2 in der histopathologischen Diagnostik als Marker kolorektaler Differenzierung eingesetzt [15, 169, 214, 217]. Im Rahmen der Routinediagnostik erfolgt die Bestimmung von CDX2 in der Regel über immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CDX2, die eine nukleäre Expression des Markers anzeigen [14, 16, 217]. Hierbei liegt ein bedeutender Vorteil von CDX2 gegenüber anderen IHC-basierten Untersuchungen in seiner Natur als Transkriptionsfaktor, da diese meist ein eindeutiges nukleäres Signal liefern und weniger falsch-positive Ereignisse generieren als es vergleichsweise bei zytoplasmatischen IHC-Markern der Fall ist [13, 14, 218].

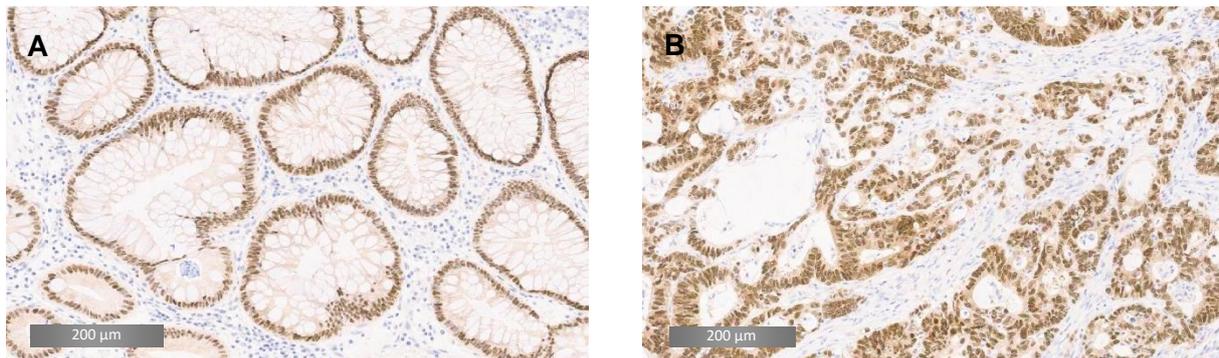


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von CDX2. (A) zeigt eine starke nukleäre Expression von CDX2 in dysplasiefreiem Epithel der Kolonkrypten, während hingegen (B) eine starke Expression in atypischen Kolonepithelzellen eines Mikropapillären Adenokarzinoms darstellt.

Klinisch-diagnostisch von großer Bedeutung ist CDX2 v.a. bei der histopathologischen Tumordiagnostik zur Einordnung von Metastasen. Hier bietet CDX2 einen reliablen Marker, der zuverlässig Metastasen aus dem kolorektalen System identifizieren kann, wenngleich die Spezifität durch Positivität einiger weiterer distinkter Karzinomentitäten (z.B. aus dem Pankreas, Magen, Dünndarm, Ovar) herabgesetzt wird. Diese zeigen jedoch häufig geringere immunhistochemische Expressionsgrade und ein diffuses Verteilungsmuster CDX2-positiver Zellen, welche insgesamt übertragen auf das KRK als schwach eingestuft werden würden [13-16]. Auch bei Karzinomen, die sich primär im Kolorektum manifestieren, kann CDX2 zur Differenzierung zwischen Primären KRK und Schleimhautmetastasen herangezogen werden [219].

## 2.3.2 Special AT-rich Sequence-binding Protein 2 (SATB2)

### 2.3.2.1 Physiologie und Pathophysiologie von SATB2

Der Transkriptionsfaktor **Special AT-rich Sequence-binding Protein 2 (SATB2)** gehört der Familie der „Nuclear-Matrix-Attachment-Regions“ (MARs)-bindenden Proteinen an und wird mit seinem entsprechenden Gen auf Chromosom 2 q33.1 lokalisiert [220, 221]. MARs sind regulatorisch aktive DNA-Sequenzen, die besonders reich an den Basen Adenin und Thymin sind. Durch ihre Beteiligung an der Chromatin-Organisation ermöglichen sie es Enhancern über weite Distanzen auf die Genexpression Einfluss zu nehmen und somit das Repertoire von Chromatin-Modifikationen (u.a. durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen) zu erweitern [176, 222-227]. Erstmals auffällig wurde SATB2 v.a. im Zusammenhang mit einem autosomal-dominant vererbten genetischen Syndrom, welches sich als Multisystemerkrankung durch eine dysmorphe Entwicklung multipler Körperregionen mit kraniofazialer und skelettaler Betonung sowie einer neurologischen Entwicklungsbeeinträchtigung mit konsekutiven

Special AT-rich Sequence-binding Protein 2 (SATB2)

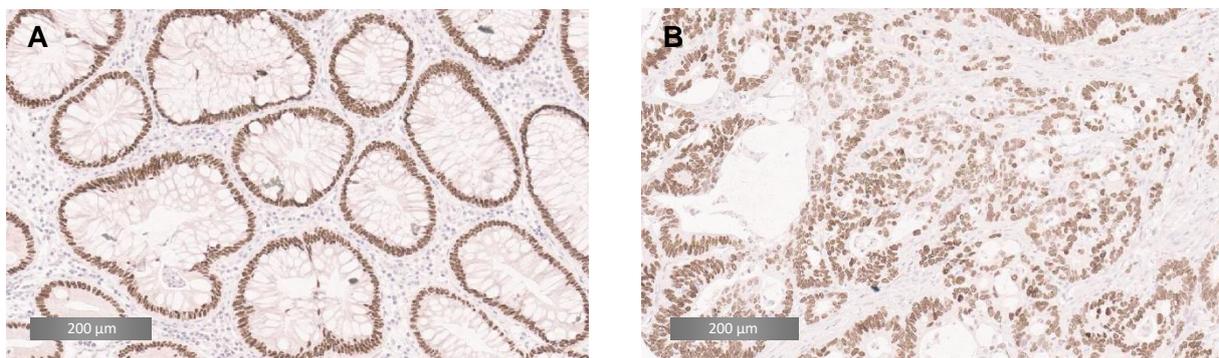
psychosozialen Abnormalitäten manifestiert [228, 229]. Entsprechend seiner Natur als *MAR*-bindender Transkriptionsfaktor ist SATB2 an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen in der Ontogenese beteiligt und ist in seinen funktionellen Domänen artübergreifend stark konserviert [230, 231]. In Protein-Analysen zeigt SATB2 eine starke Expression in Epithelzellen des unteren Gastrointestinaltrakts und betont in besonderem Ausmaß die kolorektale Differenzierung. Daneben wird es mit deutlich geringerer Intensität in kortikalen Neuronen, Nieren-, Hoden-, Hippocampus- und Globus caudatus-Gewebe exprimiert und ist an der Differenzierung von Neuronen der oberen Kortexschicht und Ausrichtung der axonalen Projektion kortiko-kortikaler Neuronen beteiligt [220, 226, 232, 233]. Da SATB2 bei der Osteogenese und osteoblastären Differenzierung ebenfalls eine Rolle zugeschrieben wird, kann es als osteogener Differenzierungsmarker eingesetzt werden [220, 234, 235]. Vor dem Hintergrund dieser scheinbar exklusiven SATB2-Expression auf spezifische Gewebearten - mit besonders hoher Spezifität für kolorektale Epithelzellen - ist analog zu CDX2 die Idee entstanden, SATB2 als komplementären IHC-Marker in der Tumordiagnostik einzusetzen [17]. Wenngleich SATB2 eine gewebespezifische Wirkungsweise zu haben scheint, sind die genauen biologischen Interaktionen von SATB2 in der Karzinogenese des KRK noch weitestgehend unbekannt [236]. Bis dato bekannt ist, dass SATB2 als *Tumorsuppressor* Einfluss auf Tumorexpansion und Metastasierung hat und die Epithelial-Mesenchymale-Transition durch Inhibition von *SNAIL*, einem Schlüsselregulator der EMT, blockiert [237-239]. Weiter scheint SATB2 an zahlreichen regulatorischen Prozessen beteiligt zu sein, die durch verschiedene Acetylierungs-, Demethylierungs- und Phosphorylierungszustände von Promotorregionen die Aktivierung diverser Gene in entscheidenden Karzinogenese-Signalwegen (u.a. von *ERK5* im *MAPK-Signalweg*) beeinflussen, oder SATB2 direkt einige Stammzellmarker-Gene (u.a. *CD133*, *CD44*, *AXIN2*, *MEIS2*, *NANOG*) reguliert sowie immunmodulatorisch wirken kann [239-244].

Übereinstimmend mit den experimentellen Beobachtungen, dass die Expression von SATB2 Einfluss auf die EMT hat, konnte im KRK ein SATB2-Expressionsverlust mit prognostisch ungünstigen morphologischen Eigenschaften, wie etwa einem dissoziativen Wachstum, einer Metastasierung oder einer fortgeschrittenen Tumorexpansion, assoziiert werden [245-248].

#### 2.3.2.2 Stellenwert von SATB2 bei der histopathologischen Begutachtung

In der histopathologischen Diagnostik hat sich SATB2 zunehmend als komplementärer Marker zu CDX2 etabliert und wird u.a. zur Identifikation des kolorektalen Ursprungs bei der Abklärung von Metastasen und bei der Primarius-Suche eingesetzt [13, 17, 18]. Dort kann es auch spezielle Subtypen (z.B. Siegelringzellige Karzinome, Medulläre Adenokarzinome), die sich

rein morphologisch oft schwierig einem Ursprungsgewebe zuordnen lassen und bei denen gängige gastrointestinale IHC-Marker (z.B. CDX2, CK20) oft nicht wesentlich zur Diagnose beitragen, mit hoher Spezifität als dem unteren Gastrointestinaltrakt zugehörig identifizieren [245, 249]. Da SATB2 als *MARs*-Protein eine Schlüsselfunktion bei der Chromatinorganisation und folglich auch der Enhancer-Wirkung einnimmt und dementsprechend seinen Wirkort im Nukleoplasma entfaltet, zeigt es analog zu CDX2 in der IHC-Untersuchung eine starke nukleäre Positivität. Somit eignet sich SATB2 ebenfalls als besonders zuverlässiger IHC-Marker [218, 220, 223].



*Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von SATB2.*

*(A) zeigt eine starke nukleäre Expression von SATB2 in dysplasiefreiem Epithel der Kolonkrypten, während hingegen (B) eine starke Expression in atypischen Kolonepithelzellen eines Mikropapillären Adenokarzinoms darstellt. Man beachte die Ähnlichkeit der Expression zu CDX2 in Abbildung 8.*

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass SATB2 nur von einer sehr begrenzten Anzahl weiterer Gewebe- bzw. Tumorentitäten exprimiert wird. Diese unterscheiden sich jedoch auch schon vom histologischen Bild meist deutlich von der Morphologie des KRK. Es fällt deutlich häufiger negativ für Karzinome aus gastroösophagealen, pankreatikobiliären, gynäkologischen und pulmonalen Lokalisationen sowie aus dem Dünndarm aus als CDX2 [13, 17-19, 220, 222, 249-253]. Neben der Abgrenzung von KRK zu anderen Karzinomen kann SATB2 auch als Marker für osteoblastäre Differenzierung sowie bei der Unterscheidung zwischen Osteosarkomen und Ewing Sarkomen eingesetzt werden [221, 254].

### 3. Fragestellung, Hypothese und eigener Forschungsansatz dieser Arbeit

Die inter- und intratumorale Heterogenität in KRK und die damit einhergehenden unterschiedlichen biologischen Eigenschaften machen in der modernen Medizin eine präzise pathologische Diagnostik unabdingbar, um zuverlässige prognostisch-prädiktive Aussagen treffen und das Therapiekonzept entsprechend anpassen zu können [8, 10]. Dabei sind in der klinisch-pathologischen Diagnostik immunhistochemische Marker ein geeignetes und kosteneffizientes Mittel zur näheren Charakterisierung maligner Tumoren. Dies gilt insbesondere dann, wenn morphologische Parameter nicht spezifisch genug sind, um differenzierte Aussagen zu treffen [13]. In der immunhistochemischen Gewebeanalyse hat sich CDX2 in den vergangenen Jahren als sensitiver Marker intestinaler Differenzierung etabliert [13-16]. Magnusson et al. konnten als erste Arbeitsgruppe zeigen, dass auch der Transkriptionsfaktor SATB2 hochspezifisch die kolorektale Differenzierung nachweisen kann, und somit einen wertvollen komplementären Marker zu CDX2 bei differentialdiagnostischen Untersuchungen darstellt [17]. Dies wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt, wenngleich die Daten nicht ganz einheitlich bezüglich ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität sind [13, 18, 19]. In zahlreichen Studien konnte darüber hinaus ein prognostischer Wert dieser beiden immunhistochemischen Marker postuliert werden [197, 198, 209, 210, 212, 213, 216, 246-248], jedoch wurde nach wie vor keine vergleichende Aussage bezüglich der prognostischen Effektstärke getroffen und ebenso die Rolle weiterer morphologischer Faktoren nicht berücksichtigt. Vor diesem Hintergrund setzt sich diese Dissertationsschrift nicht nur mit der Frage auseinander, wie die Expression von CDX2 und SATB2 miteinander assoziiert sind, sondern untersucht auch mögliche Korrelationen des Expressionsverhaltens mit den zentralen histomorphologischen Parametern der WHO-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms (Histologischer Subtyp, Tumour Budding, WHO-Grading), dem Tumorstadium sowie dem klinischen Verlauf.

Ziele dieser Arbeit sind es, in einer gegenüberstellenden immunhistochemischen Analyse die beiden Transkriptionsfaktoren CDX2 und SATB2 bezüglich ihrer Expressionshäufigkeiten im Kolorektalen Karzinom zu vergleichen und spezifische histopathologische Charakteristika in Karzinomen mit verminderter oder fehlender Expression von CDX2 bzw. SATB2 herauszuarbeiten. Darüber hinaus sollen die prognostische Relevanz eines Expressionsverlust von CDX2 und von SATB2 dargestellt werden und hinsichtlich ihrer Wertigkeiten im Vergleich mit den zentralen histologischen WHO-Kriterien des Kolorektalen Karzinoms eingeordnet werden. In einer abschließenden Analyse soll evaluiert werden, ob durch einen der beiden Marker distinkte Prognosegruppen herausgearbeitet werden können,

die durch konventionelle Prognosefaktoren (wie die WHO-Kriterien oder das Tumorstadium) nicht identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise bereits in folgenden Artikeln in Journalen mit peer-Review-Verfahren publiziert:

Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases.

*Jesinghaus M, **Schmitt M**, Lang C, Reiser M, Scheiter A, Konukiewitz B, Steiger K, Silva M, Tschurtschenthaler M, Lange S, Foersch S, Becker KF, Saur D, Friess H, Halfter K, Engel J, Boxberg M, Pfarr N, Wilhelm D, Weichert W.*

*Am J Surg Pathol* **45**, 969-978 (2021).

**Impact Factor (2 Jahre): 6.298 [255]**

Loss of CDX2 in colorectal cancer is associated with histopathologic subtypes and microsatellite instability but is prognostically inferior to hematoxylin-eosin-based morphologic parameters from the WHO classification.

*Konukiewitz B, **Schmitt M**, Silva M, Pohl J, Lang C, Steiger K, Halfter K, Engel J, Schlitter AM, Boxberg M, Pfarr N, Wilhelm D, Foersch S, Tschurtschenthaler M, Weichert W, Jesinghaus M.*

*Br J Cancer* **125**, 1632-1646 (2021).

**Impact Factor (2 Jahre): 9.082 [255]**

Loss of SATB2 Occurs More Frequently Than CDX2 Loss in Colorectal Carcinoma and Identifies Particularly Aggressive Cancers in High-Risk Subgroups.

***Schmitt M**, Silva M, Konukiewitz B, Lang C, Steiger K, Halfter K, Engel J, Jank P, Pfarr N, Wilhelm D, Foersch S, Denkert C, Tschurtschenthaler M, Weichert W, Jesinghaus M.*

*Cancers (Basel)* **13** (2021).

**Impact Factor (2 Jahre): 6.575 [255]**

## 4. Material und Methodik

### 5.1 Kohorten-Zusammensetzung und Probenakquisition

Für die Kohorte wurde formalinfixiertes Paraffingewebe (FFPE) von 1039 primären KRK aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (TUM) extrahiert. Sämtliches Probenmaterial entstammt aus chirurgischen Resektionen von KRK am Klinikum rechts der Isar (MRI) der TUM, welche im Zeitraum von 1997 bis einschließlich 2019 dort an Patienten im Rahmen des pathologisch-diagnostischen und des chirurgisch-therapeutischen Modus erfolgt sind und umfassen alle Diagnosestadien der UICC. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Patient mehrmals z.B. in Form einer vorausgegangenen Probeexzision (PE), eines Rezidivs oder eines Zweitkarzinoms eingeschlossen wurde. Die entsprechenden klinisch-pathologischen Daten sowie die Überlebensdaten der Patienten wurden dem institutsinternen Informationssystem (NEXUS/PATHOLOGIE), dem Tumorregister München (TRM) sowie klinikumsinternen Aufzeichnungen entnommen. Eingeschlossene Patienten erhielten therapeutische Maßnahmen im Sinne der zum Zeitpunkt der Diagnose geltenden internen Richtlinien, die sich im Wesentlichen nach den Stadien-adaptierten Therapieempfehlungen der *Deutschen S3-Leitlinie für KRK der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)* richteten. Die Studie wurde im Rahmen eines Ethikvotums (Referenznummer: 252/16 s) von der Ethikkommission an der Fakultät für Medizin der TUM genehmigt.

Eingeschlossen wurden alle Karzinome, die den Kriterien der KRK nach der WHO-Klassifikation für Tumoren des Verdauungstrakts [7] entsprechen sowie *Neuroendokrine Karzinome* und *MANECs*, da diese genetisch den Adenokarzinomen nahestehen [119]. Ausschlusskriterien für die Studie waren neben unzureichend zugänglichen klinisch-pathologischen (Überlebens-)Daten und mangelnder Materialverfügbarkeit/-Beschaffenheit, Tumore der Appendix und *gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET)*.

## 5.2 Evaluation der zentralen pathologisch-histomorphologischen Diagnosekriterien

Die Evaluation der zentralen pathologisch-histomorphologischen Diagnosekriterien gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation für Tumoren des Verdauungstrakts erfolgte anhand von HE-gefärbten Schnitten repräsentativer ganzer Tumorquerschnitte unter dem Lichtmikroskop, wie sie üblicherweise in der klinisch-pathologischen Diagnostik Anwendung finden. Unter Supervision zweier erfahrener Pathologen im Bereich der gastrointestinalen Pathologie (Prof. Dr. med. Moritz Jesinghaus, Prof. Dr. med. Wilko Weichert), wurden alle 1039 KRK mit besonderem Augenmerk auf die aktualisierten zentralen Kriterien (histologischer Subtyp, Tumour Budding und WHO-Grading) reevaluiert und bezüglich Übereinstimmung mit weiteren Angaben (TNM, L, V, Pn, R) in den bestehenden pathologischen Gutachten überprüft. Die KRK-Subtypisierung und Grading-Klassifikation erfolgte anhand der einleitend beschriebenen Definitionen der WHO [7] sowie die Beurteilung der Tumour Budding-Aktivität gemäß der Empfehlung der „International Tumour Budding Consensus Conference“ [116] (vergleiche hierzu auch die Abbildungen 4-7 sowie Tabelle 3). Abschließend wurden stichprobenartig 100 KRK bezüglich ihres Subtyps verblindet erneut von einem weiteren Pathologen (Prof. Dr. med. Björn Konukiewitz) evaluiert und auf ihre Interrater-Reliabilität überprüft.

## 4.1 Immunhistochemische Aufbereitung und Evaluation

Die immunhistochemische Evaluation der im folgenden gelisteten Marker erfolgte an eigens dafür erstellten *Tissue Microarrays (TMA)*. Hierzu wurden nach initialem Screening der zugehörigen archivierten FFPE-Gewebeproben der oben beschriebenen Kohorte, jene tumortragenden Blöcke ausgewählt, die das jeweilige Karzinom am repräsentativsten darstellten. Daraufhin wurden manuell Areale mit hohem Tumorzellanteil im zentralen Karzinom sowie an dessen Invasionsfront eingezeichnet und mittels eines vollautomatischen Tissue Microarrayers (TMA Grandmaster, sysmex, Ungarn) jeweils 1mm messende Stanzzyylinder auf dem jeweiligen TMA für die nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen asserviert [256].

Für die immunhistochemische Aufbereitung der angefertigten TMAs wurden die entsprechenden Antikörper zum Nachweis der zu bestimmenden intestinalen Transkriptionsfaktoren verwendet (siehe unten) und mittels eines vollautomatischen IHC-Färbeautomaten (*BOND RXm System, Leica Biosystems, Deutschland*) an 2µm dicken Paraffin-Schnitten der TMAs immunhistochemisch gefärbt [257]. Hierzu wurden die TMAs nach initialer Entparaffinierung über die Dauer von 20 Minuten mittels *BOND Epitope Retrieval*

*Solution 1 (Leica Biosystems, Deutschland)*, einer pH6-Citrat-Puffer-basierten Fertiglösung zur Demaskierung der im Rahmen der Formalinfixierung potentiell modifizierten Epitope, vorbehandelt, um eine anschließende Epitop-Bindung des verwendeten Antikörpers zu verbessern [258]. Anschließend wurden die Antikörper der gewünschten Zielantigene auf das TMA-Gewebe appliziert und die Bindung der primären Antikörper mittels *BOND Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Deutschland)*, einem biotinfreien, polymeren Meerrettichperoxidase (HRP)-Linker-Antikörper-Konjugatsystem (Bestandteile: Wasserstoffperoxid, Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz, Poly-HRP-IgG-Reagenz, 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat (DAB), Kontrastfärbung mit Hämatoxylin) für die Anwendung im *BOND RXm-Färbeautomaten*, nachgewiesen [259]. Die Verwendung eines zusätzlichen Post-Primary-Antikörpers war somit nicht mehr nötig. Jeweilige Stanzproben für immunhistochemische Positiv- (dysplasiefrei Kolonschleimhaut) und Negativ-Kontrollen (Nierenrindengewebe) waren auf den TMAs vorhanden.

Alle TMA-Schnitte wurden mittels eines Slide-Scanners (*Aperio AT 2, Leica Biosystems, Deutschland*) digitalisiert [260] und unter Zuhilfenahme der entsprechenden digitalen Mikroskopier-Software (*Aperio ImageScope, Version 12.3.3, Leica Biosystems, Deutschland*) manuell ausgewertet [261].

#### 4.1.1 Evaluation der CDX2-Expression

Für den immunhistochemischen Nachweis CDX2-positiver Zellen wurde ein primärer monoklonaler Kaninchen-Antikörper der Firma *Abcam (EPR2764Y, Referenznummer: AB76541, Abcam, United Kingdom)* in einer Verdünnung von 1:500 verwendet [262] und die TMAs im IHC-Färbeautomaten entsprechend des oben beschriebenen Verfahrens gefärbt. Ein immunhistochemisch positives Resultat wurde nur bei einer eindeutig nukleären Expression des Markers angenommen. Hierfür wurden von jedem der 1039 Karzinomen unter Berücksichtigung von mindestens 500 Karzinomzellen der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen auf einer Skala von 0 bis 100 Prozent für jeweils der TMA-Stanzprobe aus dem zentralen Tumoranteil und der aus der Invasionsfront manuell ermittelt und ein prozentualer Summengesamtwert errechnet. Verblindet zu den klinisch-pathologischen Angaben wurden neben dem positiven Tumorzellanteil, die Färbeintensität und das Expressionsmuster CDX2-positiver Karzinomzellen, wie in Tabelle 4 und 5 dargestellt, evaluiert. Für die weiterführende statistische Analyse wurde schließlich die kontinuierliche Variable der prozentualen CDX2-Expression der Karzinomzellen in eine zweigliedrige CDX2-Gruppenklassifikation transformiert. Hierfür wurde der sog. *Cutoff-Finder [263]* verwendet (näheres siehe Kapitel „*Statistische Auswertung*“) und mittels diesem ein Cutoff-Wert zur CDX2-

Gruppenklassifikation in CDX2<sup>stark</sup> und CDX2<sup>negativ/schwach</sup> an der 10. Perzentile (entspricht 60% positiver Tumorzellen) definiert.

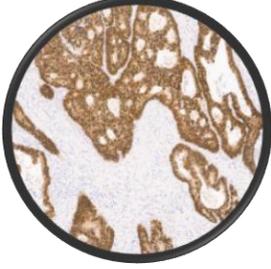
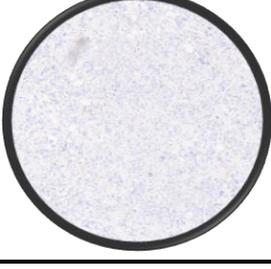
Abschließend wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse im Sinne der Interobserver-Reliabilität stichprobenartig in 150 Fällen von einem erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. med. Moritz Jesinghaus) verblindet reevaluiert und auf Konkordanz geprüft sowie die Ergebnisse aus den TMAs anhand von 20 willkürlich gewählten CDX2-gefärbten ganzen Tumorquerschnitten verglichen.

In der weiterführenden statistischen Analyse wurde die Assoziation der CDX2-Expression mit den zentralen klinisch-pathologischen und morphologischen Kriterien gemäß der WHO-Klassifikation für Tumoren des Verdauungstrakts (siehe entsprechende Kapitel dieser Arbeit) untersucht und mit der Expression von SATB2 korreliert.

Tabelle 4: Einteilung zur Beurteilung des CDX2-Expressionsmusters kolorektaler Karzinome im TMA (modifiziert nach [1]).

CDX2-Expressionsmuster	Beschreibung	Bild
<b>diffus</b>	CDX2 wird in allen Zellen homogen exprimiert mit allenfalls sehr begrenzten Ausfällen in Einzelzellen.	
<b>heterogen</b>	CDX2 wird geclustert exprimiert mit Anteilen von CDX2-exprimierenden Zellen und Anteilen mit komplettem CDX2-Expressionsausfall	
<b>fehlend</b>	Der immunhistochemische Nachweis fällt negativ aus; eine Färbeintensität lässt sich gänzlich nicht nachweisen.	

Tabelle 5: Einteilung zur Beurteilung der CDX2-Färbeintensität kolorektaler Karzinomzellen im TMA (modifiziert nach [1]).

CDX2-Färbeintensität	Beschreibung	Bild
<b>stark</b>	Färbeintensität entspricht weitestgehend deren von normalen Mukosa-Epithelzellen.	
<b>mittel</b>	Färbeintensität ist im Vergleich zur normalen Mukosa etwas reduziert, aber dennoch leicht zu identifizieren.	
<b>schwach</b>	Färbeintensität ist deutlich reduziert im Vergleich zur normalen Kolonmukosa, aber noch dezent vorhanden.	
<b>fehlend</b>	Der immunhistochemische Nachweis fällt negativ aus; eine Färbeintensität lässt sich gänzlich nicht nachweisen.	

#### 4.1.2 Evaluation der SATB2-Expression

Die immunhistochemische Evaluation von SATB2 erfolgte weitestgehend analog zu der von CDX2. Für den immunhistochemischen Nachweis von SATB2 wurde eine vorverdünnte Fertiglösung primärer monoklonaler Kaninchen-Antikörper der Firma *Cell Marque* (*EP281*, Referenznummer: *384R*, *Cell Marque*, USA) verwendet [264]. Auch hier wurde nur ein eindeutig nukleäres Signal als positives Testresultat eingestuft und der prozentuale Anteil positiver Karzinomzellen bei einer Mindestanzahl von 500 evaluierten Tumorzellen als Summengesamtwert auf einer Skala von 0 bis 100 Prozent aus den Ergebnissen der TMA-Probestanze des zentralen Tumoranteils und der Invasionsfront gebildet.

Ebenfalls wurde neben dem prozentualen Anteil SATB2-positiver Karzinomzellen deren Färbeintensität und Expressionsmuster evaluiert (vergleiche hierzu Tabelle 6 und 7) sowie 150 willkürlich ausgewählten Fälle von einem erfahrenen Pathologen (Prof. Dr. med. Moritz Jesinghaus) reevaluiert und auf Konkordanz der Ergebnisse überprüft sowie die Ergebnisse aus den TMAs mit denen von 20 willkürlich gewählten SATB2-gefärbten ganzen Tumorquerschnitten verglichen. Auch hier wurde der *Cutoff-Finder* [263] zur dichotomen Gruppenbildung eingesetzt und ein Cutoff-Wert an der 20. Perzentile (entspricht 70% positiver Tumorzellen) zur Festlegung der Expressionsgruppen SATB2<sup>stark</sup> und SATB2<sup>negativ/schwach</sup> definiert.

Ähnlich der statistischen Analyse von CDX2 wurde die Assoziation der SATB2-Expression mit den zentralen klinisch-pathologischen und morphologischen WHO-Kriterien ermittelt und vergleichende Untersuchungen zur CDX2-Expression unternommen.

Tabelle 6: Einteilung zur Beurteilung der SATB2-Färbeintensität kolorektaler Karzinomzellen im TMA (modifiziert nach [2]).

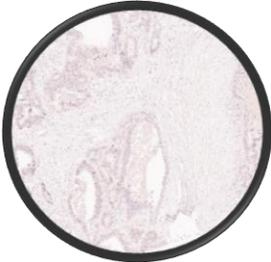
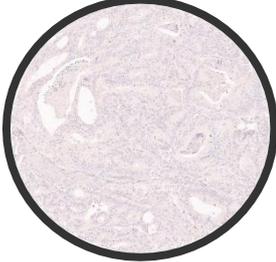
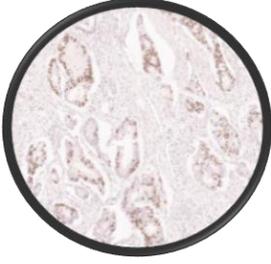
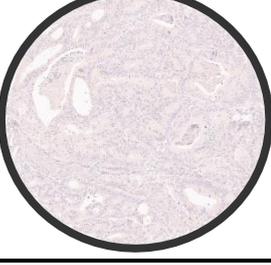
SATB2-Färbeintensität	Beschreibung	Bild
<b>stark</b>	Färbeintensität entspricht weitestgehend deren von normalen Mukosa-Epithelzellen.	
<b>mittel</b>	Färbeintensität ist im Vergleich zur normalen Mukosa etwas reduziert, aber dennoch leicht zu identifizieren.	
<b>schwach</b>	Färbeintensität ist deutlich reduziert im Vergleich zur normalen Kolonmukosa, aber noch dezent vorhanden.	
<b>fehlend</b>	Der immunhistochemische Nachweis fällt negativ aus; eine Färbeintensität lässt sich gänzlich nicht nachweisen.	

Tabelle 7: Einteilung zur Beurteilung des SATB2-Expressionsmusters kolorektaler Karzinome im TMA (modifiziert nach [2]).

SATB2-Expressionsmuster	Beschreibung	Bild
<b>diffus</b>	SATB2 wird in allen Zellen homogen exprimiert mit allenfalls sehr begrenzten Ausfällen in Einzelzellen.	
<b>heterogen</b>	SATB2 wird geclustert exprimiert mit Anteilen von SATB2-exprimierenden Zellen und Anteilen mit komplettem SATB2-Expressionsausfall	
<b>fehlend</b>	Der immunhistochemische Nachweis fällt negativ aus; eine Färbeintensität lässt sich gänzlich nicht nachweisen.	

#### 4.1.3 Evaluation des dMMR-Status

Zum Zweck der weiteren Stratifizierung in Subgruppen wurde neben den rein morphologischen Kriterien zusätzlich noch eine immunhistochemische Analyse der vier MMR-Proteine *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* an den vorliegenden TMAs als basaler molekularer Parameter zur Bestimmung der generellen Histogenese eines KRK durchgeführt. Diese wurden ähnlich der intestinalen Transkriptionsfaktoren CDX2 und SATB2 an einem vollautomatisierten IHC-Färbesystem (*VENTANA Benchmark XT*, Ventana Medical Systems/ Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) immunhistochemisch gefärbt [265]. Nach initialer Entparaffinierung wurden die TMAs für MLH1, MSH2 und PMS2 über die Dauer von 60 Minuten und für MSH6 für die Dauer von 30 Minuten mit einem pH6-Citrat-Puffer hitzevorbehandelt und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Hierzu wurden jeweils primäre monoklonale Maus-Antikörper verwendet (**PMS2**: anti-PMS2 (A16-4), Referenznummer: 760-5094, Ventana Medical Systems/ Roche Diagnostics GmbH, USA, fertig verdünnt; **MLH1**: anti-MLH1 (M1), Referenznummer: 760-5091, Ventana Medical Systems/ Roche Diagnostics GmbH,

USA, fertig verdünnt; **MSH2**: G219-1129, Referenznummer: 286M, Cell Marque, USA, Verdünnung 1:100; **MSH6**: 44/MSH6, Referenznummer: 610918, BD Biosciences, USA, Verdünnung 1:400)[266-269] und die Bindung der primären Antikörper mittels *UltraView Universal DAB Detection Kit* (Ventana Medical Systems/ Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) (Bestandteile: DAB-Inhibitor, HRP-Multimer, DAB-Chromogen, DAB-Wasserstoffperoxid, Kupfer) nachgewiesen [270]. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Analog zur Auswertung der intestinalen Transkriptionsfaktoren wurden auch hier die TMA's mittels Slide-Scanner (*Aperio AT 2*, Leica Biosystems, Deutschland) digitalisiert [260] und unter Zuhilfenahme der entsprechenden Viewing-Software (*Aperio ImageScope*, Version 12.3.3, Leica Biosystems, Deutschland) manuell ausgewertet [261].

Eine dMMR/ MSI wurde angenommen, wenn sich insgesamt weniger als 10% der Karzinomzellen positiv in den TMA-Stanzproben des zentralen Tumoranteils und der Invasionsfront für die Kombinationen MLH1/PMS2 oder MSH2/MSH6 zeigten. Da gezeigt werden konnte, dass ein immunhistochemisch isolierter Ausfall von PMS2 oder MSH6 indikativ für eine dMMR/MSI ist [271], wurden auch in unserer Studie isolierte Ausfälle dieser beiden Marker als MSI betrachtet. Zusätzlich wurden in 50 Fällen die Ergebnisse der IHC-dMMR-Analyse mit den Resultaten einer molekularen MSI-Testung einer vorangegangenen Studie, welche unter Zuhilfenahme des empfohlenen Marker-Panels *BAT25*, *BAT26*, *D5S346*, *D2S123* und *D17S250* erfolgte [272], verglichen und eine Übereinstimmung von 100% zwischen immunhistochemischer und molekularer Analyse festgestellt [11].

## 4.2 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden zum Vergleich zweier Gruppen bei qualitativen bzw. kategorialen Zielgrößen der  $\chi^2$ -Test nach Pearson sowie bei kleiner Stichprobengröße der Exakte Test nach Fisher zur Signifikanztestung verwendet. Quantitative Zielgrößen wurden zunächst auf ihre Normalverteilung hin mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft und in diesem Falle mit dem *t-Test für unverbundene Stichproben* ausgewertet. Um einen optimalen Cutoff-Wert für die Expression von SATB2 und CDX2 bei der Gruppendifinition zu ermitteln, wurde der *Cutoff-Finder*, ein öffentlich zugängliches Biostatistik-Programm, angewandt [263]. Als Korrektur für multiples Testen fand in geeigneten Fällen die *Methode nach Bonferroni* Anwendung [273]. Bei der Untersuchung der Überlebensdaten wurde für univariate Analysen die *Kaplan-Meier-Methode* angewandt, wobei folgende Ereigniszeiträume definiert wurden: Als *krankheitsspezifisches Überleben/Disease Specific Survival (DSS)* wurde der Zeitraum von der histopathologischen Diagnosestellung bis hin zum tumorabhängigen Versterben des

Patienten bezeichnet. Das *krankheitsfreie Überleben/Disease Free Survival (DFS)* beschreibt die Zeit bis zum Auftreten eines loko-regionären Rezidivs oder einer Fernmetastase und beim *Gesamtüberleben/Overall survival (OS)* wird das gesamte Überleben bis zum Tod betrachtet, unabhängig davon, ob er kausal mit der Tumorerkrankung in Verbindung steht oder nicht. Als Endpunkte wurden die jeweiligen Ereignisse oder ein Verlust der Patientennachverfolgung definiert, wobei im Falle Letzteren die Patientenüberlebensdaten auf den Zeitpunkt der letzten Dokumentation in den oben beschriebenen Informationssystemen zensiert wurden. Generell wurde die Überlebensanalyse auf einen Nachsorgezeitraum von maximal 120 Monaten begrenzt. Zur Signifikanztestung zwischen verschiedenen Vergleichsgruppen wurde in der Überlebensanalyse der *Log-rank-Test* eingesetzt. Bei multivariaten Überlebenstests kam das *Cox-Proportional-Hazard-Model* zum Einsatz und die *Hazard-Ratio* wurde mit dem zugehörigen *95%-Konfidenzintervall* geschätzt.

Um die beiden Expressionsverhalten von CDX2 und SATB2 auf eine evtl. Korrelation zu überprüfen, wurde der *Spearman-Korrelationstest* angewandt, sowie die Interrater-Reliabilität und Konkordanz zwischen der Expressionsbestimmung am TMA und ganzen Tumorquerschnitt mit dem  *$\kappa$ -Koeffizienten nach Cohen* bestimmt.

Alle statistischen Tests wurden im Sinne des zweizeitigen Testverfahrens auf einem *Signifikanzniveau von  $\leq 5\%$  ( $p \leq 0.05$ )* unter Zuhilfenahme des *Statistikprogramms SPSS, Version 26 (SPSS Institute, Chicago, Illinois, USA) [274]* durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

### 6.1 Allgemeine Charakteristika der untersuchten Kohorte

Wie in Tabelle 8 im Detail aufgelistet, waren von den insgesamt 1039 in der Kohorte untersuchten Patienten 440 (42.3%) weiblich und 599 (57.7%) männlich. Das mediane Alter bei Erstdiagnose lag bei 69 Jahren, wobei Männer durchschnittlich früher erkrankten als Frauen (Median: 67. Lebensjahr vs. 69. Lebensjahr). Die Altersstruktur weist eine Spannweite von 87 Jahren auf, wobei der jüngste Patient 9 Jahre und der älteste Patient 96 Jahre waren. Der Großteil der Erkrankten fiel in die Altersgruppe der 61- bis 77-Jährigen (siehe Abbildung 11). Hinsichtlich der Lokalisation verteilten sich die Karzinome annähernd anteilsgleich auf das rechtsseitige (n=503, 48.4%) (Zökum bis Kolon transversum) und das linksseitige Kolon (n=536, 51.6%) (linke Kolonflexur bis Rektum). Der größte Anteil der Patienten wurde postoperativ nach der 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation maligner Tumoren [6] dem UICC-Stadium II (n=350, 33.7%) und III (n=318, 30.6%) zugeordnet. Erwartungsgemäß wurden die meisten Karzinome mit knapp zwei Dritteln den klassischen Adenokarzinomen vom kolorektalen Typ (Adenokarzinome NOS) (n=650, 62.6%) zugeordnet. Von den Subtypen waren das Mikropapilläre Karzinom mit über zehn Prozent der Prävalenteste (n=129, 12.4%). Daneben waren in absteigender Reihenfolge der Häufigkeiten das Serratierte Adenokarzinom (n=91, 8.7%), das Muzinöse Adenokarzinom (n=88, 8.5%), das Adenom-ähnliche Adenokarzinom (n=33, 3.2%), das Medulläre Adenokarzinom (n=32, 3.1%), das Siegelringzellige Karzinom (n=9, 0.8%) und die Gruppe der Neuroendokrinen Karzinome bzw. gemischten adenoneuroendokrinen Karzinome (NEC/MANEC) (n=7, 0.7%) vertreten. Bezüglich der weiteren zentralen morphologischen Parameter wurden über zwei Drittel der Karzinome als low-grade Karzinome (n=708, 68.1%) und über die Hälfte als Bd1-Karzinome (n=560, n=53.9%) klassifiziert. Über 90% der Präparate wiesen zum Zeitpunkt der Operation einen karzinomfreien Resektionsrand auf (n=960, 92.4%). Im Observationszeitraum erlitten 330 (31.8%) Patienten einen Progress bzw. ein Rezidiv und 411 Patienten (39.6%) verstarben. Hierbei konnte in 301 Fällen (29.0%) eine Tumor-abhängige Todesursache ausfindig gemacht werden. Signifikante prognostische Aussagekraft in allen Überlebensparametern konnte neben den zentralen morphologischen Parametern (KRK-Subtyp, WHO-Grading, Tumour Budding) auch für die Parameter der Ausbreitungsdiagnostik (pTNM-Stadien, UICC-Stadien, Resektionsstatus, Lymph-, Gefäß-, Perineuralscheideninvasion), dem Mikrosatellitenstatus und den untersuchten intestinalen Transkriptionsfaktoren zugeschrieben werden, während hingegen das Alter nur beim Gesamtüberleben sowie krankheitsspezifischen Überleben signifikante Prognosekraft besaß. Bei der Gruppenstratifizierung in Kolon und Rektum

konnten in allen drei Überlebensparametern keine signifikanten prognostischen Unterschiede festgestellt werden (Kolon vs. Rektum: OS: 79.6 [1.7] vs. 76.2 [4.7] Monate,  $p=0.37$ ; DSS: 88.2 [1.6] vs. 84.5 [4.7] Monate,  $p=0.32$ ; DSF: 83.4 [1.8] vs. 74.6 [5.2] Monate,  $p=0.09$ ).

Tabelle 8: Verteilung und Prognosewert der wesentlichen klinisch-pathologischen Parameter einschließlich der Transkriptionsfaktoren SATB2 und CDX2 in der Gesamtkohorte (modifiziert nach [2]).

		Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
Alter	unter dem medianen Alter	504 (48.5%)	86.4 [2.2]	<0.001	91.2 [2.1]	0.02	82.4 [2.3]	0.98
	über dem medianen Alter	535 (51.5%)	72.1 [2.2]		84.2 [2.3]		82.7 [2.4]	
Geschlecht	männlich	599 (57.7%)	78.1 [2.1]	0.33	88.0 [2.0]	0.93	83.6 [2.2]	0.54
	weiblich	440 (42.3%)	80.7 [2.4]		87.4 [2.4]		81.0 [2.6]	
Tumoriokalisation	rechtsseitig (Zök/Asc/Trans)	503 (48.4%)	77.2 [2.3]	0.26	87.1 [2.3]	0.83	82.7 [2.4]	0.93
	linksseitig (Desc/Sigm/Rekt)	536 (51.6%)	81.1 [2.1]		88.4 [2.1]		82.3 [2.3]	
pT	1	79 (7.6%)	97.7 [4.8]	<0.001	115.5 [3.0]	<0.001	109.8 [3.6]	<0.001
	2	187 (18.0%)	92.8 [3.2]		103.9 [2.8]		100.0 [3.1]	
	3	578 (55.6%)	79.7 [2.1]		88.3 [2.1]		82.2 [2.2]	
	4	195 (18.8%)	57.2 [3.7]		60.4 [3.8]		55.0 [4.0]	
pN	0	580 (55.8%)	89.0 [1.9]	<0.001	101.2 [1.7]	<0.001	99.1 [1.8]	<0.001
	1	292 (28.1%)	75.7 [3.0]		81.0 [3.0]		73.2 [3.2]	
	2	167 (16.1%)	51.4 [4.0]		54.6 [4.2]		42.6 [4.0]	
pM	0	887 (85.4%)	86.5 [1.6]	<0.001	96.3 [1.5]	<0.001	91.1 [1.7]	<0.001
	1	152 (14.6%)	40.1 [3.5]		42.7 [3.7]		34.4 [3.6]	
UICC-Stadium	1	213 (20.5%)	96.6 [2.9]	<0.001	111.1 [2.1]	<0.001	107.8 [2.4]	<0.001
	2	350 (33.7%)	86.0 [2.6]		97.0 [2.4]		95.7 [2.6]	
	3	318 (30.6%)	81.2 [2.8]		87.2 [2.8]		76.6 [3.1]	
	4	158 (15.2%)	39.3 [3.4]		41.8 [3.6]		33.3 [3.5]	
Tumortyp (WHO)	Adenokarzinom NOS	650 (62.6%)	83.7 [1.9]	<0.001	92.5 [1.9]	<0.001	87.4 [2.0]	<0.001
	Mikropapilläres Adenokarzinom	129 (12.4%)	53.6 [4.4]		56.2 [4.6]		47.3 [4.5]	
	Serratiertes Adenokarzinom	91 (8.7%)	78.4 [5.6]		87.7 [5.4]		84.4 [5.6]	
	Muzinöses Adenokarzinom	88 (8.5%)	76.5 [5.5]		87.0 [5.6]		78.1 [6.0]	
	Adenom-ähnliches Adenokarzinom	33 (3.2%)	98.0 [6.4]		115.2 [3.5]		116.4 [3.5]	
	Medulläres Adenokarzinom	32 (3.1%)	98.6 [7.2]		116.3 [3.6]		112.8 [4.9]	
	Siegelringzelliges Karzinom	9 (0.8%)	54.0 [22.5]		54.0 [22.5]		34.4 [18.9]	
	MANEC/NEC	7 (0.7%)	18.0 [8.2]		18.0 [8.1]		15.8 [8.4]	
WHO-Grade	low-grade	708 (68.1%)	86.0 [1.8]	<0.001	95.2 [1.7]	<0.001	89.6 [1.9]	<0.001
	high-grade	331 (31.9%)	65.4 [2.8]		72.6 [2.9]		67.8 [3.1]	
Tumour Budding	Bd1	560 (53.9%)	97.8 [1.7]	<0.001	109.3 [1.3]	<0.001	107.0 [1.5]	<0.001
	Bd2	270 (26.0%)	70.5 [3.1]		77.6 [3.1]		66.8 [3.3]	
	Bd3	209 (20.1%)	41.0 [3.1]		44.0 [3.4]		36.6 [3.4]	
Resektionsstatus	R0	960 (92.4%)	83.0 [1.6]	<0.001	92.4 [1.5]	<0.001	87.4 [1.7]	<0.001
	R1	49 (4.7%)	40.8 [7.2]		42.3 [7.4]		29.2 [6.1]	
	R2	30 (2.9%)	25.0 [4.5]		25.0 [4.5]		21.5 [3.7]	
Lymphgefäßinvasion	L0	508 (48.9%)	89.7 [2.0]	<0.001	101.8 [1.8]	<0.001	100.6 [1.9]	<0.001
	L1	531 (51.1%)	69.0 [1.6]		74.2 [2.3]		65.2 [2.5]	
Venengefäßinvasion	V0	904 (87.0%)	83.7 [1.6]	<0.001	93.4 [1.6]	<0.001	89.2 [1.7]	<0.001
	V1	135 (13.0%)	48.7 [4.3]		50.9 [4.4]		38.6 [4.1]	
Perineuralscheideninvasion	Pn0	956 (92.0%)	81.7 [1.6]	<0.001	91.0 [1.6]	<0.001	86.5 [1.7]	<0.001
	Pn1	83 (8.0%)	46.1 [5.5]		47.2 [5.6]		33.2 [5.0]	
Mikrosatellitenstatus	MSS	877 (84.4%)	77.6 [1.7]	0.01	85.5 [1.7]	0.001	80.0 [1.8]	<0.001
	MSI	162 (15.6%)	88.7 [3.8]		101.4 [3.3]		97.8 [3.7]	
SATB2-Subgruppe	SATB2-negativ/schwach	231 (22.2%)	68.4 [3.6]	<0.001	74.2 [3.6]	<0.001	68.0 [3.9]	<0.001
	SATB2-stark	808 (77.8%)	82.2 [1.7]		91.5 [1.7]		86.3 [1.8]	
CDX2-Subgruppe	CDX2-negativ/schwach	106 (10.2%)	67.9 [5.6]	0.012	75.8 [5.7]	0.006	70.4 [5.9]	0.012
	CDX2-stark	933 (89.8%)	80.4 [1.6]		89.1 [1.6]		83.7 [1.7]	

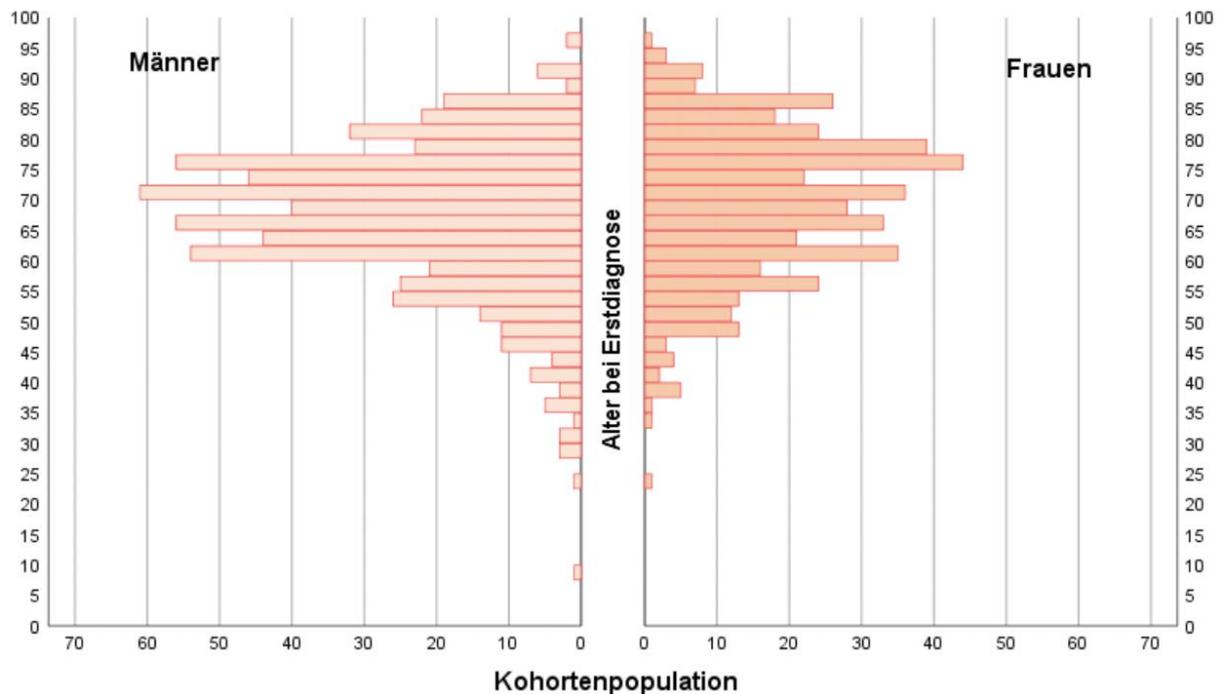


Abbildung 10: Altersverteilung in der Kohortenpopulation bei Erstdiagnose eines Kolorektalen Karzinoms nach Geschlecht stratifiziert (n=1039).

## 6.2 Statistische Auswertung von CDX2 als kolorektaler Differenzierungsmarker

### 6.2.1 Deskriptive Statistik der Expression von CDX2

#### 6.2.1.1 Expressionsverteilung von CDX2 in der Gesamtkohorte und CDX2-Gruppenformation

Entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens wurde die Evaluation der CDX2-Expression zunächst als kontinuierliche Variable vorgenommen und anschließend dichotom in die Gruppen CDX2<sup>stark</sup> und CDX2<sup>negativ/schwach</sup> klassifiziert (siehe Abbildung 11). Hierbei konnte der Großteil der Karzinome (bei angenommenem Cutoff-Wert an der 10. Perzentile) der Gruppe der CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome (n=933, 89.8%) zugeordnet werden. Der Mittelwert CDX2-positiver Karzinomzellen lag bei 91%, der Median bei 100%. Weit über Dreiviertel der Karzinome (n=882, 84.9%) wiesen eine Expression in  $\geq 90\%$  der Tumorzellen auf. In der weiterführenden Expressionsmuster-Analyse schienen sich sowohl die auf Grundlage der CDX2-positiven Tumorzellen gebildeten CDX2-Gruppen als auch die Expressionsintensität invers zum Expressionsmuster zu verhalten. So fielen die allermeisten Karzinome in die Gruppe der CDX2-stark und gleichzeitig diffus exprimierenden Tumoren (n=869, 83.6%),

während hingegen in keinem der Fälle eine schwache, aber diffuse Expression festgestellt werden konnte. Ebenfalls auffällig war, dass keines der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome eine starke Expressionsintensität in den anteilig verbliebenen CDX2-positiven Tumorzellen zeigte. In den schwächer exprimierenden Gruppen nahm dahingegen die Heterogenität der Expressionscluster mit Abnahme der Färbeintensität deutlich zu (schwache CDX2-Expression: n=73, 60.3% vs. mittlere CDX2-Expression: n=44, 36.4% vs. starke CDX2-Expression: n=4, 3.3%). Folglich war auch die Rate der heterogen CDX2 exprimierenden Tumoren in der Gruppe der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe höher (n=93, 87.7%) als in der Gruppe der CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome (n=28, 3.0%). Insgesamt erwiesen sich die meisten Tumoren als diffus CDX2-exprimierend (n=905, 87.1%) und nur bei einem sehr geringen Anteil (n=13, 1.3%) fehlte die CDX2-Expression vollständig. Tabelle 9 bis 11 verdeutlichen den Zusammenhang zwischen CDX2-Gruppen, Expressionsmuster und Expressionsintensität. Im Sinne der Qualitätskontrolle wurde, wie im Kapitel „*Material und Methodik*“ beschrieben, die Interrater-Reliabilität sowie Konkordanz zwischen der Expressionsbestimmung am TMA und ganzen Tumorquerschnitt überprüft, welche übereinstimmende Ergebnisse lieferten (98%, p<0.001, κ-Wert nach Cohen: 0.84 bzw. 100%, p<0.001, κ-Wert nach Cohen: 0.98).

Tabelle 9: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsgruppe und Expressionsmuster (modifiziert nach [1]).

CDX2-Gruppe	Expressionsmuster			Gesamt	p-Wert
	fehlend	heterogen	diffus		
CDX2 <sup>negativ/schwach</sup>	13	93	0	106	p<0.001
CDX2 <sup>stark</sup>	0	28	905	933	
<b>Gesamt</b>	13	121	905	1039	

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsgruppe und Expressionsintensität (modifiziert nach [1]).

CDX2-Gruppe	Expressionsintensität				Gesamt	p-Wert
	fehlend	schwach	mittel	stark		
CDX2 <sup>negativ/schwach</sup>	13	68	25	0	106	p<0.001
CDX2 <sup>stark</sup>	0	5	55	873	933	
<b>Gesamt</b>	13	73	80	873	1039	

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsmuster und Expressionsintensität.

Expressionsmuster	Expressionsintensität				Gesamt	p-Wert
	fehlend	schwach	mittel	stark		
fehlend	13	0	0	0	13	p<0.001
heterogen	0	73	44	4	121	
diffus	0	0	36	869	905	
<b>Gesamt</b>	13	73	80	873	1039	

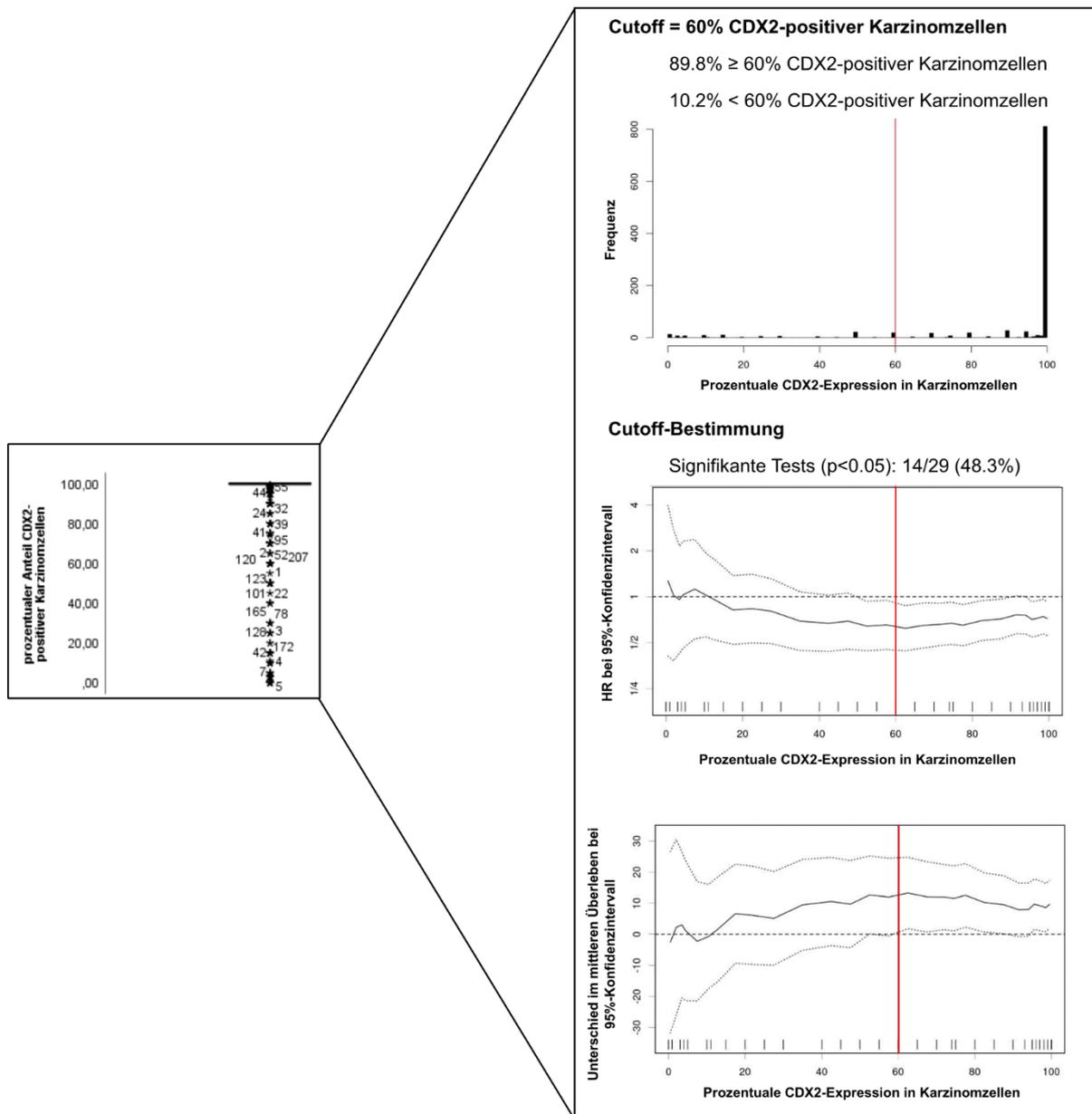


Abbildung 11: Transformation des Anteils CDX2-exprimierender Karzinomzellen (hier links als Boxplot dargestellt) in eine dichotome Klassifikation in eine CDX2<sup>stark</sup>- und CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppen an der 10. Perzentile ( $\hat{=}$  60% CDX2-positiver Karzinomzellen) mithilfe des Cutoff-Finders [263] (rechte Seite).

Die einzelnen Diagramme (rechts) verdeutlichen die Frequenz des prozentualen Anteils positiver Karzinomzellen im Histogramm (oben), das Hazard Ratio in Abhängigkeit vom Cutoff-Wert für DSS (Mitte) sowie den Überlebensunterschied zwischen den gebildeten CDX2-Expressionsgruppen für DSS in Abhängigkeit vom Cutoff-Wert (unten). Die rote Linie repräsentiert dabei jeweils den ermittelten optimalen Cutoff-Wert.

### 6.2.1.2 Expressionsverteilung von CDX2 nach Gruppenstratifizierung in zentrale Diagnosekriterien der WHO

#### 6.2.1.2.1 Korrelation der CDX2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Hinsichtlich der CDX2-Expression scheint der Anteil der Karzinome, die der CDX2-defizienten Gruppe zugeordnet werden können, mit Zunahme der lokalen Ausbreitung und der Invasivität des Tumors anzusteigen. Im pT4-Stadium lagen beispielsweise prozentual ca. 3-Mal so viele CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome (n= 28, 14.4%) vor als im pT2-Stadium (n=9, 4.8%). Bei der Betrachtung des Nodalstatus und der Fernmetastasierung setzt sich dieser Trend in geringem Umfang fort, wenngleich die Analyse in Bezug auf den pM-Status kein signifikantes Ergebnis ( $p=0.193$ ) lieferte. Dennoch waren über allen pTNM-Stadien die CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome der weitaus häufiger vertretene Expressionstyp und CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome machten insgesamt einen geringeren Anteil in den einzelnen Gruppen aus. Bei der Betrachtung der UICC-Stadien wird dieses Verhalten in besonderem Ausmaß noch einmal deutlich. So wurde eine Zunahme von CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinomen v.a. im Vergleich des UICC I-Stadiums zu den übrigen weiter fortgeschrittenen UICC-Stadien deutlich, während hingegen eine Häufung CDX2-defizienter Karzinome zwischen den UICC II- bis UICC IV-Stadien vergleichsweise gering ausfiel (vergleiche Abbildung 12 (D)). Interessanterweise zeigte sich hinsichtlich der lokalen Gefäßinvasion nur bei Einbruch in Lymphgefäßen ( $p<0.001$ ) und venösen Gefäßen ( $p=0.026$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen CDX2-Gruppen, während hingegen eine perineurale Invasion das Signifikanzniveau nicht überschritt ( $p=0.351$ ). Tabelle 12 und Abbildung 12 veranschaulichen weitere Details der CDX2-Gruppenverteilung. In weiterführenden Analysen war darüber hinaus die CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe gering signifikant häufiger ( $p=0.027$ ) mit einem Befall des Resektionsrandes (CDX2<sup>negativ/schwach</sup> in R1/R2-Karzinomen: n=11, 13.9% vs. in R0: n=95, 9.9%) assoziiert und zeigte eine starke signifikante ( $p<0.001$ ) Assoziation für das rechtsseitige Kolon (n=74, 14.7%) (vergleiche Abbildung 12 (E)).

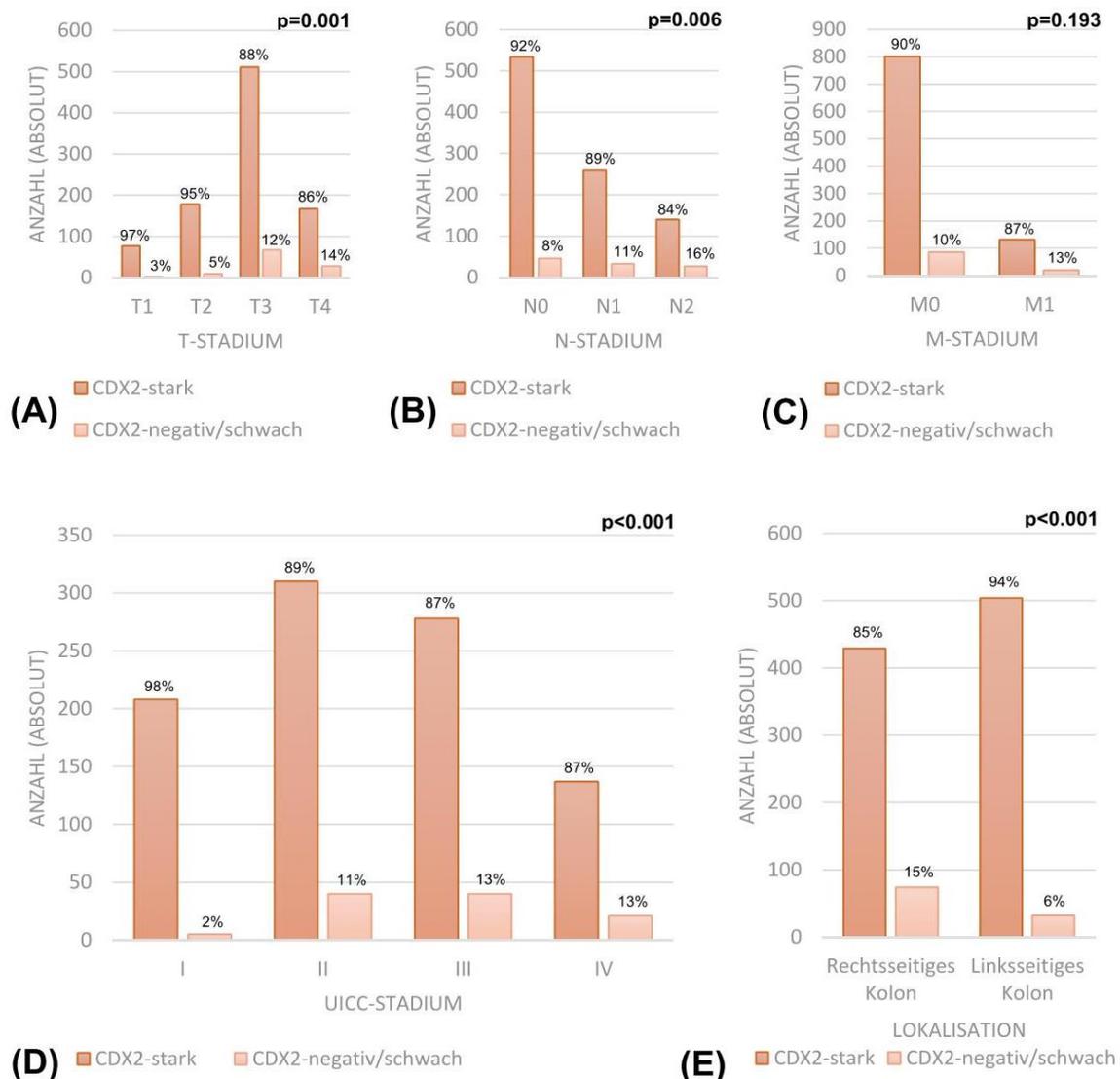


Abbildung 12: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (n=1039) bezogen auf die Parameter der Ausbreitungsdiagnostik pT-Stadium (A), pN-Stadium (B), pM-Stadium (C), UICC-Stadien (D) sowie die Lokalisation der Karzinome (E) (modifiziert nach [1]).

Tabelle 12: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte stratifiziert nach verschiedenen klinisch-pathologischen und morphologischen Parametern (in Spaltenprozent) (modifiziert nach [1]).

		Gesamtzahl n (%)	CDX2 negativ/schwach	CDX2 stark	p-Wert
		1039 (100.0%)	106 (10.2%)	933 (89.8%)	
<b>Alter</b>	unter dem medianen Alter	504 (48.5%)	36 (34.0%)	468 (50.2%)	0.002
	über dem medianen Alter	535 (51.5%)	70 (66.0%)	465 (49.8%)	
<b>Geschlecht</b>	männlich	599 (57.7%)	46 (43.4%)	553 (59.3%)	0.002
	weiblich	440 (42.3%)	60 (56.6%)	380 (40.7%)	
<b>pT</b>	1	79 (7.6%)	2 (1.8%)	77 (8.3%)	0.001
	2	187 (18.0%)	9 (8.5%)	178 (19.1%)	
	3	578 (55.6%)	67 (63.2%)	511 (54.8%)	
	4	195 (18.8%)	28 (26.4%)	167 (17.9%)	
<b>pN</b>	0	580 (55.8%)	46 (43.4%)	534 (57.2%)	0.006
	1	292 (28.1%)	33 (31.1%)	259 (27.8%)	
	2	167 (16.1%)	27 (25.5%)	140 (15.0%)	
<b>pM</b>	0	887 (85.4%)	86 (81.1%)	801 (85.9%)	0.193
	1	152 (14.6%)	20 (18.9%)	132 (14.1%)	
<b>UICC-Stadium</b>	1	213 (20.5%)	5 (4.7%)	208 (22.3%)	<0.001
	2	350 (33.7%)	40 (37.7%)	310 (33.2%)	
	3	318 (30.6%)	40 (37.7%)	278 (29.8%)	
	4	158 (15.2%)	21 (19.8%)	137 (14.7%)	
<b>Tumortyp (WHO)</b>	Adenokarzinom NOS	650 (62.6%)	39 (36.8%)	611 (65.5%)	<0.001
	Muzinöses Adenokarzinom	88 (8.5%)	12 (11.3%)	76 (8.1%)	
	Siegelringzelliges Karzinom	9 (0.9%)	0 (0.0%)	9 (1.0%)	
	Medulläres Adenokarzinom	32 (3.1%)	17 (16.0%)	15 (1.6%)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	129 (12.4%)	18 (17.0%)	111 (11.9%)	
	Serratiertes Adenokarzinom	91 (8.7%)	13 (12.3%)	78 (8.4%)	
	Adenom-ähnliches Adenokarzinom	33 (3.2%)	1 (0.9%)	32 (3.4%)	
	MANEC/NEC	7 (0.7%)	6 (5.7%)	1 (0.1%)	
<b>WHO-Grade</b>	low-grade	708 (68.1%)	45 (42.5%)	663 (71.1%)	<0.001
	high-grade	331 (31.9%)	61 (57.5%)	270 (28.9%)	
<b>Tumour Budding</b>	Bd1	560 (53.9%)	35 (33.0%)	525 (56.3%)	<0.001
	Bd2	270 (26.0%)	31 (29.2%)	239 (25.6%)	
	Bd3	209 (20.1%)	40 (37.7%)	169 (18.1%)	
<b>Resektionsstatus</b>	R0	960 (92.4%)	95 (89.6%)	865 (92.7%)	0.027
	R1	49 (4.7%)	10 (9.4%)	39 (4.2%)	
	R2	30 (2.9%)	1 (0.9%)	29 (3.1%)	
<b>Lymphgefäßinvasion</b>	L0	508 (48.9%)	34 (32.1%)	474 (50.8%)	<0.001
	L1	531 (51.1%)	72 (67.9%)	459 (49.2%)	
<b>Veneninvasion</b>	V0	904 (87.0%)	85 (80.2%)	819 (87.8%)	0.028
	V1	135 (13.0%)	21 (19.8%)	114 (12.2%)	
<b>Perineurale Invasion</b>	Pn0	956 (92.0%)	100 (94.3%)	856 (91.7%)	0.351
	Pn1	83 (8.0%)	6 (5.7%)	77 (8.3%)	
<b>Mikrosatellitenstatus</b>	MSS	877 (84.4%)	65 (61.3%)	812 (87.0%)	<0.001
	MSI	162 (15.6%)	41 (38.7%)	121 (13.0%)	
<b>Tumorlokalisation</b>	rechtsseitig (Zök/Asc/Trans)	503 (48.4%)	74 (69.8%)	429 (46.0%)	<0.001
	linksseitig (Desc/Sigm/Rekt)	536 (51.6%)	32 (30.2%)	504 (54.0%)	

### 6.2.1.2.2 CDX2-Expression unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter

#### **CDX2-Expression in histomorphologischen Subtypen**

Unter Betrachtung der morphologischen Varianten des KRK erwiesen sich, mit Ausnahme weniger Subtypen, die meisten Karzinomtypen deutlich häufiger als Vertreter der CDX2<sup>stark</sup>-Gruppe, wenngleich der Anteil CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome zwischen den einzelnen Subtypen variierte. Besonders auffällig ist hierbei, dass alle untersuchten Siegelringzelligen Karzinome (n=9, 100.0%) und fast alle Adenom-ähnlichen Adenokarzinome (n=32, 97.0%) eine den festgelegten Grenzwert überschreitende CDX2-Expression zeigten und der Gruppe der stark CDX2-exprimierenden Karzinome zugeordnet werden konnten. Im Gegensatz dazu machten sowohl in der Gruppe der Medullären Adenokarzinome als auch in der Gruppe der MANEC/NEC die als CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-klassifizierten Tumoren den Großteil ihrer Gruppe aus (n=17, 53.1% bzw. n=6, 85.7%). Somit ist ein CDX2-Verlust sowohl mit prognostisch benigne verlaufenden Karzinomsubtypen als auch mit biologisch besonders aggressiven Subtypen assoziiert. In Tabelle 12 und Abbildung 13 sind noch einmal die genauen Details der Verteilung in den einzelnen KRK-Subtypen veranschaulicht.

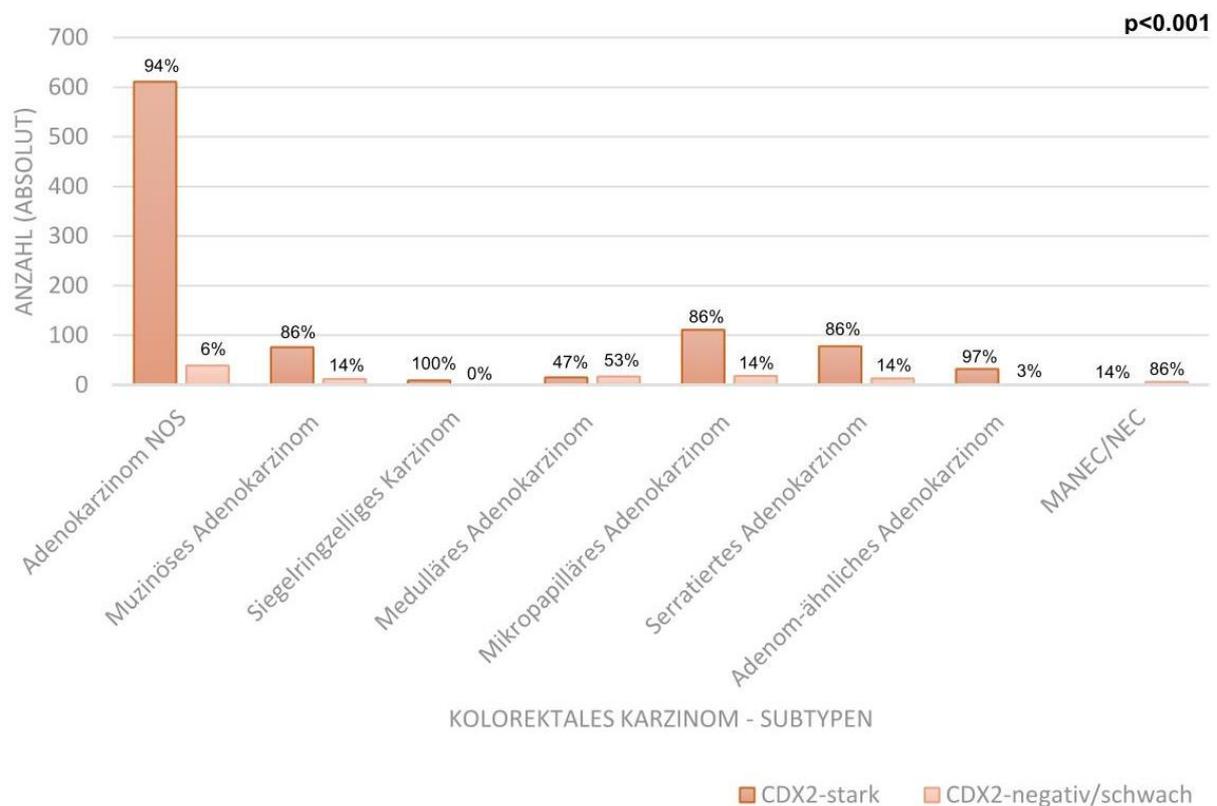


Abbildung 13: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen auf die Subtypen des Kolorektalen Karzinoms in der Gesamtkohorte (n=1039) (modifiziert nach [1]).

### CDX2-Expression in den WHO-Grading-Gruppen

In der Analyse weiterer zentraler morphologischer Parameter nahm der Anteil der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-KRK signifikant ( $p < 0.001$ ) mit Zunahme der Entdifferenzierung vom Ursprungsgewebe und fortgeschrittenem WHO-Grad zu, obwohl sich auch hier der größte Anteil der high-grade Karzinome als stark CDX2-exprimierend ( $n=270, 81.6\%$ ) darstellte. Vergleiche hierzu auch Abbildung 14.

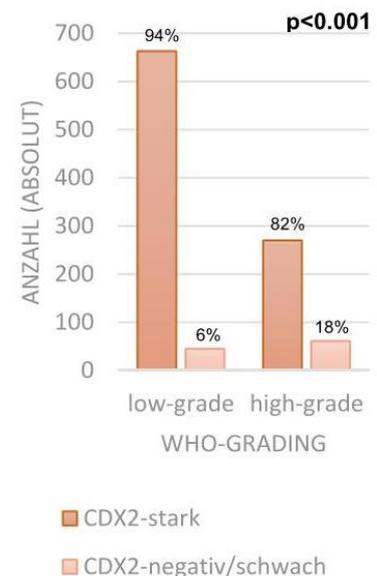


Abbildung 14: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in Bezug auf die WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [1]).

### CDX2-Expression stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität

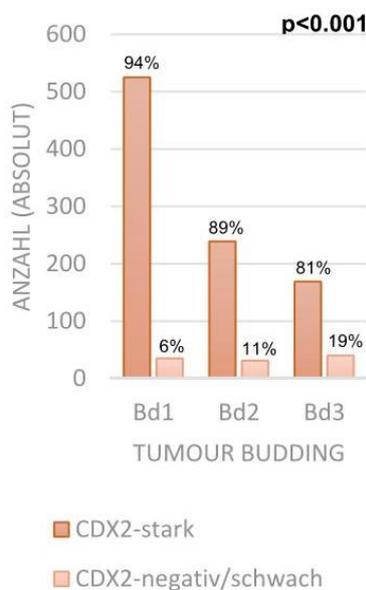


Abbildung 15: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in Bezug auf die Tumour Budding-Aktivität der Karzinome (modifiziert nach [1]).

Gleiches gilt für das Tumour Budding, welches in Karzinomen mit ausgeprägter Budding-Aktivität ebenfalls signifikant ( $p < 0.001$ ) mit einer Häufung CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome assoziiert war, jedoch auch hier selbst im Bd3-Stadium in der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Variante nur knapp ein Fünftel der Tumoren darstellte ( $n=40, 19.1\%$ ) (siehe Abbildung 15 und Tabelle 12).

### 6.2.1.2.3 CDX2-Expression unter Betrachtung des Mikrosatellitenstatus

Um neben der Assoziation der rein morphologischen prognostischen Parameter noch eine weitere basale molekularbiologische prognostische Variable zu untersuchen, haben wir die Kohorte nach Mikrosatellitenstatus stratifiziert und die Verteilung in den CDX2-Gruppen betrachtet. Hier zeigten mikrosatelliteninstabile Karzinome eine deutlich signifikante ( $p < 0.001$ ) und besonders stark ausfallende Assoziation zu CDX2-defizienten Karzinomen, sodass diese ein Viertel der MSI-Karzinome ausmachten (vergleiche Abbildung 16 und Tabelle 12).

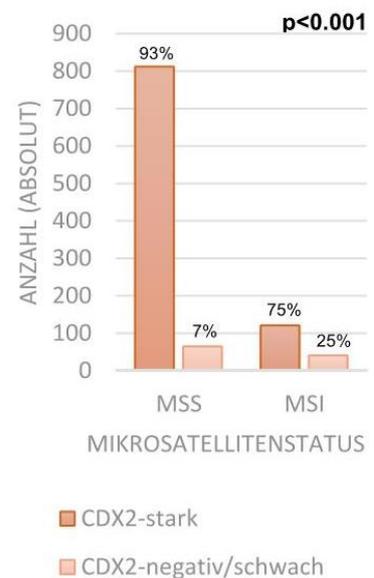


Abbildung 16: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen bezüglich Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).

## 6.2.2 Überlebenszeitanalyse der Expression von CDX2 in univariaten Analysen

### 6.2.2.1 Prognostische Relevanz der CDX2-Gruppen in der Gesamtkohorte

In der Gesamtkohorte unter Einschluss aller Karzinome zeigte sich - nach Bildung der CDX2-Expressionsgruppen entsprechend des zuvor ermittelten Cutoff-Werts in univariaten Überlebensanalysen über allen Überlebensparametern (OS, DSS, DFS) - ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen den Expressionsgruppen (OS und DFS:  $p = 0.012$ ; DSS:  $p = 0.006$ ). Bezogen auf das Gesamtüberleben verliefen Karzinome der CDX2<sup>negativ/schwach</sup> mit einem durchschnittlichen Überleben von 67.9 [5.6] Monaten prognostisch deutlich schlechter als CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome mit einem mittleren Überleben von 80.4 [1.6] Monaten. Hinsichtlich des mittleren krankheitsspezifischen (CDX2<sup>stark</sup>: 89.1 [1.6] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 75.8 [5.7] Monate) und krankheitsfreien Überlebens (CDX2<sup>stark</sup>: 83.7 [1.7] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 70.4 [5.9] Monate) fielen der prognostische Vorteil einer starken CDX2-Expression jeweils in etwa vergleichbar aus mit gering höher signifikanten Ergebnissen für das DSS. Abbildung 17 verdeutlicht noch einmal die prognostische Bedeutung der CDX2-Expressionsgruppen jeweils für die einzelnen Überlebensparameter in der Kaplan-Meier-Analyse.

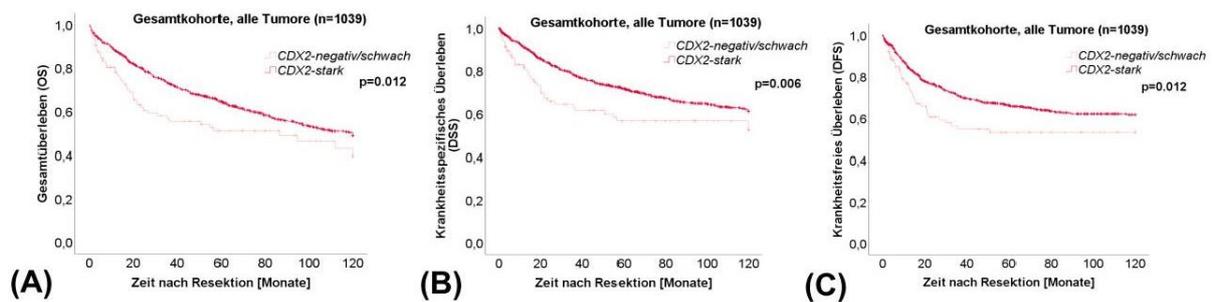


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Überlebensparameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) in Kaplan-Meier-Kurven bezogen auf die CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (modifiziert nach [1]).

### 6.2.2.2 Prognostische Relevanz von CDX2 stratifiziert nach Parametern der Ausbreitungsdiagnostik und UICC-Stadien

Nach Stratifizierung in UICC-Stadien konnte in keinem der Gruppen ein signifikanter prognostischer Überlebensvorteil für CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome festgestellt werden (vergleiche Tabelle 13).

Tabelle 13: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression stratifiziert nach UICC-Stadien jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).

	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
UICC-Stadium I	CDX2-negativ/schwach	5 (2.3 %)	120.0 [0.0]	0.289	120.0 [0.0]	0.518	120.0 [0.0]	0.465
	CDX2-stark	208 (97.7 %)	96.2 [2.9]		110.9 [2.1]		107.6 [2.4]	
UICC-Stadium II	CDX2-negativ/schwach	40 (11.4 %)	79.9 [8.9]	0.492	94.7 [8.4]	0.644	93.0 [8.3]	0.767
	CDX2-stark	310 (88.6 %)	86.7 [2.8]		97.2 [2.6]		96.0 [2.7]	
UICC-Stadium III	CDX2-negativ/schwach	40 (12.6 %)	69.7 [8.8]	0.117	75.5 [9.1]	0.108	63.6 [9.3]	0.07
	CDX2-stark	278 (87.4 %)	82.6 [3.0]		88.8 [2.9]		78.4 [3.2]	
UICC-Stadium IV	CDX2-negativ/schwach	21 (13.3 %)	28.7 [9.4]	0.105	33.1 [10.8]	0.131	30.9 [10.5]	0.342
	CDX2-stark	137 (86.7 %)	40.8 [3.6]		43.2 [3.9]		33.9 [3.7]	

### 6.2.2.3 Prognostische Relevanz von CDX2 in Gruppen der zentralen morphologischen Parameter

#### Prognostische Relevanz von CDX2 in histomorphologischen Subtypen

Unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter konnte nur in der Gruppe der Adenokarzinome NOS (exemplarisch DSS: p=0.001), nicht jedoch in den speziellen morphologischen Subtypen, ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CDX2-Expressionsgruppen festgestellt werden (siehe Tabelle 14). Einzige Ausnahme hiervon bildet jedoch die Gruppe der MANEC/NEC (exemplarisch DSS: p=0.014). Die Adenokarzinome NOS

machten den größten Anteil der Gesamtkohorte aus und sollten somit auch für den prognostischen Effekt der CDX2-Expression in der Gesamtkohorte von entscheidender Bedeutung sein (vergleiche Tabelle 8 und 14). In der Gruppe der MANEC/NEC konnte zwar ein statistisch signifikanter Unterschied konstatiert werden, jedoch sollte das Ergebnis aufgrund der geringen Fallzahl kritisch vor dem Hintergrund eines Bias aufgrund der Probenmenge betrachtet werden [275], zumal die Gruppe der MANEC/NEC generell mit einer infausten Prognose assoziiert ist (siehe Tabelle 8 und Tabelle 14).

Tabelle 14: Univariate Analyse der CDX2-Expression in den einzelnen histologischen Subtypen des Kolorektalen Karzinoms jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).

	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
Adenokarzinom NOS	CDX2-negativ/schwach	39 (6.0 %)	62.8 [9.2]	0.005	70.0 [9.6]	0.001	70.7 [10.0]	0.038
	CDX2-stark	611 (94.0 %)	84.9 [2.0]		93.8 [1.9]		88.3 [2.1]	
Muzinöses Adenokarzinom	CDX2-negativ/schwach	12 (13.6 %)	67.8 [18.3]	0.383	73.9 [19.1]	0.211	48.1 [16.2]	0.069
	CDX2-stark	76 (86.4%)	77.7 [5.7]		88.7 [5.8]		82.2 [6.3]	
Siegelringzelliges Karzinom	CDX2-negativ/schwach	0 (0 %)	keine Fälle		keine Fälle		keine Fälle	
	CDX2-stark	9 (100 %)	54.0 [22.5]		54.0 [22.5]		34.4 [18.9]	
Medulläres Karzinom	CDX2-negativ/schwach	17 (53.1 %)	95.1 [10.9]	0.673	120.0 [0.0]	0.337	112.7 [7.0]	0.977
	CDX2-stark	15 (46.9 %)	101.5 [9.4]		112.9 [6.8]		112.9 [6.8]	
Mikropapilläres Adenokarzinom	CDX2-negativ/schwach	18 (14.0 %)	39.5 [12.3]	0.155	39.5 [12.3]	0.096	33.0 [11.9]	0.046
	CDX2-stark	111 (86.0 %)	55.5 [4.7]		58.5 [4.9]		49.5 [4.8]	
Serratiertes Karzinom	CDX2-negativ/schwach	13 (14.3 %)	83.6 [14.3]	0.751	91.8 [14.0]	0.603	90.6 [14.5]	0.477
	CDX2-stark	78 (85.7 %)	77.4 [6.1]		86.5 [5.9]		82.8 [6.1]	
Adenom-ähnliches Karzinom	CDX2-negativ/schwach	1 (3.0 %)	120.0 [0.0]	0.472	120.0 [0.0]	0.725	120.0 [0.0]	0.853
	CDX2-stark	32 (97.0 %)	97.1 [6.6]		114.9 [3.6]		116.4 [5.0]	
MANEC/NEC	CDX2-negativ/schwach	6 (85.7 %)	20.9 [9.0]	0.014	20.9 [9.0]	0.014	18.3 [9.4]	0.014
	CDX2-stark	1 (14.3 %)	1.0 [0.0]		1.0 [0.0]		1.0 [0.0]	

### Prognostische Relevanz von CDX2 in den WHO-Grading-Gruppen und stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität

Weiter konnte sowohl in den WHO- (siehe Tabelle 15) als auch in den Tumour Budding-Gruppen (siehe Tabelle 16) kein signifikanter prognostischer Gruppenunterschied bezüglich der CDX2-Expression in univariaten Analysen festgestellt werden.

Tabelle 15: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS in WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [1]).

	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
WHO low-grade Karzinome	CDX2-negativ/schwach	45 (6.4 %)	79.5 [8.7]	0.165	86.7 [8.8]	0.107	76.5 [9.2]	0.074
	CDX2-stark	663 (93.6 %)	86.5 [1.9]		95.8 [1.8]		90.4 [2.0]	
WHO high-grade Karzinome	CDX2-negativ/schwach	61 (18.4 %)	60.9 [7.0]	0.513	68.7 [7.3]	0.546	66.2 [7.6]	0.76
	CDX2-stark	270 (81.6 %)	66.4 [3.1]		73.5 [3.2]		67.9 [3.4]	

Tabelle 16: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).

	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
Bd1-Karzinome (0-4 buds)	CDX2-negativ/schwach	35 (6.3 %)	95.4 [8.2]	0.915	108.8 [6.1]	0.993	103.6 [7.4]	0.724
	CDX2-stark	525 (93.7 %)	98.0 [1.8]		109.4 [1.4]		107.1 [1.6]	
Bd2-Karzinome (5-9 buds)	CDX2-negativ/schwach	31 (11.5 %)	71.1 [9.8]	0.865	81.9 [10.0]	0.676	78.7 [10.3]	0.277
	CDX2-stark	239 (88.5 %)	70.5 [3.3]		77.1 [3.3]		65.4 [3.5]	
Bd3-Karzinome (≥10 buds)	CDX2-negativ/schwach	40 (19.1 %)	41.2 [8.1]	0.611	44.3 [8.8]	0.555	37.6 [8.4]	0.699
	CDX2-stark	169 (80.9 %)	41.2 [3.4]		44.3 [3.6]		36.3 [3.6]	

#### 6.2.2.4 Prognostische Relevanz von CDX2 stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus

Unter Berücksichtigung des Mikrosatellitenstatus spiegelte sich der bereits in der Gesamtkohorte ermittelte Überlebensvorteil für CDX2 stark exprimierende Karzinome in besonders signifikantem Maß für die Gruppe der MSS-Karzinome in allen univariaten Überlebensanalysen wider (OS: CDX2<sup>stark</sup>: 78.7 [1.8] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 63.3 [7.1] Monate, p=0.009; DSS: CDX2<sup>stark</sup>: 87.0 [1.7] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 66.5 [7.2] Monate, p<0.001; DFS: CDX2<sup>stark</sup>: 81.4 [1.9] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 60.9 [7.3] Monate, p=0.001). Für MSI-Karzinome konnte hingegen zwar ein längeres Überleben der CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome nachgewiesen werden, jedoch konnte für keines der Überlebensparameter ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Überlebens zwischen den CDX2-Expressionsgruppen festgestellt werden (OS: CDX2<sup>stark</sup>: 92.7 [4.1] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 75.6 [8.8] Monate, p=0.069; DSS: CDX2<sup>stark</sup>: 104.1 [3.5] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 93.1 [8.3] Monate, p=0.214; DFS: CDX2<sup>stark</sup>: 100.5 [3.9] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 88.2 [8.9] Monate, p=0.189) (siehe Abbildung 18).

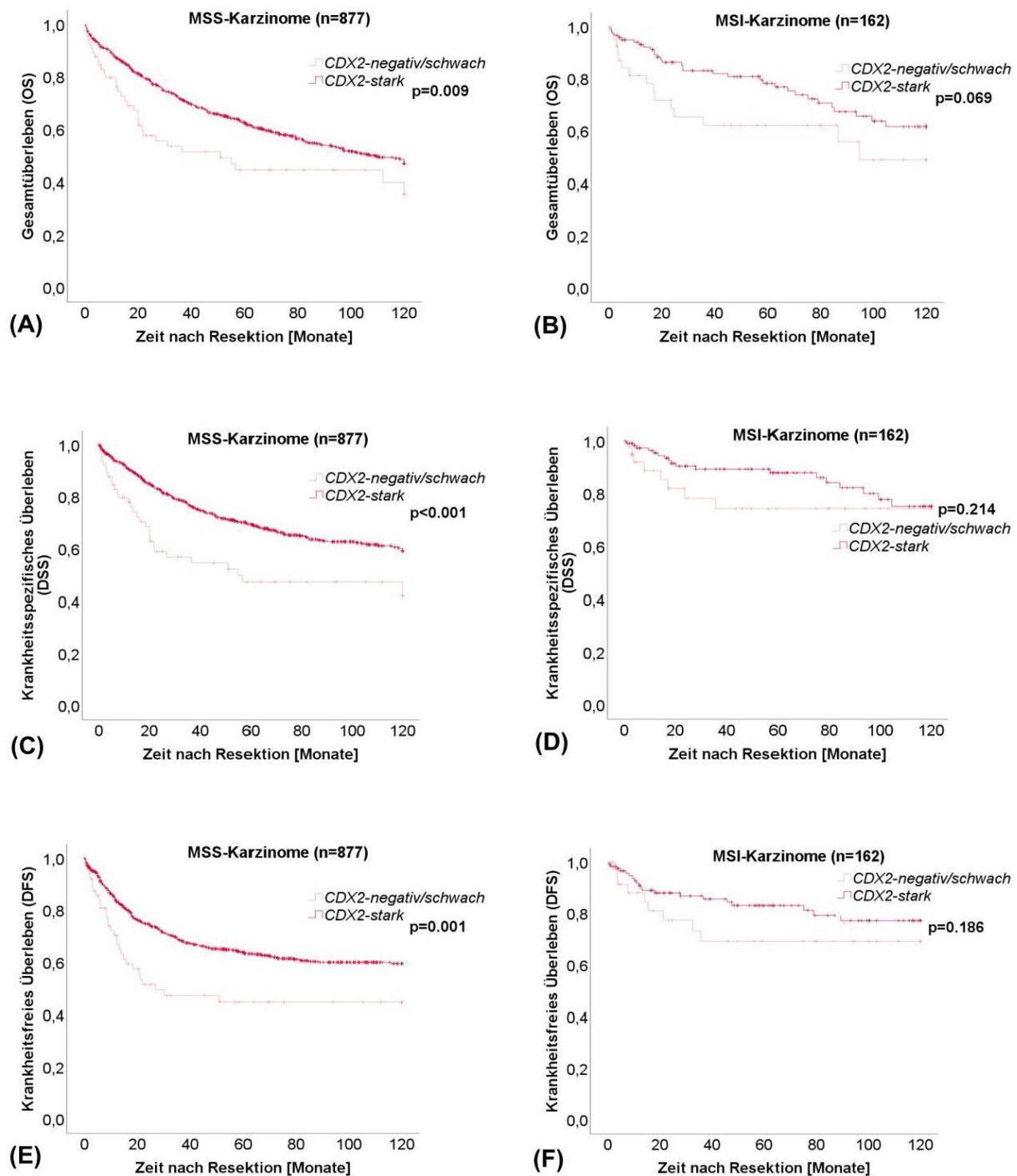


Abbildung 18: Graphische Darstellung der univariaten Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach MSI- (A, C, E) und MSS- (B, D, F) Karzinomen jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).

### 6.2.2.5 Prognostische Relevanz von CDX2 nach Tumorlokalisation

Nach Unterteilung der Kohorte in rechtsseitige und linksseitige KRK konnte ein signifikanter Überlebensvorteil der CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome gegenüber der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe über allen Überlebensparametern (OS: CDX2<sup>stark</sup>: 83.1 [2.2] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 44.1 [9.9] Monate, p<0.001; DSS: CDX2<sup>stark</sup>: 90.7 [2.1] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 46.2 [10.2] Monate, p<0.001; DFS: CDX2<sup>stark</sup>: 84.5 [2.3] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 47.5 [10.9] Monate, p<0.001) im linksseitigen KRK festgestellt werden, während hingegen im rechtsseitigen KRK für keinen der Überlebensparametern (OS: CDX2<sup>stark</sup>: 77.2 [2.5] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 76.6 [6.4] Monate, p=0.77; DSS: CDX2<sup>stark</sup>: 81.2 [2.5] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 86.9 [6.3] Monate, p=0.802; DFS: CDX2<sup>stark</sup>: 83.1 [2.6] Monate vs. CDX2<sup>negativ/schwach</sup>: 80.1 [6.6] Monate, p=0.759) ein signifikantes Niveau erreicht werden konnte. Vergleiche hierzu auch die univariate Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier in Abbildung 19.

Nach weiterführender Stratifizierung der Mikrosatelliten-Gruppen nach ihrer Lokalisation zeigte sich sowohl in der Gruppe der MSS-, als auch der Gruppe der MSI-Karzinome ein signifikant prognostisch günstiger Krankheitsverlauf der CDX2<sup>stark</sup>-Karzinome gegenüber der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe für linksseitige Karzinome in allen Überlebensparametern (MSS: OS/ DSS/ DFS: jeweils p<0.001 vs. MSI: OS und DSS: p=0.011, DFS: p=0.004), während hingegen für rechtsseitige Karzinome in beiden Mikrosatelliten-Gruppen kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden konnte (vergleiche Tabelle 17).

Tabelle 17: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen für jeweils MSS- und MSI-Karzinome des rechtsseitigen und linksseitigen Kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach [1]).

	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben		Mittleres krankheitsspezifisches Überleben		Mittleres krankheitsfreies Überleben		
			[SD] (Monate)	p-Wert	[SD] (Monate)	p-Wert	[SD] (Monate)	p-Wert	
MSS-Karzinome	Gesamtkohorte	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	65 (7.4 %) 812 (92.6 %)	63.3 [7.1] 78.7 [1.8]	0.009	66.5 [7.2] 87.0 [1.7]	<0.001	60.9 [7.3] 81.4 [1.9]	0.001
	Rechtsseitige Karzinome (Zök/Asc/Trans)	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	38 (10.4 %) 328 (69.6 %)	74.5 [9.0] 72.6 [2.9]	0.926	77.8 [9.1] 81.6 [2.9]	0.461	69.6 [9.2] 77.5 [3.1]	0.429
	Linksseitige Karzinome (Desc/Sigm/Rekt)	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	27 (5.3 %) 484 (94.7 %)	46.1 [10.4] 82.9 [2.2]	<0.001	48.4 [10.8] 90.6 [2.2]	<0.001	49.8 [11.4] 84.0 [2.4]	<0.001
MSI-Karzinome	Gesamtkohorte	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	41 (25.3 %) 121 (74.7 %)	75.6 [8.8] 92.7 [4.1]	0.069	93.1 [8.3] 104.1 [3.5]	0.214	88.2 [8.9] 100.5 [3.9]	0.189
	Rechtsseitige Karzinome (Zök/Asc/Trans)	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	36 (26.3 %) 101 (73.7 %)	79.3 [8.9] 93.8 [4.6]	0.135	98.4 [7.9] 107.0 [3.7]	0.3	93.5 [8.7] 102.2 [4.2]	0.388
	Linksseitige Karzinome (Desc/Sigm/Rekt)	CDX2-negativ/schwach CDX2-stark	5 (20.0 %) 20 (80.0 %)	10.7 [4.1] 88.1 [10.3]	0.011	10.7 [4.1] 93.0 [9.8]	0.011	10.7 [4.1] 92.5 [10.6]	0.004

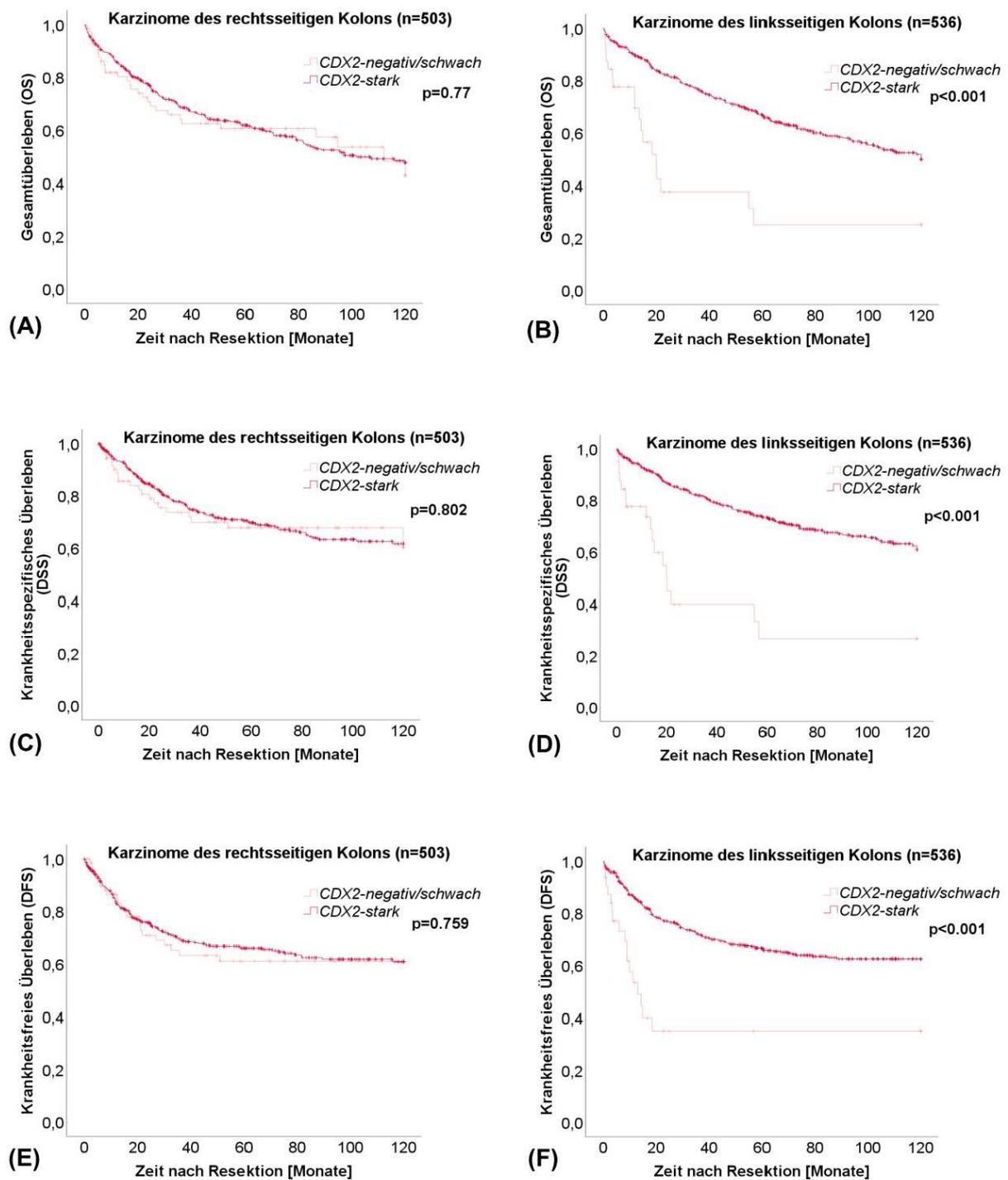


Abbildung 19: Graphische Darstellung der univariaten Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach Tumorlokalisation jeweils für die Parameter OS (A, B), DSS (C, D) und DFS (E, F) (modifiziert nach [1]).

### 6.2.3 Multivariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression

In multivariaten Analysen unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Resektionsstatus, UICC-Stadium, Mikrosatellitenstatus, WHO-Grade, KRK-Subtypen und CDX2-Expressionsgruppen konnte der CDX2-Expression in der Gesamtkohorte keinen prognostischen Wert als unabhängige Variable im Gegensatz zur univariaten Überlebenszeitanalyse zugeschrieben werden (OS:  $p=0.913$ ; DSS:  $p=0.719$ ; DFS:  $p=0.899$ ) (siehe exemplarisch Abbildung 20).

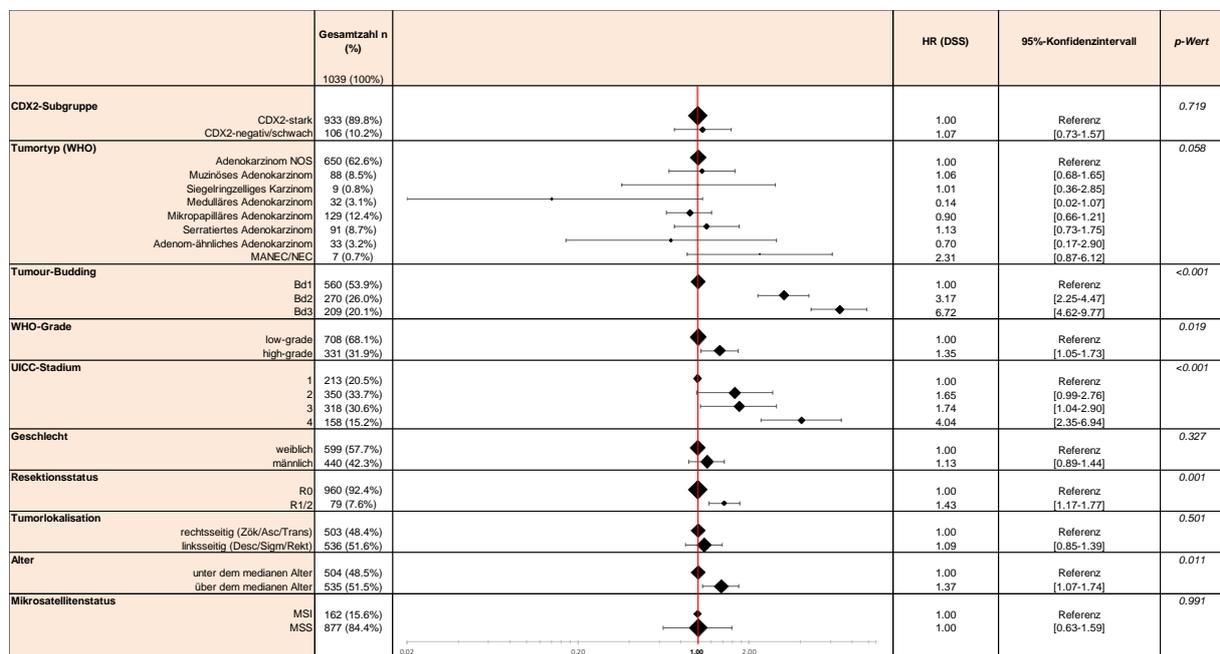


Abbildung 20: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in der Gesamtkohorte unter Einschluss der Parameter CDX2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, UICC-Stadium, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).

Dies änderte sich auch nicht nach weiterführender Betrachtung in den Subgruppen stratifiziert nach MSS-Status, Tumorlokalisation oder in Tumoren des UICC III-Stadiums (siehe exemplarisch Abbildung 21 für UICC III-Karzinome).

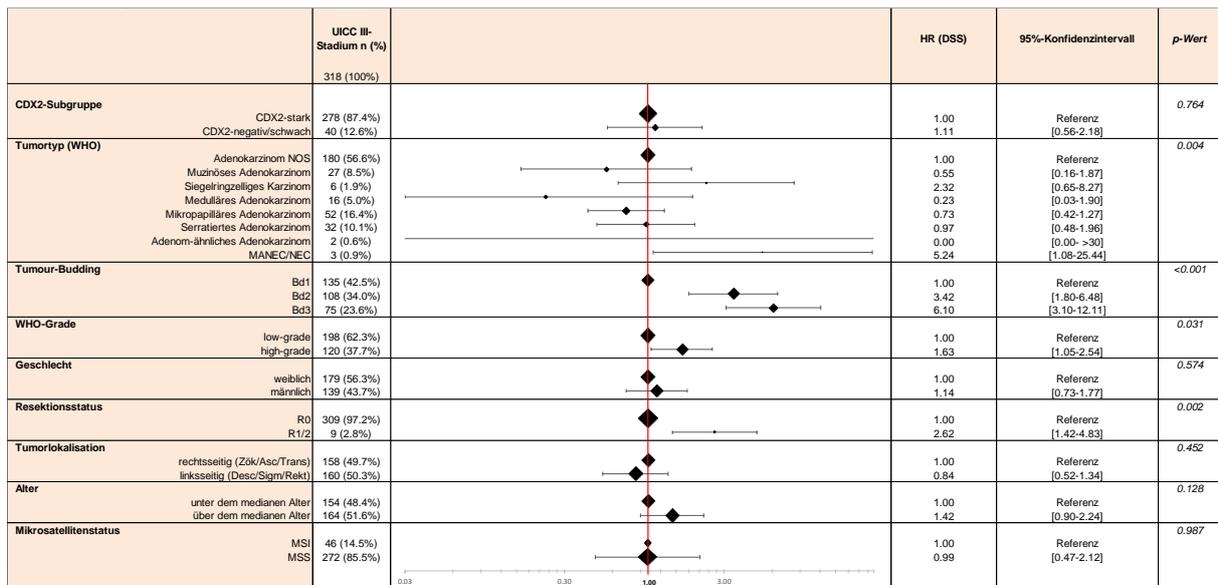


Abbildung 21: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in UICC III-Karzinomen unter Einschluss der Parameter CDX2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).

## 6.3 Statistische Auswertung von SATB2 als kolorektaler Differenzierungsmarker

### 6.3.1 Deskriptive Statistik der Expression von SATB2

#### 6.3.1.1 Expressionsverteilung von SATB2 in der Gesamtkohorte und SATB2-Gruppenformation

Analog zur Evaluation der CDX2-Expression wurde auch bei der SATB2-Expressionsanalyse zunächst eine kontinuierliche Expressionsvariable bestimmt und anschließend in eine dichotome Expressionsklassifikation transformiert (siehe Abbildung 22). Hierbei konnte der Großteil der Karzinome (bei angenommenem Cutoff-Wert an der 20. Perzentile) der Gruppe der Karzinome mit starker Expression von SATB2 in Bezug auf die Anzahl der SATB2-positiven Tumorzellen (n=808, 77.8%) zugeordnet werden, wobei nahezu zwei Drittel der Karzinome (n=679, 65.4%) eine Expression in  $\geq 90\%$  der Tumorzellen zeigten. Im Mittel waren 81% der Tumorzellen SATB2-positiv, der Median lag bei 95%. In der weiterführenden Expressionsmuster-Analyse erwiesen sich die meisten Tumoren als diffus und gleichzeitig stark SATB2-exprimierend (n=623, 60.0%) und nur ein geringer Anteil der diffus-exprimierenden Tumoren (n=16, 1.5%) konnte der Gruppe der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome zugeordnet werden. Anteilig war die Rate der heterogen SATB2-exprimierenden Tumoren in der Gruppe der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe höher (n=155, 67.1%) als in der Gruppe der SATB2<sup>stark</sup>-Karzinome (n=185, 22.9%), jedoch zeigten dennoch ca. ein Drittel aller untersuchten KRK (n=340, 32,7%) ein heterogenes Expressionsmuster. Obwohl für die Gruppenbildung in stark- und schwach/fehlend- SATB2-exprimierende KRK ausschließlich der prozentuale Anteil SATB2 exprimierender Tumorzellen herangezogen wurde, fielen v.a. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome hinsichtlich der Expressionsintensität auffallend häufig in die Gruppe der Karzinome mit schwacher (n=118, 51.1%) oder mittelgradiger (n=48, 20.8%) Intensität. SATB2<sup>stark</sup>-Karzinome waren im Vergleich hierzu deutlich seltener schwach (n=27, 3.3%) oder mittelgradig (n=164, 15.8%) gefärbt. Insgesamt präsentierte sich somit die Gruppe der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome häufiger mit einem heterogenen Expressionsmuster und einer schwachen bis fehlenden Expressionsintensität als ihre SATB2-stark exprimierende Vergleichsgruppe. Zum genaueren Vergleich siehe hierzu auch Tabellen 18 bis 20. Auch hier wurde im Sinne der Qualitätskontrolle die Interrater-Reliabilität sowie Konkordanz zwischen der Expressionsbestimmung am TMA und ganzen Tumorquerschnitten überprüft, welche sich auf 98%,  $p < 0.001$ ,  $\kappa$ -Koeffizient nach Cohen: 0.95 bzw. 95%,  $p < 0.001$ ,  $\kappa$ -Koeffizient nach Cohen: 0.88 beliefen.

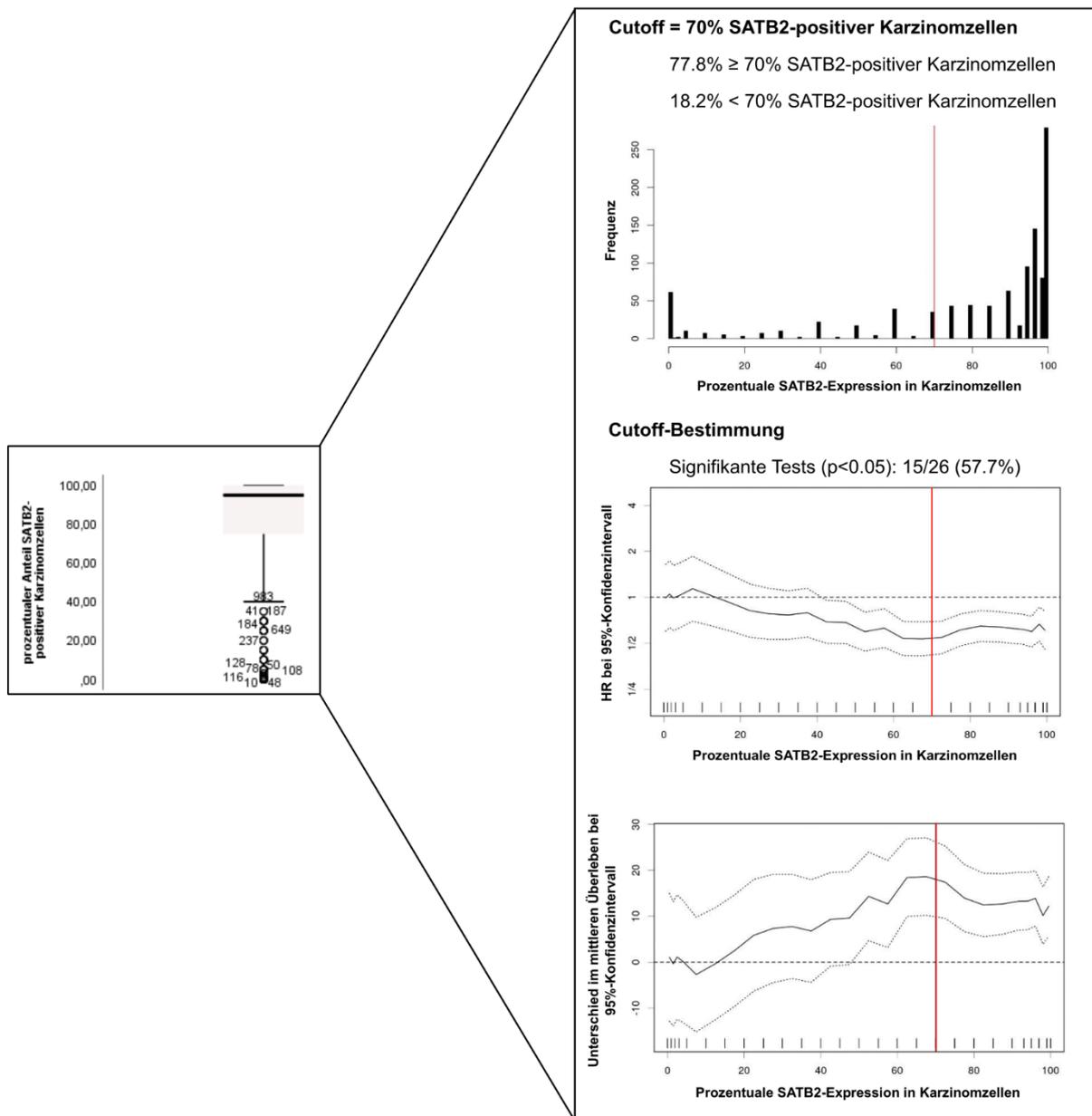


Abbildung 22: Transformation des Anteils SATB2-exprimierender Karzinomzellen (hier links als Boxplot dargestellt) in eine dichotome Klassifikation in eine SATB2<sup>stark</sup>- und SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppen an der 20. Perzentile ( $\hat{=}$  70% SATB2-positiver Karzinomzellen) mithilfe des Cutoff-Finders [263] (rechte Seite).

Die einzelnen Diagramme (rechts) verdeutlichen die Frequenz des prozentualen Anteils positiver Karzinomzellen im Histogramm (oben), das Hazard Ratio in Abhängigkeit vom Cutoff-Wert für DSS (Mitte) sowie den Überlebensunterschied zwischen den gebildeten CDX2-Expressionsgruppen für DSS in Abhängigkeit vom Cutoff-Wert (unten). Die rote Linie repräsentiert dabei jeweils den ermittelten optimalen Cutoff-Wert.

Tabelle 18: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsgruppe und Expressionsmuster (modifiziert nach [2]).

SATB2-Gruppe	Expressionsmuster			Gesamt	p-Wert
	fehlend	heterogen	diffus		
SATB2 <sup>negativ/schwach</sup>	60	155	16	231	p<0.001
SATB2 <sup>stark</sup>	0	185	623	808	
<b>Gesamt</b>	60	340	639	1039	

Tabelle 19: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsgruppe und Expressionsintensität (modifiziert nach [2]).

SATB2-Gruppe	Expressionsintensität				Gesamt	p-Wert
	fehlend	schwach	mittel	stark		
SATB2 <sup>negativ/schwach</sup>	60	118	48	5	231	p<0.001
SATB2 <sup>stark</sup>	0	27	164	617	808	
<b>Gesamt</b>	60	145	212	622	1039	

Tabelle 20: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsmuster und Expressionsintensität.

Expressionsmuster	Expressionsintensität				Gesamt	p-Wert
	fehlend	schwach	mittel	stark		
fehlend	60	0	0	0	60	p<0.001
heterogen	0	122	113	105	340	
diffus	0	23	99	517	639	
<b>Gesamt</b>	60	145	212	622	1039	

### 6.3.1.2 Expressionsverteilung von SATB2 nach Gruppenstratifizierung in zentrale Diagnosekriterien der WHO

#### 6.3.1.2.1 Korrelation der SATB2-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Betrachtet man die gängigen Parameter der Ausbreitungsdiagnostik in der histopathologischen Begutachtung von Tumoren, konnten wir feststellen, dass SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-KRK nicht nur häufiger mit einem fortgeschrittenen lokalem Tumorstadium einhergehen, sondern auch eine höhere Tendenz zur Invasion und systemischen Metastasierung zeigten. So konnten in dieser Gruppe fast ein Drittel der Karzinome dem pT4-Stadium (n=67, 29.0%) zugeordnet werden, während in der SATB2<sup>stark</sup>-Vergleichsgruppe nicht einmal ein Fünftel der KRK diesem Stadium zugeteilt werden konnte (n=128, 15.8%). Darüber hinaus fielen weit über die Hälfte der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome nodal-positiv aus (n=134, 58.0%) und ein Viertel (n=57, 24.7%) manifestierte sich mit Fernmetastasen. Dieses Verhalten spiegelte sich folglich auch bei der Prävalenz SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-KRK in fortgeschrittenen UICC-Stadien wider (UICC IV-Stadium: SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: n=59, 25.5% vs. SATB2<sup>stark</sup>: n=99, 12.3%). Auch die lokale Invasion in Lymphgefäßen (n=157, 68.0%), venösen Gefäßen (n=52, 22.5%) und perineural (n=31, 13.4%) wurde in SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Tumoren häufiger beobachtet als in SATB2<sup>stark</sup>-Karzinomen. In allen Parametern der histopathologischen Ausbreitungsdiagnostik konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden SATB2-Gruppen konstatiert werden. Weiterführend konnte auch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für einen Tumorbefall des Resektionsrandes (n=32, 13.9%) sowie eine geringe Prädominanz im rechtsseitigen Kolon für Karzinome mit signifikantem SATB2-Ausfall (n=138, 59.7%) festgestellt werden. Für weitere Details siehe hierzu auch Tabelle 21 und Abbildung 23.

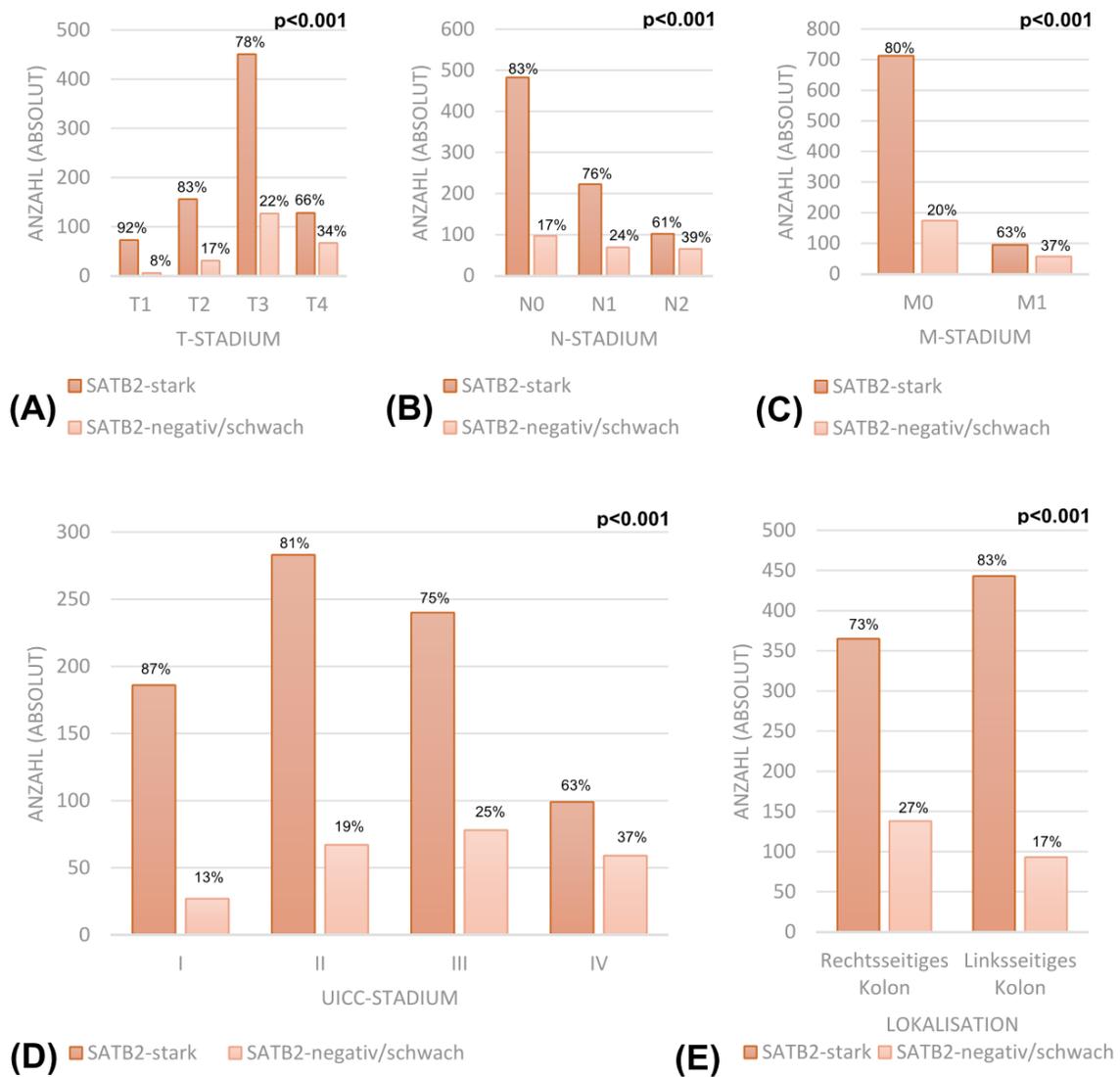


Abbildung 23: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (n=1039) bezogen auf die Parameter der Ausbreitungsdiagnostik pT-Stadium (A), pN-Stadium (B), pM-Stadium (C), UICC-Stadien (D) sowie die Lokalisation der Karzinome (E) (modifiziert nach [2]).

Tabelle 21: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte stratifiziert nach verschiedenen klinisch-pathologischen und morphologischen Parametern (in Spaltenprozent) (modifiziert nach [2]).

		Gesamtzahl n (%)	SATB2 negativ/schwach	SATB2 stark	p-Wert
		1039 (100.0%)	231 (22.2%)	808 (77.8%)	
<b>Alter</b>	unter dem medianen Alter	504 (48.5%)	105 (45.5%)	399 (49.4%)	0.297
	über dem medianen Alter	535 (51.5%)	126 (54.5%)	409 (50.6%)	
<b>Geschlecht</b>	männlich	599 (57.7%)	125 (54.1%)	474 (58.7%)	0.227
	weiblich	440 (42.3%)	106 (45.9%)	334 (41.3%)	
<b>pT</b>	1	79 (7.6%)	6 (2.6%)	73 (9.0%)	<0.001
	2	187 (18.0%)	31 (13.4%)	156 (19.3%)	
	3	578 (55.6%)	127 (55.0%)	451 (55.8%)	
	4	195 (18.8%)	67 (29.0%)	128 (15.8%)	
<b>pN</b>	0	580 (55.8%)	97 (42.0%)	483 (59.8%)	<0.001
	1	292 (28.1%)	69 (29.9%)	223 (27.6%)	
	2	167 (16.1%)	65 (28.1%)	102 (12.6%)	
<b>pM</b>	0	887 (85.4%)	174 (75.3%)	713 (88.2%)	<0.001
	1	152 (14.6%)	57 (24.7%)	95 (11.8%)	
<b>UICC-Stadium</b>	1	213 (20.5%)	27 (11.7%)	186 (23.0%)	<0.001
	2	350 (33.7%)	67 (29.0%)	283 (35.0%)	
	3	318 (30.6%)	78 (33.8%)	240 (29.7%)	
	4	158 (15.2%)	59 (25.5%)	99 (12.3%)	
<b>Tumortyp (WHO)</b>	Adenokarzinom NOS	650 (62.6%)	106 (45.9%)	544 (67.3%)	<0.001
	Muzinöses Adenokarzinom	88 (8.5%)	36 (15.6%)	52 (6.4%)	
	Siegelringzelliges Karzinom	9 (0.9%)	6 (2.6%)	3 (0.4%)	
	Medulläres Adenokarzinom	32 (3.1%)	13 (5.6%)	19 (2.4%)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	129 (12.4%)	41 (17.7%)	88 (10.9%)	
	Serratiertes Adenokarzinom	91 (8.7%)	19 (8.2%)	72 (8.9%)	
	Adenom-ähnliches Adenokarzinom	33 (3.2%)	5 (2.2%)	28 (3.5%)	
	MANEC/NEC	7 (0.7%)	5 (2.2%)	2 (0.2%)	
<b>WHO-Grade</b>	low-grade	708 (68.1%)	125 (54.1%)	583 (72.2%)	<0.001
	high-grade	331 (31.9%)	106 (45.9%)	225 (27.8%)	
<b>Tumour Budding</b>	Bd1	560 (53.9%)	96 (41.6%)	464 (57.4%)	<0.001
	Bd2	270 (26.0%)	60 (26.0%)	210 (26.0%)	
	Bd3	209 (20.1%)	75 (32.5%)	134 (16.6%)	
<b>Resektionsstatus</b>	R0	960 (92.4%)	199 (86.1%)	761 (94.2%)	<0.001
	R1	49 (4.7%)	22 (9.5%)	27 (3.3%)	
	R2	30 (2.9%)	10 (4.3%)	20 (2.5%)	
<b>Lymphgefäßinvasion</b>	L0	508 (48.9%)	74 (32.0%)	434 (53.7%)	0.001
	L1	531 (51.1%)	157 (68.0%)	374 (46.3%)	
<b>Veneninvasion</b>	V0	904 (87.0%)	179 (77.5%)	725 (89.7%)	<0.001
	V1	135 (13.0%)	52 (22.5%)	83 (10.3%)	
<b>Perineurale Invasion</b>	Pn0	956 (92.0%)	200 (86.6%)	756 (93.6%)	0.001
	Pn1	83 (8.0%)	31 (13.4%)	52 (6.4%)	
<b>Mikrosatellitenstatus</b>	MSS	877 (84.4%)	182 (78.8%)	695 (86.0%)	0.01
	MSI	162 (15.6%)	49 (21.2%)	113 (14.0%)	
<b>Tumorlokalisation</b>	rechtsseitig (Zök/Asc/Trans)	503 (48.4%)	138 (59.7%)	365 (45.2%)	<0.001
	linksseitig (Desc/Sigm/Rekt)	536 (51.6%)	93 (40.3%)	443 (54.8%)	

### 6.3.1.2.2 SATB2-Expression unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter

#### **SATB2-Expression in histomorphologischen Subtypen**

Wir beobachteten einen starken Zusammenhang zwischen der Expression bzw. einem Expressionsverlust von SATB2 und den morphologischen Varianten des KRK ( $p < 0.001$ ). So konnten wir eine Dominanz eines SATB2-Verlusts v.a. in den KRK-Subtypen feststellen, die der Gruppe der Siegelringzelligen Karzinome ( $n=6$ , 66.7%) oder der MANEC/NEC ( $n=5$ , 71.4%) angehörten. Auch Muzinöse ( $n=36$ , 40.9%) oder Medulläre Adenokarzinome ( $n=13$ , 40.6%) präsentierten sich überdurchschnittlich häufig mit einer defizienten SATB2-Expression. Abbildung 24 stellt die Verteilung der Karzinome mit starker bzw. schwacher bis fehlender Expression von SATB2 in den einzelnen morphologischen Subtypen dar. Darüber hinaus veranschaulicht Abbildung 25 repräsentativ die Darstellung jeweils SATB2-positiver und SATB2-negativer Varianten der einzelnen histologischen KRK-Subtypen der untersuchten Kohorte.

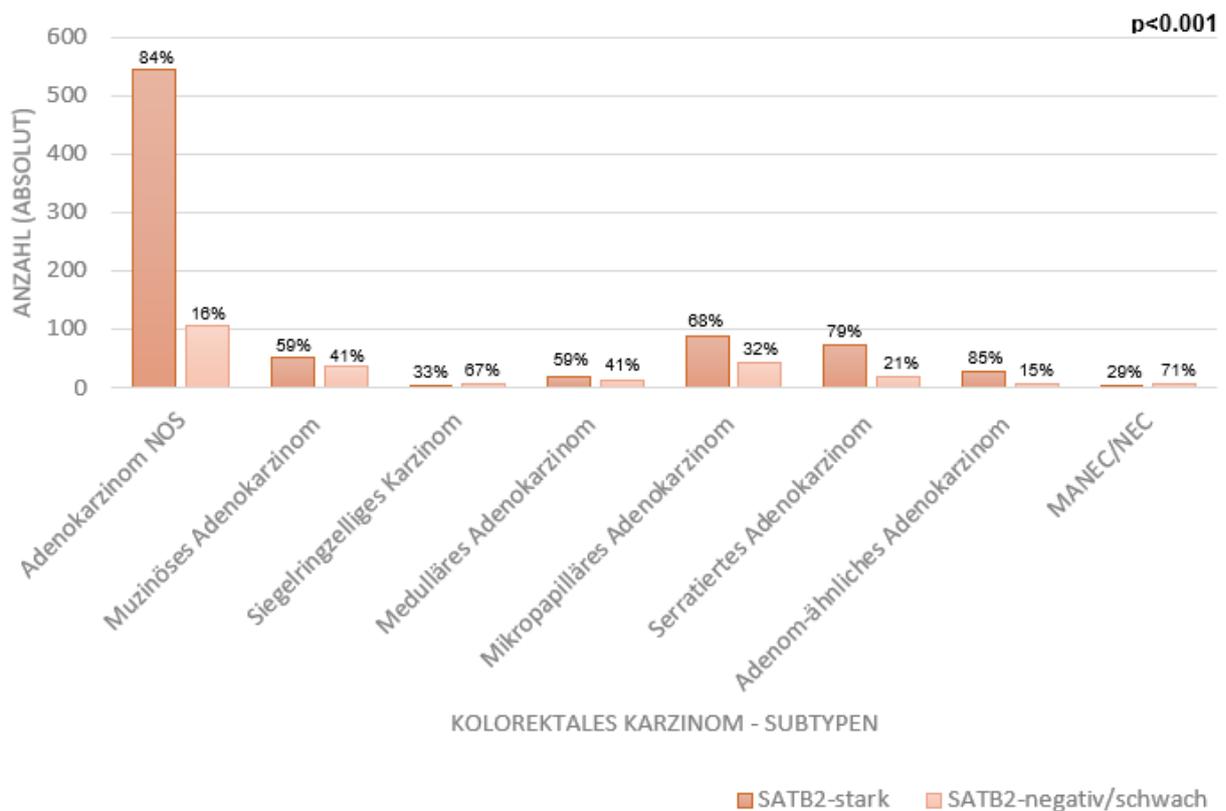
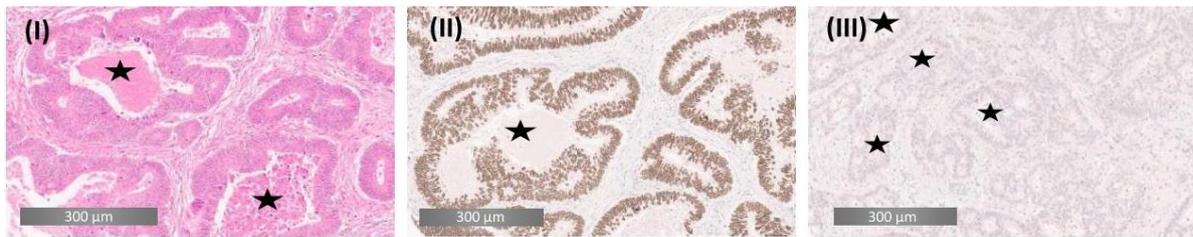


Abbildung 24: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen auf die Subtypen des Kolorektalen Karzinoms in der Gesamtkohorte ( $n=1039$ ) (modifiziert nach [2]).



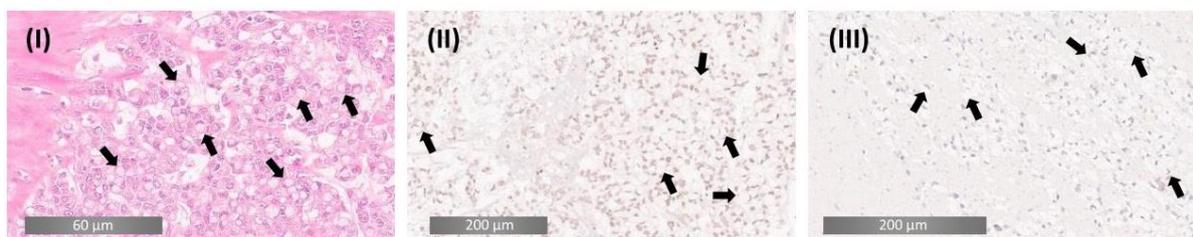
(A) Bild eines Adenokarzinoms NOS mit typischer Stromadesmoplasie und intraluminal gelegenen Komedonekrosen (Stern) in der HE-Färbung (I) sowie Ausschnitte jeweils eines Vertreters dieses Subtyps aus der SATB2<sup>stark</sup>-Expressionsgruppe mit Expression von SATB2 in nahezu allen Tumorzellen (II) sowie aus der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Expressionsgruppe mit nur spärlichen und allenfalls schwach SATB2 exprimierenden Tumorzellen (III).



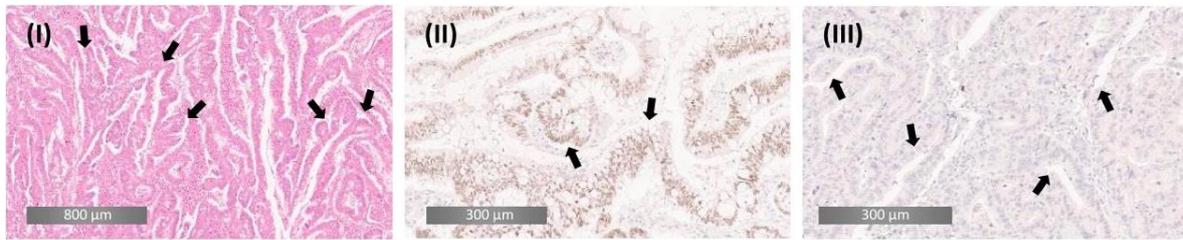
(B) Muzinöses Adenokarzinom mit geschichtet gelagerten malignen Epithelzellen und reichlich extrazellulär gelegenen Schleimmassen (Stern). Darstellung in der HE-Färbung (I) sowie als SATB2<sup>stark</sup>- (II) und SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Variante mit hier vollständigem Verlust der SATB2-Expression (III).



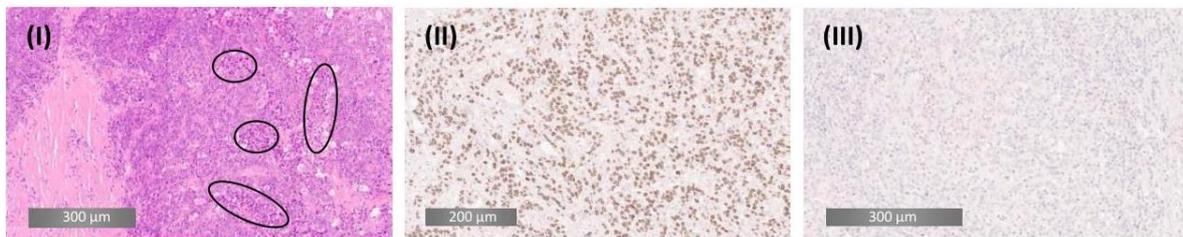
(C) Mikropapilläres Adenokarzinom mit charakteristischerweise kleinen Drüsenformationen und artifiziell entstandenen Zwischenräumen am Übergang vom Drüsenepithel zum Stroma (Sterne) in HE-Färbung (I) sowie als SATB2 positive (II) und negative Variante (III).



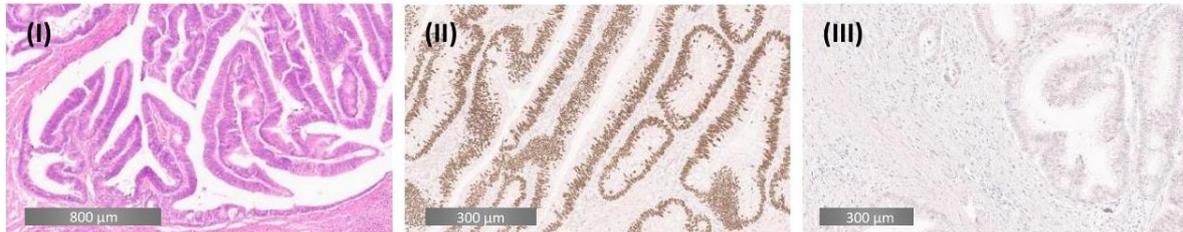
(D) Siegelringzelliges Adenokarzinom. Es zeigt sich die charakteristische Morphologie der maligne transformierten Epithelzellen mit intrazytoplasmatisch gelegener Muzinbildung und randständigen Kernen (Pfeile). Darstellung in HE-Färbung (I) sowie exemplarisch ein SATB2 stark exprimierendes Karzinom (II) und ein Beispiel eines SATB2 schwach exprimierenden Karzinoms mit maximal 10% SATB2-positiver Tumorzellen (III).



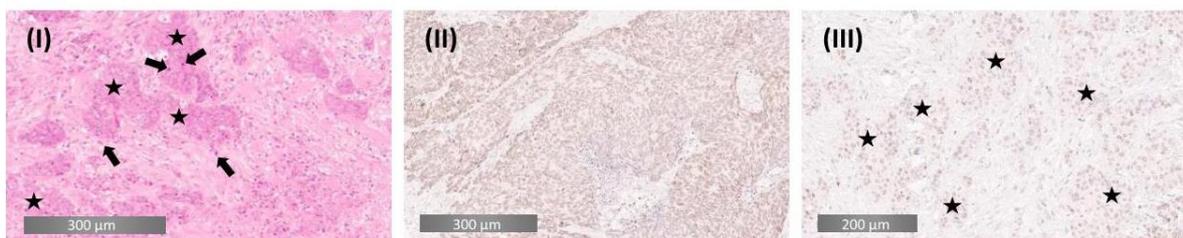
(E) Serratiertes Adenokarzinom mit typischer sägezahnartiger Drüsenarchitektur (Pfeile) in der HE-Färbung (I) und jeweils Abbildung eines Vertreters der SATB2<sup>stark</sup>-Gruppe (II) mit kräftiger nukleärer SATB2-Expression in nahezu allen Zellen sowie der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Gruppe (III) mit vollständigem Expressionsverlust.



(F) Medulläres Adenokarzinom mit solidem, synzytalem Tumorwachstum zahlreichen intratumoralen Lymphozyten (Kreise) in der HE-Färbung (I). In Abbildung (II) erkennt man eine ausgeprägte nukleäre Expression von STAB2 in diesen Zellverbänden, während hingegen in Abbildung (III) ein vollständiger SATB2-Verlust dargestellt ist.



(G) Bild eines Adenom-ähnlichen Adenokarzinom mit villös anmutenden, gut differenzierten Drüsenanteilen und geringer desmoplastischer Umgebungsreaktion in der HE-Färbung (I). In (II) zeigen die Epithelzellen eine 100%ige und starke Expression von SATB2. Das Karzinom, das in Abbildung (III) zur Darstellung kommt, repräsentiert hingegen einen eher seltenen Fall eines SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Adenom-ähnlichen Adenokarzinoms.



(H) Anteile eines neuroendokrin differenzierten Karzinoms mit solide-organoid konfigurierten Epithelzellverbänden (Sterne) und dazwischenliegenden Einzelzellnekrosen (Pfeile) in der HE-Färbung. Abbildung (II) stellt einen SATB2<sup>stark</sup>-Vertreter dieses Subtyps dar. In Abbildung (III) kommen Epithelzellen mit teils schweren Kernatypien und einer schwachen SATB2-Expression in maximal 40% der Karzinomzellen zur Darstellung (Sterne).

Abbildung 25: In der Kohorte vertretene Subtypen (A-H) in der HE-Färbung (I) sowie jeweils exemplarisch ein Vertreter der SATB2<sup>stark</sup>- (II) und der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Expressionsgruppe (III).

SATB2-Expression unter Betrachtung der zentralen morphologischen Parameter

### SATB2-Expression in den WHO-Grading-Gruppen

Betrachtet man als weiteren zentralen morphologischen Parameter die Verteilung der SATB2-Expression in den einzelnen WHO-Grading-Gruppen, so zeigte sich auch hier eine signifikante Häufung ( $p < 0.001$ ) von Karzinomen mit geringer bis fehlender SATB2-Expression in hochgradig dedifferenzierten Karzinomen im Vergleich zum stark-exprimierenden Pendant (siehe hierzu auch Tabelle 21 und Abbildung 26).

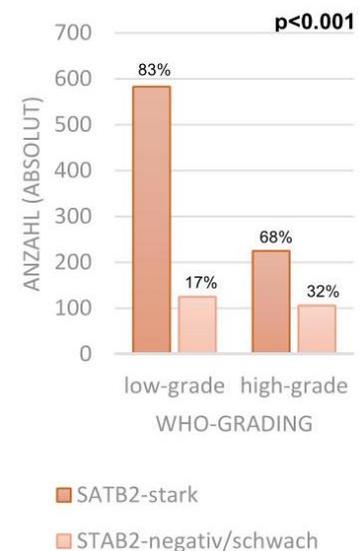
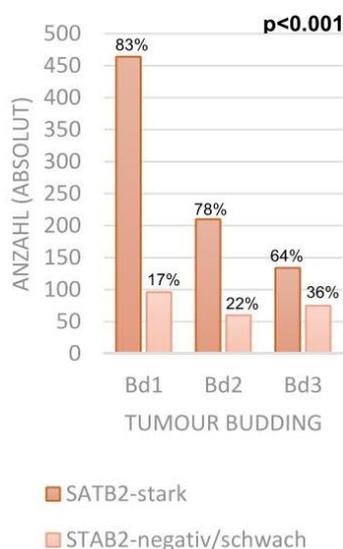


Abbildung 26: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in Bezug auf die WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [2]).

### SATB2-Expression stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität



Auch beim Tumour Budding, welches ebenfalls als ein prognostisch-diagnostischer Marker angesehen werden kann und mit zunehmendem Grad ein aggressiveres biologisches Verhalten widerspiegelt, traten SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome deutlich häufiger in Bd3-Tumoren auf ( $n = 75$ , 35.9%) als in den Vergleichsgruppen mit niedriger Budding-Aktivität (vergleiche Tabelle 21 und Abbildung 27).

Abbildung 27: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in Bezug auf die Tumour Budding-Aktivität der Karzinome (modifiziert nach [2]).

### 6.3.1.2.3 SATB2-Expression unter Betrachtung des Mikrosatellitenstatus

Nach Stratifizierung der Kohorte nach Mikrosatellitenstatus zeigte sich in MSI-Karzinomen eine fehlende oder geringere SATB2-Expression signifikant ( $p=0.01$ ) häufiger ( $n=49$ , 30.2%) vertreten als in MSS-Karzinomen ( $n=113$ , 20.8%) (siehe Tabelle 21 und Abbildung 28).

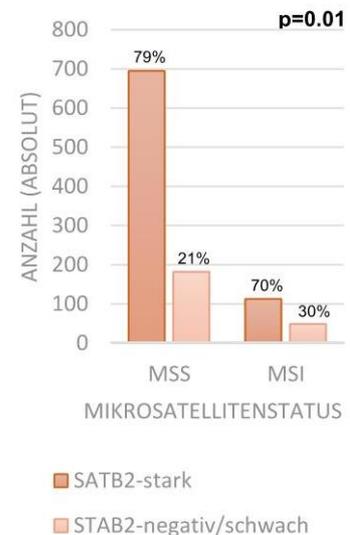


Abbildung 28: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen bezüglich Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).

## 6.3.2 Überlebenszeitanalyse der Expression von SATB2 in univariaten Analysen

### 6.3.2.1 Prognostische Relevanz der SATB2-Gruppen in der Gesamtkohorte

Nach Bildung der SATB2-Gruppen anhand des zuvor ermittelten Cutoff-Wertes zeigte sich in der Gruppe der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome eine signifikant ( $p<0.001$ ) niedrigere Überlebensrate über allen Überlebensparametern (OS, DSS, DFS) im Vergleich zur SATB2<sup>stark</sup>-exprimierenden Gruppe bezogen auf die Gesamtkohorte. So überlebten Patienten im Gesamtüberleben (OS) in der SATB2<sup>stark</sup>-Gruppe durchschnittlich 82.2 [1.7] Monate, während SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Patienten mit 68.4 [3.6] Monaten deutlich schlechter abschnitten. Hinsichtlich des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) fiel der Unterschied noch größer aus (SATB2<sup>stark</sup>: 91.5 [1.7] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 74.2 [3.6] Monate) und auch das mittlere krankheitsfreie Überleben folgte diesem Trend (SATB2<sup>stark</sup>: 86.3 [1.8] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 68.0 [3.9] Monate) (vergleiche Tabelle 8). Die in Abbildung 29 dargestellten Kaplan-Meier-Kurven verdeutlichen den Unterschied zwischen den SATB2-Expressionsgruppen bezogen auf die einzelnen Überlebensparameter.

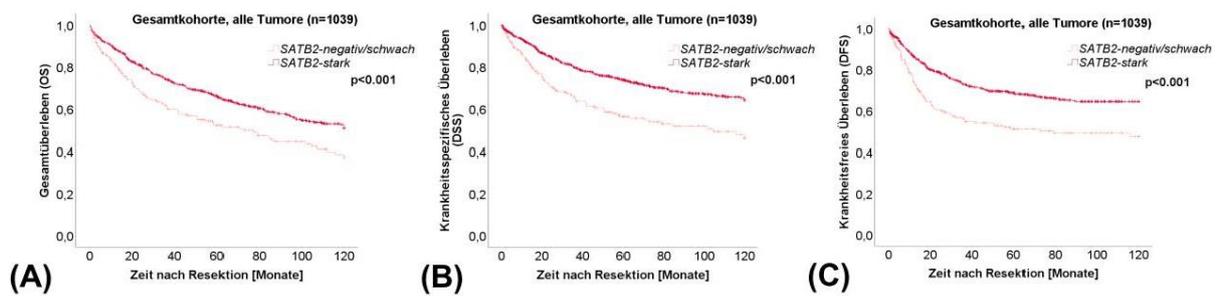


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Überlebensparameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) in Kaplan-Meier-Kurven bezogen auf die Gesamtkohorte (n=1039) (modifiziert nach [2]).

### 6.3.2.2 Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Parametern der Ausbreitungsdiagnostik und UICC-Stadien

Übertragen auf die UICC-Stadien zeigte sich in den Überlebensanalysen nur im Stadium III ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen den SATB2-Gruppen (OS:  $p=0.025$ , DSS:  $p=0.012$ , DFS:  $p=0.004$ ) (Siehe Abbildung 30). Interessanterweise ließ sich sowohl in den lokal begrenzten UICC-Stadien als auch im weit fortgeschrittenen UICC IV-Stadium in keinem der Überlebensanalysen ein signifikanter Unterschied zwischen SATB2<sup>stark</sup>- und SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinomen feststellen (vergleiche hierzu Tabelle 22). Dies ließ sich vor allem nach einer weiteren Aufgliederung in TNM-Stadien erklären. So stellte eine starke SATB2-Expression in beginnend lokal metastasierenden Karzinomen (N1) einen signifikanten prognostischen Vorteil über alle Überlebensparameter hinweg dar (exemplarisch N1(DSS): SATB2<sup>stark</sup>: 85.9 [3.3] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 63.7 [6.4] Monate,  $p=0.002$ ), während dieser Effekt im lokal weiter fortgeschrittenen metastasierten (N2) (exemplarisch N2(DSS): SATB2<sup>stark</sup>: 55.9 [5.3] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 52.4 [6.6] Monate,  $p=0.53$ ) oder fernmetastasierten Zustand (M1) (exemplarisch M1(DSS): SATB2<sup>stark</sup>: 44.4 [4.7] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 44.0 [6.0] Monate,  $p=0.514$ ) keine Rolle mehr spielte.

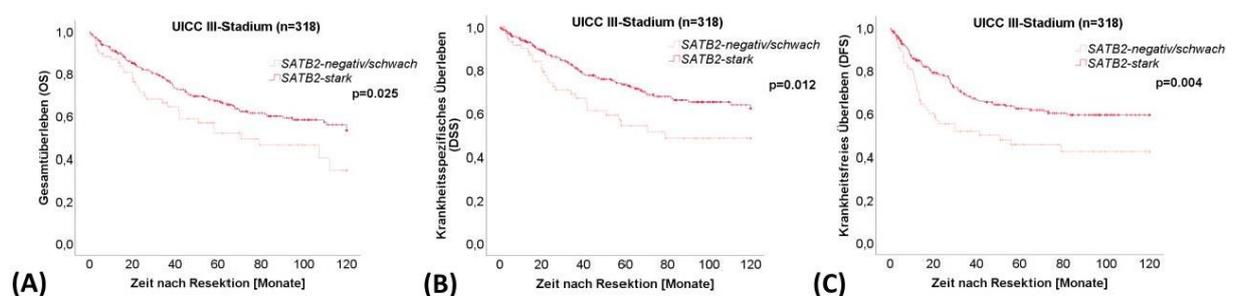


Abbildung 30: Prognostische Relevanz der SATB2-Expression in univariaten Überlebensanalysen in UICC III-Karzinomen für die Parameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) (modifiziert nach [2]).

Tabelle 22: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expression stratifiziert nach UICC-Stadien jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

	SATB2- Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
UICC-Stadium I	SATB2-negativ/schwach SATB2-stark	27 (12.7%) 186 (87.3%)	93.1 [8.2] 97.1 [3.1]	0.397	111.1 [5.3] 111.0 [2.3]	0.593	114.6 [4.6] 107.0 [2.6]	0.608
UICC-Stadium II	SATB2-negativ/schwach SATB2-stark	67 (19.1%) 283 (80.9%)	86.2 [6.4] 86.0 [2.6]	0.977	95.5 [6.2] 97.3 [2.7]	0.664	89.5 [6.7] 96.9 [2.8]	0.342
UICC-Stadium III	SATB2-negativ/schwach SATB2-stark	78 (24.5%) 240 (75.5%)	70.3 [6.1] 84.4 [3.1]	0.025	74.5 [6.2] 91.0 [3.0]	0.012	62.1 [6.5] 81.2 [3.4]	0.004
UICC-Stadium IV	SATB2-negativ/schwach SATB2-stark	59 (37.3%) 99 (62.7%)	37.4 [5.6] 40.3 [4.2]	0.593	38.3 [5.7] 43.9 [4.6]	0.397	33.4 [6.2] 33.2 [3.5]	0.564

### 6.3.2.3 Prognostische Relevanz von SATB2 in Gruppen der zentralen morphologischen Parameter

#### **Prognostische Relevanz von SATB2 in histomorphologischen Subtypen**

Hinsichtlich einer Betrachtung der SATB2-Expression in den histomorphologischen Subtypen lassen sich in univariaten Überlebensanalysen nur bedingt prognostische Aussagen treffen. Zwar ließen sich in einigen Subtypen (klassisches Adenokarzinom NOS und Mikropapilläres Adenokarzinom für alle Überlebensparameter sowie Adenom-ähnliches Karzinom für DSS) statistisch signifikante prognostische Wertigkeiten konstatieren, jedoch nur in solchen Subtypen, die anteilig besonders stark in der Gesamtkohorte vertreten waren und eine ausgeprägte glanduläre Morphologie aufweisen (siehe Tabelle 23). Insbesondere in Subtypen, die von der klassischen Morphologie abweichen, schien die prognostische Relevanz nicht über den allgemeinen prognostischen Effekt der morphologischen Variante hinauszugehen (siehe weitere Details hierzu in den Kapiteln „Multivariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expression“ und „Diskussion“).

Tabelle 23: Univariate Analyse der SATB2-Expression in den einzelnen histologischen Subtypen des Kolorektalen Karzinoms jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

	SATB2- Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
Adenokarzinom NOS	SATB2-negativ/schwach	106 (16.3%)	73.1 [5.1]	0.016	80.3 [5.2]	0.002	74.5 [5.6]	0.003
	SATB2-stark	544 (83.7%)	85.6 [2.1]		94.7 [2.0]		89.7 [2.1]	
Muzinöses Adenokarzinom	SATB2-negativ/schwach	36 (40.9%)	78.0 [9.1]	0.937	82.4 [9.3]	0.4	65.9 [9.5]	0.123
	SATB2-stark	52 (59.1%)	75.5 [7.0]		90.1 [7.0]		86.2 [7.4]	
Siegelringzelliges Karzinom	SATB2-negativ/schwach	6 (66.7%)	33.0 [21.5]	0.151	33.0 [21.5]	0.151	32.1 [21.7]	0.424
	SATB2-stark	3 (33.3%)	36.5 [0.0]		36.5 [0.0]		27.8 [0.0]	
Medulläres Karzinom	SATB2-negativ/schwach	13 (40.6%)	92.4 [11.7]	0.44	120.0 [0.0]	0.375	120.0 [0.0]	0.202
	SATB2-stark	19 (59.4%)	102.1 [9.2]		113.4 [6.3]		107.2 [8.4]	
Mikropapilläres Adenokarzinom	SATB2-negativ/schwach	41 (31.8%)	40.3 [7.5]	0.028	41.2 [7.8]	0.017	34.1 [8.0]	0.009
	SATB2-stark	88 (68.2%)	59.0 [5.3]		62.5 [5.5]		52.6 (5.3)	
Serratiertes Karzinom	SATB2-negativ/schwach	19 (26.4%)	77.6 [12.1]	0.931	78.7 [12.0]	0.423	69.5 [13.2]	0.198
	SATB2-stark	72 (79.1%)	78.6 [6.3]		90.1 [6.0]		88.3 [6.1]	
Adenom-ähnliches Karzinom	SATB2-negativ/schwach	5 (15.2%)	62.8 [16.3]	0.051	62.8 [11.5]	0.006	76.9 [0.0]	0.655
	SATB2-stark	28 (84.8%)	101.3 [6.6]		118.4 [1.5]		115.7 [4.2]	
MANEC/NEC	SATB2-negativ/schwach	5 (71.4%)	14.9 [9.4]	0.424	14.9 [9.4]	0.424	14.9 [9.4]	0.709
	SATB2-stark	2 (28.6%)	21.7 [0.0]		21.7 [0.0]		10.0 [0.0]	

### Prognostische Relevanz von SATB2 in den WHO-Grading-Gruppen

Betrachtete man die prognostische Relevanz der SATB2-Expression in den einzelnen WHO-Grading-Gruppen, so zeigte sich in der Gruppe der high-grade Karzinome über allen Überlebensparametern ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit stark SATB2-exprimierenden Karzinomen gegenüber der SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Vergleichsgruppe (OS:  $p=0.013$ ; DSS:  $p=0.002$ ; DFS:  $p=0.016$ ). Bei den low-grade Karzinomen ließ sich dieser Sachverhalt nur für die krankheitsspezifischen Überlebensparameter signifikant nachweisen (DSS:  $p=0.027$ ; DFS:  $p=0.001$ ), nicht jedoch für das Gesamtüberleben (OS:  $p=0.110$ ). Für weitere Details hierzu siehe Tabelle 24 und Abbildung 31.

Tabelle 24: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS in WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [2]).

	SATB2- Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
WHO low-grade Karzinome	SATB2-negativ/schwach	125 (17.6%)	81.1 [4.7]	0.110	88.1 [4.7]	0.027	77.1 [5.1]	0.001
	SATB2-stark	583 (82.4%)	87.1 [2.0]		96.7 [1.9]		92.1 [2.0]	
WHO high-grade Karzinome	SATB2-negativ/schwach	106 (32%)	54.8 [5.0]	0.013	59.5 [5.3]	0.002	57.4 [5.6]	0.016
	SATB2-stark	225 (68%)	70.3 [3.4]		78.8 [3.5]		72.0 [3.6]	

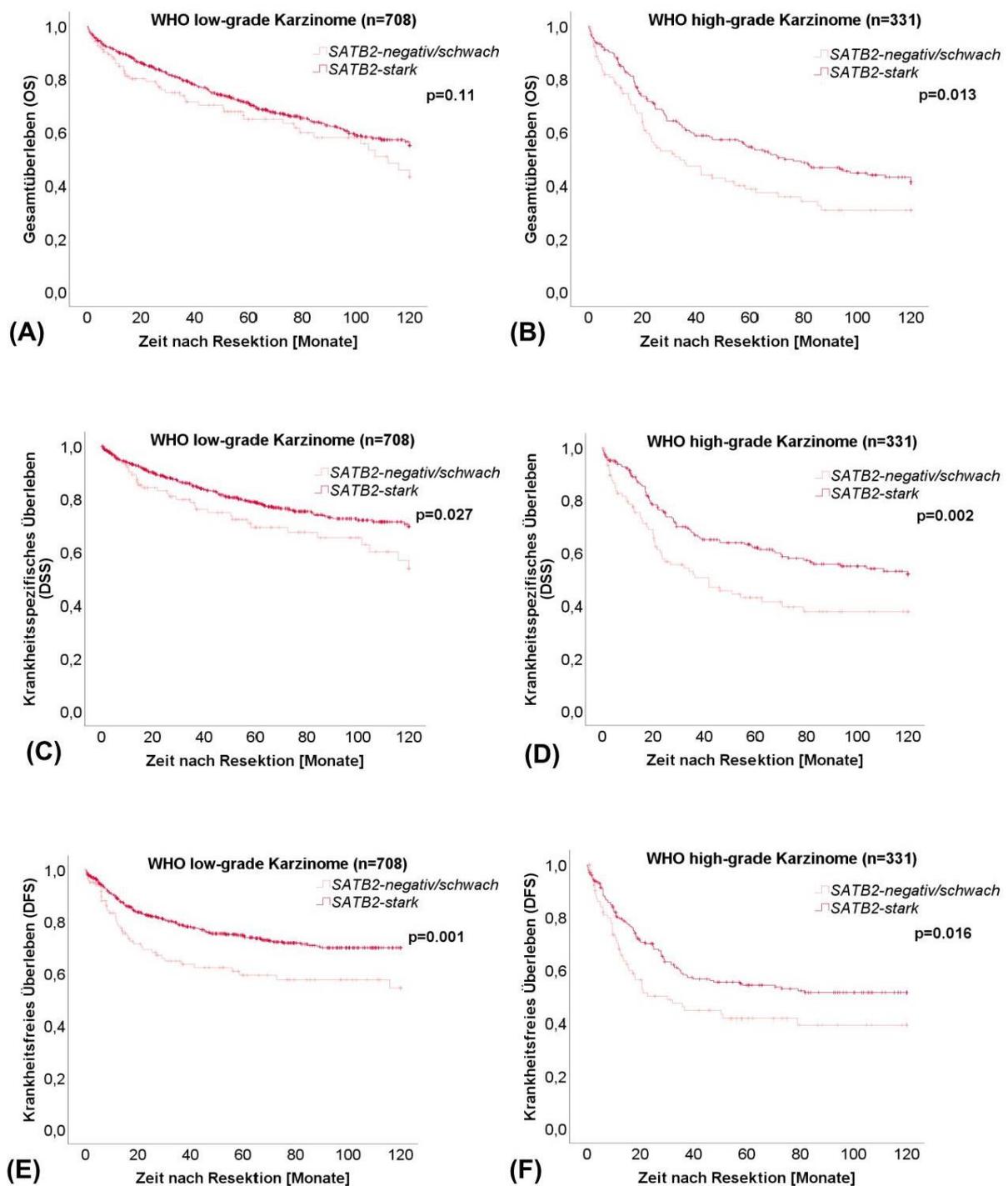


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach low-grade (A, C, E) und high-grade Karzinomen (B, D, F) jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

### Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität

Auch hinsichtlich des Tumour Buddings konnte nach Stratifizierung in die einzelnen Budding-Stadien in besonderem Ausmaß ein signifikant günstigerer prognostischer Verlauf für SATB2<sup>stark</sup>-Karzinome in der Hochrisiko-Gruppe der Bd3-Karzinome für alle Überlebensparameter festgestellt werden (exemplarisch DSS:  $p=0.002$ ) (siehe Abbildung 32), wobei auch hier insbesondere die krankheitsspezifischen Überlebensintervalle eine größere Spanne zwischen den Überlebenszeiten der beiden SATB2-Gruppen aufwiesen (DSS: SATB2<sup>stark</sup>: 51.1 [4.4] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 29.0 [4.3] Monate; DFS: SATB2<sup>stark</sup>: 44.3 [4.4] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 19.4 [3.6] Monate). In Tumoren mit einer niedrigeren Budding-Aktivität hingegen war der prognostische Unterschied zwischen den SATB2-Gruppen einerseits geringer bzw. nicht signifikant (exemplarisch Bd1: DSS:  $p=0.055$ ) und zum anderen fiel der durchschnittliche zeitliche Überlebensvorteil auch geringer aus (z.B. Bd1: DSS: SATB2<sup>stark</sup>: 110.2 [1.4] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 104.4 [3.9] Monate) (vergleiche Tabelle 25).

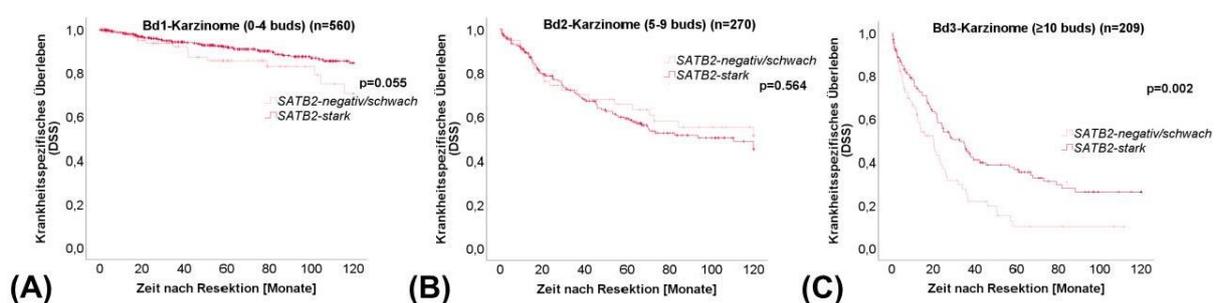


Abbildung 32: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) der SATB2-Expressionsgruppen dargestellt in den Tumour Budding-Subgruppen Bd1 (A), Bd2 (B), Bd3 (C) (modifiziert nach [2]).

Tabelle 25: Univariate Überlebensanalyse der SATB2-Expressionsgruppen in Tumour Budding-Subgruppen jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

	SATB2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	
				p-Wert		p-Wert		p-Wert
Bd1-Karzinome (0-4 buds)	SATB2-negativ/schwach	96 (17.1%)	90.3 [4.8]	0.034	104.4 [3.9]	0.055	99.7 [4.6]	0.026
	SATB2-stark	464 (82.9%)	99.3 [1.9]		110.2 [1.4]		108.3 [1.6]	
Bd2-Karzinome (5-9 buds)	SATB2-negativ/schwach	60 (22.2%)	78.3 [6.7]	0.147	80.7 [6.7]	0.564	74.7 [7.2]	0.258
	SATB2-stark	210 (77.8%)	68.4 [3.5]		76.7 [3.6]		64.6 [3.8]	
Bd3-Karzinome (≥10 buds)	SATB2-negativ/schwach	75 (35.9%)	29.4 [4.4]	0.005	29.0 [4.3]	0.002	19.4 [3.6]	<0.001
	SATB2-stark	134 (64.1%)	46.7 [4.0]		51.1 [4.4]		44.3 [4.4]	

### 6.3.2.4 Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus

Ein signifikanter prognostischer Vorteil konnte ebenfalls für SATB2<sup>stark</sup>-Karzinome in MSS-Tumoren ( $p < 0.001$  für OS, DSS und DFS) nachgewiesen werden, jedoch nicht für MSI-Karzinome. In dieser Gruppe zeigte sich nur in Bezug auf die DSS ( $p = 0.023$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den SATB2-Gruppen, während hingegen für OS und DFS das Signifikanzniveau nicht erreicht werden konnte (OS:  $p = 0.072$ ; DFS:  $p = 0.163$ ) (vergleiche hierzu Tabelle 26 und Abbildung 33).

Tabelle 26: Univariate Überlebensanalyse der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

	SATB2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	p-Wert
MSS-Karzinome	SATB2-negativ/schwach	182 (20.7%)	65.4 [4.0]	<0.001	70.0 [4.1]	<0.001	62.8 [4.3]	<0.001
	SATB2-stark	695 (79.3%)	80.7 [1.9]		89.4 [1.8]		84.1 [2.0]	
MSI-Karzinome	SATB2-negativ/schwach	49 (30.2%)	78.8 [7.3]	0.072	90.6 [7.1]	0.023	89.0 [7.9]	0.163
	SATB2-stark	113 (69.8%)	92.3 [4.4]		105.8 [3.6]		101.0 [4.1]	

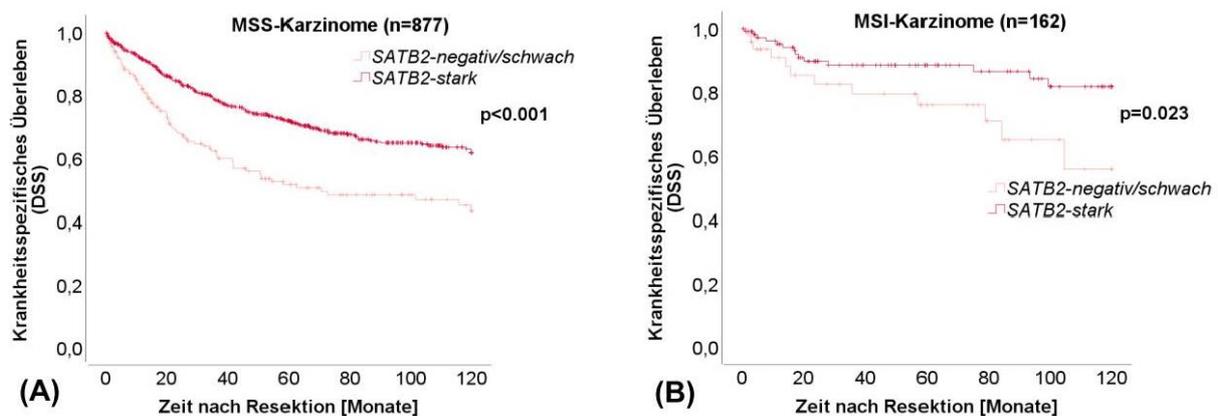


Abbildung 33: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) in den SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach Mikrosatelliten-stabilen (A) und Mikrosatelliten-instabilen Karzinomen (B) (modifiziert nach [2]).

### 6.3.2.5 Prognostische Relevanz von SATB2 stratifiziert nach Tumorlokalisierung

Unter Einbeziehung der Lokalisation des KRK zeigte sich sowohl in rechtsseitigen (exemplarisch DSS: SATB2<sup>stark</sup>: 90.8 [2.6] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 77.4 [4.7] Monate,  $p=0.002$ ), als auch in linksseitigen KRK (exemplarisch DSS: SATB2<sup>stark</sup>: 92.1 [2.2] Monate vs. SATB2<sup>negativ/schwach</sup>: 68.9 [5.9] Monate,  $p<0.001$ ) ein signifikanter Überlebensvorteil für SATB2<sup>stark</sup>-Patienten (siehe hierzu auch Abbildung 34).

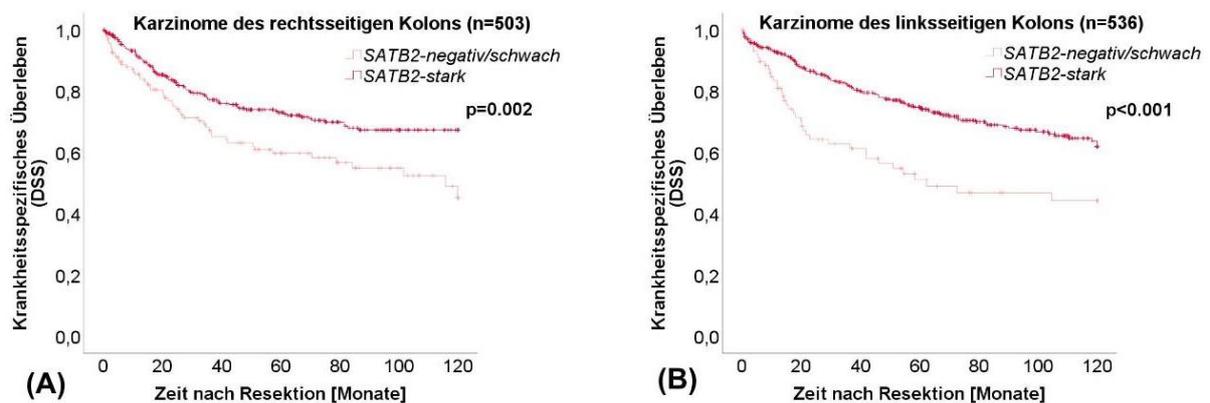


Abbildung 34: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) der SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach Lokalisation der Karzinome im rechtsseitigen (A) oder linksseitigen Kolon (B) (modifiziert nach [2]).

### 6.3.3 Multivariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expression

In multivariaten Analysen unter Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, Resektionsstatus, UICC-Stadium, Mikrosatellitenstatus, WHO-Grade, KRK-Subtypen, Tumour Budding und SATB2-Expressionsgruppen konnte der SATB2-Expression in der Gesamtkohorte keinen prognostischen Wert als unabhängige Variable im Gegensatz zur univariaten Überlebensanalyse zugeschrieben werden (OS:  $p=0.316$ ; DSS:  $p=0.102$ ; DFS:  $p=0.098$ ) (siehe Abbildung 35).

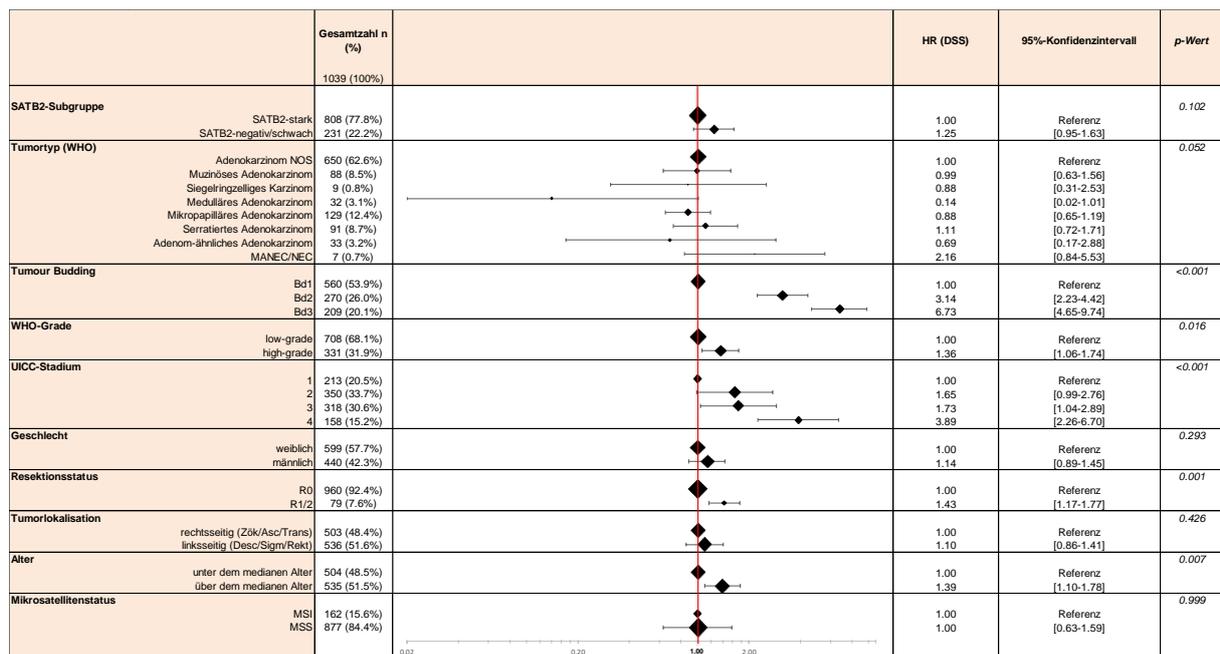


Abbildung 35: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in der Gesamtkohorte unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, UICC-Stadium, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).

Auf Grundlage der Ergebnisse in den univariaten Überlebensanalysen führten wir eine Stratifizierung in die prognostisch bedeutsamen Hochrisiko-Gruppen durch. Hier zeigte sich insbesondere in den UICC III- sowie den Bd3-Karzinomen, als Vertreter der Hochrisiko-Subgruppen, in multivariaten Cox-Regressionsanalysen jeweils unter Berücksichtigung aller oben genannten Variablen, dass der Expressionsstatus von SATB2 einen signifikanten unabhängigen prognostischen Stellenwert besitzt und ein SATB2-Verlust in diesen Gruppen einen besonders aggressiven Krankheitsverlauf demaskieren kann (siehe hierzu Abbildungen 36 und 37).

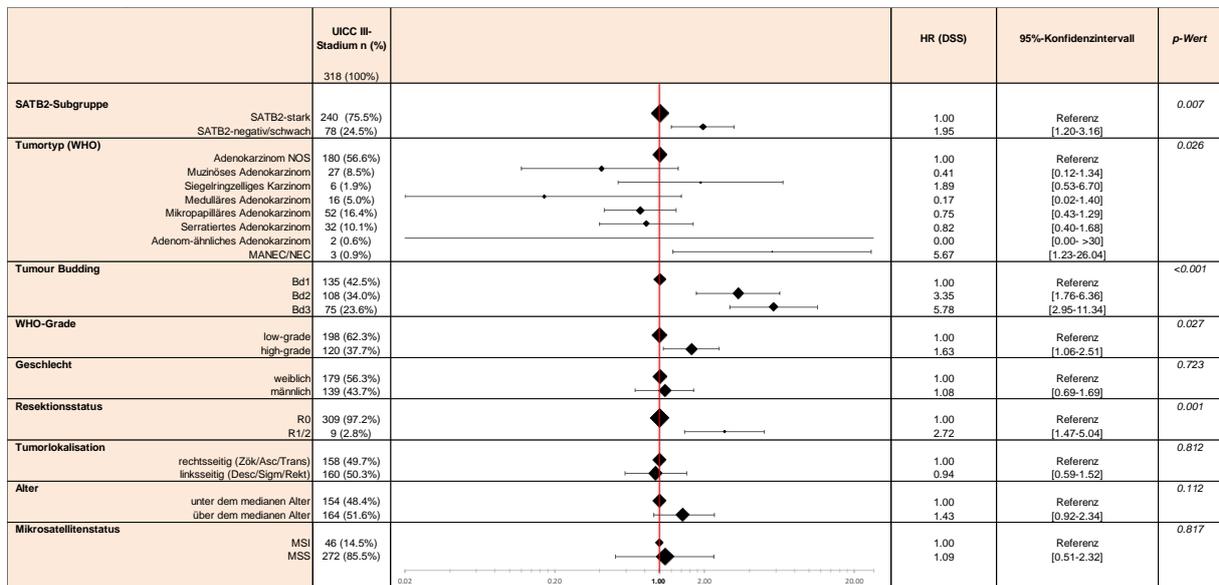


Abbildung 36: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in UICC III-Karzinomen unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).

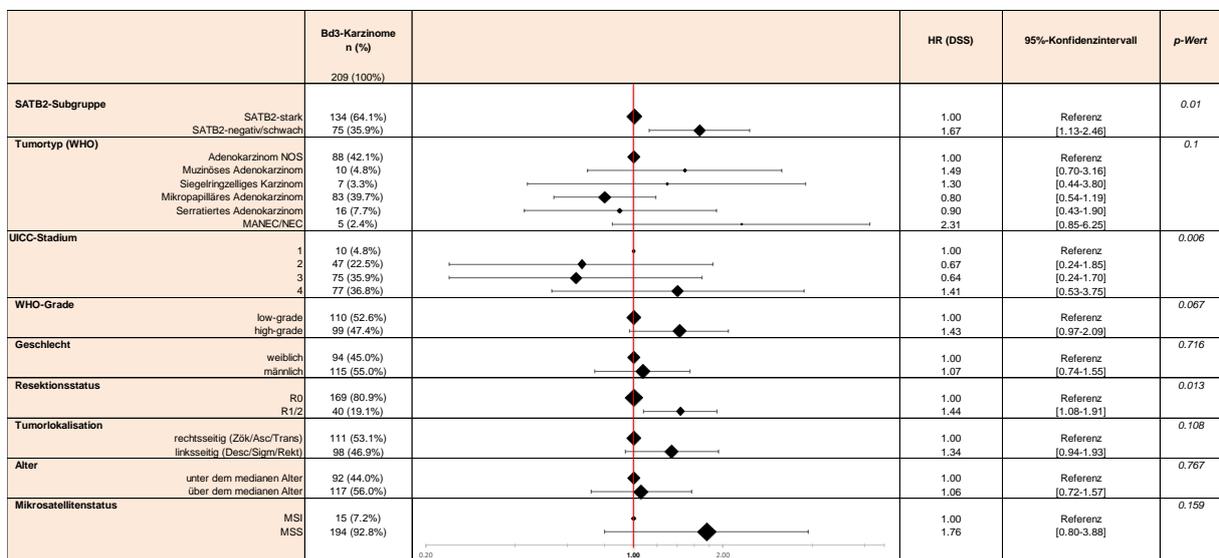


Abbildung 37: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in Bd3-Karzinomen unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, UICC-Stadien, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).

## **6.4 Vergleichende Analyse der kolorektalen Differenzierungsmarker CDX2 und SATB2**

### **6.4.1 Vergleichende Analyse der Expressionshäufigkeiten von SATB2 und CDX2**

Stellte man die Expression von SATB2 und CDX2 in einer vergleichenden Analyse gegenüber, so zeigte sich, dass SATB2 fast doppelt so häufig (n= 231, 22.2%) ein Expressionsresultat unterhalb des festgelegten Expressionsgrenzwertes lieferte als CDX2 (n=106, 10.2%). Hierbei fiel auch die Intensität, mit der sich CDX2-positive Tumorzellen in der IHC darstellten, häufig stärker aus als es in der SATB2-IHC der Fall war. Ebenso präsentierte sich das Expressionsmuster von SATB2 deutlich heterogener (n= 340, 32.7%) als jenes von CDX2 (n=121, 11.6%), welches eher diffus verteilt war (n=905, 87.1%). Ein kompletter Ausfall der IHC-Marker konnte darüber hinaus in 60 Fällen für SATB2 (5.8%) und nur in 13 Fällen für CDX2 (1.3%) festgehalten werden. SATB2-negative Karzinomen zeigten sich meist dennoch stark (n=37, 61.7%) und diffus (n=39, 65.0%) CDX2-exprimierend. Im Vergleich hierzu präsentierten sich CDX2-negative Karzinome meist mit einer schwachen (n=6, 46.2%) und heterogenen (n=7, 53.8%) SATB2-Expression. Nur zwei der untersuchten Karzinome (0.2%) wiesen sowohl einen kompletten Ausfall von SATB2 als auch von CDX2 auf.

Nach Gruppeneinteilung in stark- und negativ/schwach-Expressionsgruppen anhand des ermittelten Grenzwerts für den jeweiligen Marker zeigten insgesamt die allermeisten Karzinome eine starke simultane Expression beider Marker (n=766, 73.7%) und somit die Großzahl der Karzinome ein korrelierendes Expressionsprofil (n=830, 79.9%). Nichtsdestotrotz gab es immer wieder auch Fälle, in denen sich eine gegenläufige Expressionsgruppenzuordnung abzeichnete und nur einer der beiden Marker stark exprimiert wurde. So konnte insbesondere für die Gruppe der SATB2-defizienten Karzinome beobachtet werden, dass diese in einem nicht unerheblichen Teil dennoch stark CDX2 exprimierten (n=167, 16.1%). Tabellen 27 bis 29 stellen eine Übersicht über die verschiedenen Expressionskombinationen von SATB2 und CDX2 dar. Somit wird deutlich, dass (obwohl die Expression von CDX2 und SATB2 eine statistisch signifikante Assoziation ( $p < 0.001$ ) zueinander darlegten) beide Marker unabhängig voneinander exprimiert werden können.

Tabelle 27: Korrelation der Expressionsmuster von SATB2 und CDX2 (modifiziert nach [2]).

Expressionsmuster SATB2	Expressionsmuster CDX2			Gesamt	p-Wert
	fehlend	heterogen	diffus		
fehlend	2	19	39	60	p<0.001
heterogen	7	70	263	340	
diffus	4	32	603	639	
Gesamt	13	121	905	1039	

Tabelle 28: Korrelation der Expressionsintensitäten von SATB2 und CDX2.

Expressionsintensität SATB2	Expressionsintensität CDX2				Gesamt	p-Wert
	fehlend	schwach	mittel	stark		
fehlend	2	15	6	37	60	p<0.001
schwach	6	30	21	88	145	
mittel	4	20	36	152	212	
stark	1	8	17	596	622	
Gesamt	13	73	80	873	1039	

Tabelle 29: Korrelation der SATB2- und CDX2-Gruppen (modifiziert nach [2]).

SATB2-Gruppe	CDX2-Gruppe		Gesamt	p-Wert
	CDX2 <sup>negativ/schwach</sup>	CDX2 <sup>stark</sup>		
SATB2 <sup>negativ/schwach</sup>	64	167	231	p<0.001
SATB2 <sup>stark</sup>	42	766	808	
Gesamt	106	933	1039	

#### 6.4.2 Vergleichende Analyse der prognostischen Relevanz von SATB2 und CDX2 in ihren komplementären Expressionsgruppen

Nach Stratifizierung der Gesamtkohorte in die gebildeten CDX2-Expressionsgruppen konnte in der univariaten Überlebensanalyse für die Gruppe der SATB2-stark exprimierenden Karzinome (mit Ausnahme der DFS in der Gruppe der CDX2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinome) in allen Überlebensparametern ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil gegenüber den SATB2<sup>negativ/schwach</sup>-Karzinomen ermittelt werden (vergleiche Tabelle 30 und Abbildung 38).

Tabelle 30: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach CDX2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

CDX2-Expressionsgruppen	SATB2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	
			p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert		
CDX2-negativ/schwach	SATB2-negativ/schwach	64 (60.4 %)	58.4 [7.2]	0.026	65.4 [7.6]	0.021	60.1 [7.6]	0.069
	SATB2-stark	42 (39.6 %)	82.1 [8.2]		91.2 [7.8]		84.6 [8.5]	
CDX2-stark	SATB2-negativ/schwach	167 (17.9 %)	71.8 [4.1]	0.013	77.3 [4.1]	<0.001	70.7 [4.5]	<0.001
	SATB2-stark	766 (82.1 %)	82.2 [1.8]		91.6 [1.7]		86.5 [1.9]	

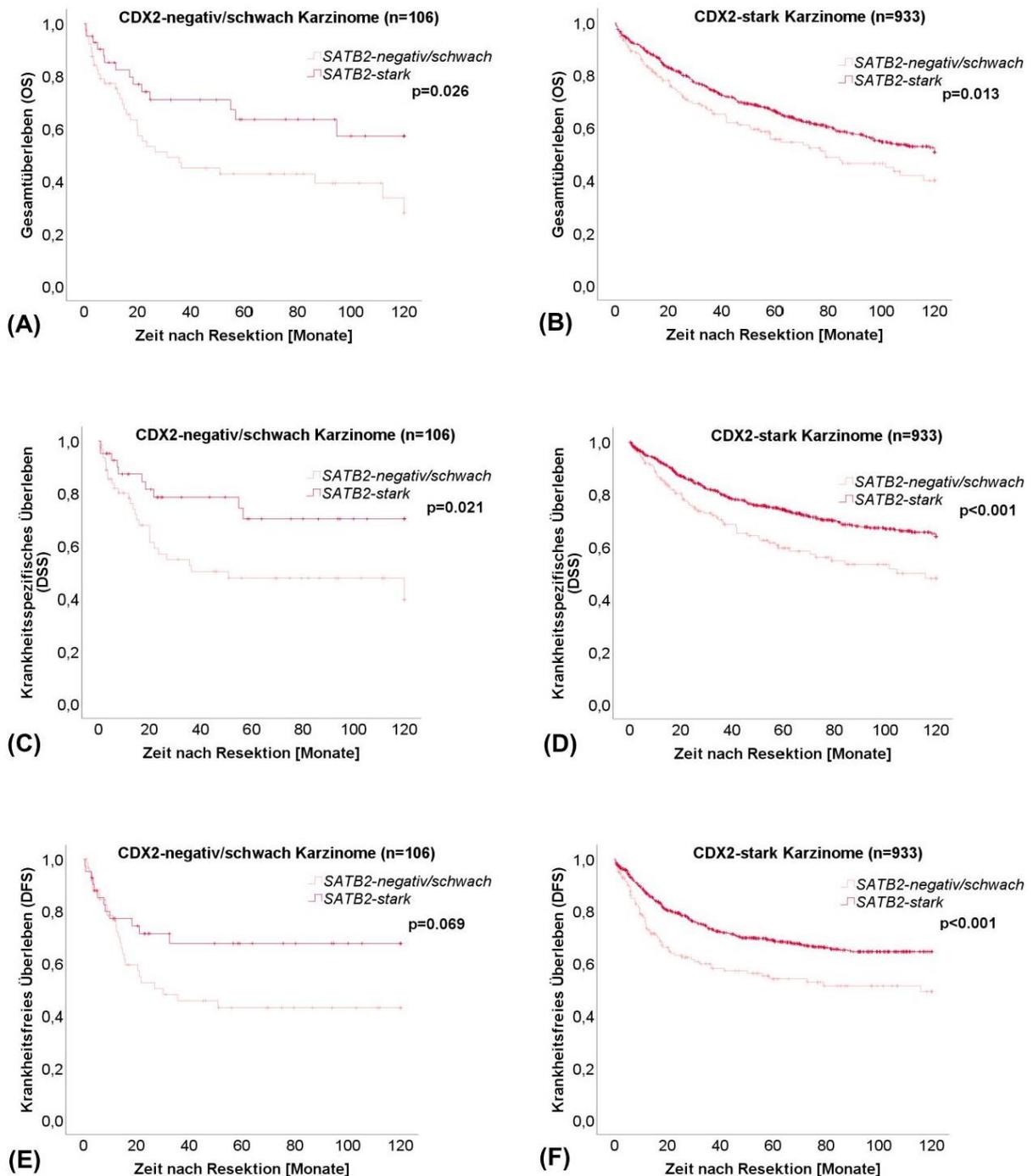


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach CDX2-Expressionsgruppen jeweils für OS (A, B), DSS (C, D) und DFS (E, F) (modifiziert nach [2]).

In umgekehrtem Fall zeigte sich jedoch in den SATB2-Expressionsgruppen in keinem der Überlebensparameter ein signifikanter Unterschied bezüglich der CDX2-Expression in der univariaten Analyse. Vergleiche hierzu die p-Werte in Tabelle 31.

Tabelle 31: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach SATB2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).

SATB2-Expressionsgruppen	CDX2-Expressionsgruppen	Gesamtzahl n (%)	Mittleres Gesamtüberleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsspezifisches Überleben [SD] (Monate)		Mittleres krankheitsfreies Überleben [SD] (Monate)	
				p-Wert		p-Wert		p-Wert
SATB2-negativ/schwach	CDX2-negativ/schwach	64 (27.7 %)	58.4 [7.2]	0.055	65.4 [7.6]	0.089	60.1 [7.6]	0.298
	CDX2-stark	167 (72.3 %)	71.8 [4.1]		77.3 [4.1]		70.7 [4.5]	
SATB2-stark	CDX2-negativ/schwach	42 (5.2 %)	82.1 [8.2]	0.989	91.2 [7.8]	0.941	84.6 [8.5]	0.686
	CDX2-stark	766 (94.8 %)	82.2 [1.8]		91.6 [1.7]		86.5 [1.9]	

## 6. Diskussion

Diese Dissertationsarbeit untersuchte die Expressionsfrequenz der intestinalen Transkriptionsfaktoren **CDX2** (*Caudal-related Homeobox Transcription Factor 2*) und **SATB2** (*Special AT-rich sequence-binding protein 2*) in einer sehr großen, morphologisch, molekular und klinisch umfangreich charakterisierten Kohorte von mehr als 1000 Kolorektalen Karzinomen (KRK). Da beide Transkriptionsfaktoren in der klinisch-pathologischen Routinediagnostik regelhaft zum Einsatz kommen und höchstrangig publizierte frühere Studien - unter anderem im *New England Journal of Medicine* - eine verminderte Expression im KRK mit Prognose und Therapieansprechen assoziierten [201, 209, 216, 276], war es Ziel dieser Dissertation die prognostische und diagnostische Wertigkeit der Expression von CDX2 und SATB2 vergleichend zu untersuchen, woraus die Publikation von zwei Artikeln zur Thematik resultierte [1, 2].

Unsere Analyse fokussierten sich darauf fünf Aspekte bezüglich der Expression von SATB2 und CDX2 im KRK besonders zu beleuchten, welche in den folgenden Abschnitten weitergehend diskutiert werden:

- 1) Welcher der beiden Transkriptionsfaktoren zeigt im KRK seltener einen Expressionsverlust und ist somit als diagnostisch sensitiver anzusehen?
- 2) Gibt es bestimmte histopathologische Merkmale, die mit einem Verlust von SATB2 oder CDX2 einhergehen?
- 3) Gibt es eine Assoziation einer verminderten SATB2- oder CDX2-Expression mit dem Tumorstadium, der Tumorlokalisation oder den molekularen Phänotypen?
- 4) Zeigt ein Verlust von CDX2 oder SATB2 einen Einfluss auf die Patientenprognose und falls ja, welcher der beiden Transkriptionsfaktoren ist der überlegene Prognosemarker?
- 5) Wie ist die prognostische Relevanz der beiden Transkriptionsfaktoren verglichen zu bereits etablierten histopathologischen Parametern [7] anzusiedeln und können durch Sie distinkte Prognosegruppen herausgearbeitet werden, die sich den etablierten Faktoren entziehen?

CDX2 ist ein hochkonservierter intestinaler Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung und Ausdifferenzierung der Epithelien sowohl des oberen Gastrointestinaltrakts, also auch insbesondere des unteren Gastrointestinaltrakts maßgeblich beeinflusst und konstitutiv in der regelhaften Dickdarmschleimhaut nukleär exprimiert wird [159, 169, 170]. Da CDX2 auch von den meisten Kolorektalen Karzinomen exprimiert wird, gilt CDX2 als diagnostisch gern genutzter Marker um eine kolorektale Herkunft eines Karzinoms zu untermauern, was beispielsweise im diagnostischen Rahmen der ätiologischen Abklärung von Metastasen Anwendung findet [13-16, 214, 217]. Da CDX2 zu einem substantiellen Anteil auch von Karzinomen anderer Lokalisation (z.B. Pankreas, Magen, Dünndarm, Ovar) exprimiert wird [14-16, 217], hat sich in den letzten Jahren auch SATB2 zunehmend in der KRK-Diagnostik etablieren können [13, 253, 277]. Der Transkriptionsfaktor SATB2 gehört zu den „Nuclear-Matrix-Attachment-Regions“ (MARs)-bindenden Proteinen, reguliert die Chromatin-Organisation sowie Modifikation intestinaler Epithelien und wird ebenso konstitutiv von den Epithelien des Dickdarms und auch von Kolorektalen Karzinomen exprimiert [17, 18, 220-223, 225-227]. Vorherige Studien attestierten SATB2 eine höhere Spezifität für Karzinome des unteren GI-Trakts als CDX2 und suggerierten ihn als geeigneteren Marker, um eine kolorektale Differenzierung sichern zu können [13, 17-19, 221, 245, 249, 251, 278].

Prinzipiell übereinstimmend mit diesen vorhergehenden Beobachtungen konnte wir in unserer großen KRK-Kohorte eine zumeist hohe Expression beider Transkriptionsfaktoren bestätigen, was ihre generelle Eignung als kolorektale Differenzierungsmarker prinzipiell untermauert. Allerdings war unsere Studie die Erste, die zeigen konnte, dass (im Gegensatz zu vorhergehenden Annahmen) ein Verlust oder eine Erniedrigung der SATB2-Expression wesentlich häufiger im KRK auftritt als eine verminderte oder fehlende Expression von CDX2 (22.2% vs. 10.2%). Hieraus lässt sich ableiten, dass CDX2 insgesamt den sensitiveren Marker kolorektaler Differenzierung darstellt, da dessen Expression im KRK deutlich seltener verloren geht. Ein Ausfall beider Marker in Kolorektalen Karzinomen war in unserer Kohorte nur ausgesprochen selten detektierbar (0.2%, n=2) und die überwältigende Mehrheit aller Karzinome mit einem Verlust von SATB2 zeigte komplementär eine starke und diffuse Expression von CDX2 (und umgekehrt). Dies legt nahe, dass in der histopathologischen Routinediagnostik eine komplementäre Anwendung eines Panels aus SATB2 *und* CDX2 der vielversprechendste Ansatz zur Sicherung einer kolorektalen Differenzierung ist, da die allermeisten KRK zumindest einen der beiden Transkriptionsfaktoren stark exprimieren sollten. Bezugnehmend auf die zugrundeliegenden Ursachen der deutlich niedrigeren Frequenz eines Expressionsverlusts von CDX2 verglichen mit der von SATB2 gibt es bis dato nur theoretische Überlegungen. Ein Erklärungsansatz könnte in der Eigenschaft von CDX2 als offenbar stärker

konservierter Transkriptionsfaktor zu suchen sein, der bereits in der noch frühen Entwicklung und intestinalen Differenzierung eine Rolle spielt [13, 159, 169, 170].

Aufbauend darauf fokussierten wir uns im nächsten Abschnitt unserer Analysen darauf, ob wir einen Verlust der Expression von CDX2 oder SATB2 bestimmten histomorphologischen Subgruppen, insbesondere der zentralen konventionellen histopathologischen Parameter (Histologische Subtypen, WHO-Grading, Tumour Budding), wie sie in der WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts definiert werden [7], zuordnen können.

Wir konnten sowohl für CDX2 als auch für SATB2 eine deutliche Häufung eines Expressionsverlusts in spezifischen histologischen Subtypen nachweisen. Interessanterweise konnten wir für CDX2 gehäuft eine verminderte Expression in eher solide wachsenden KRK-Subtypen zeigen, insbesondere im eher benigne verlaufenden Medullären Karzinom als auch in hochaggressiven Neuroendokrinen Karzinomen (MANEC/NEC), was verdeutlicht, dass ein Expressionsverlust von CDX2 im morphologischen Kontext gewertet werden muss und an beiden Enden des biologischen Spektrums der KRK auftreten kann. SATB2 zeigte sich im Gegensatz hierzu gehäuft in schleimbildenden/muzinösen, siegelringzelligen, mikropapillären KRK oder Karzinomen der MANEC/NEC-Gruppe vermindert exprimiert, welche allesamt eher als aggressive histologische Subtypen einzuordnen sind [11]. Wir beobachteten weiterhin für beide Transkriptionsfaktoren eine signifikante Häufung des Expressionsverlusts in G3/High-Grade Karzinomen gemäß des klassischen WHO-Gradings, was als Ausdruck der Wichtigkeit von CDX2 und SATB2 bezüglich der glandulären Differenzierung interpretiert werden kann. Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass sowohl Studien von uns als auch von anderen Gruppen bereits zeigen konnten, dass das klassische WHO-Grading, welches sich nur auf die Drüsenarchitektur bezieht, der prognostisch schwächste konventionelle histopathologische Parameter des KRK ist [11, 279, 280]. Dieser klassifiziert nämlich auch eher benigne Tumore, wie das oben bereits angesprochene Medulläre Karzinom, als G3/high-grade, obwohl diese einen ausgesprochen günstigen klinischen Verlauf zeigen [7, 9, 11, 131, 281].

Weitaus interessanter ist aus unserer Sicht hier vor allem die starke Assoziation einer verminderten oder fehlenden Expression von SATB2 mit einer verstärkten Tumour Budding-Aktivität, welche als morphologisches Korrelat des Konzepts der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) angesehen wird [140, 144]. Tumour Budding, ein quantitativer Parameter der Fähigkeit zur zellulären Dissoziation, hat sich in den letzten Jahren als robustester, Stadien-unabhängiger histopathologischer Prognosefaktor herauskristallisiert, der gemäß der WHO/ITBCC in drei Stadien eingeteilt wird, die sich prognostisch deutlich demarkieren [7, 11, 116, 117, 137, 144, 146, 154, 279, 280, 282, 283]. Die signifikante Häufung einer gesteigerten

Tumour Budding-Aktivität in SATB2-defizienten Karzinomen, die wir in unseren Untersuchungen nachweisen konnten, passt zum einen sehr gut zu der vorbeschriebenen Assoziation eines SATB2-Verlust zu aggressiven histopathologischen Subtypen, die zumeist eine hohe Budding-Aktivität zeigen [245-248], zum anderen ebenso zu den bereits vorbestehenden experimentellen Untersuchungen, die SATB2 als negativen EMT-Regulator identifiziert haben, der die Transkription des EMT-Schlüsselproteins SNAIL inhibiert [237, 238].

Im nächsten Schritt unserer Analysen untersuchten wir, inwiefern sich ein Zusammenhang zwischen der Expression von CDX2 / SATB2 und den klinisch-prognostisch wichtigsten klinisch-pathologischen Parametern, in erster Linie der TNM-Klassifikation und den sich daraus ableitenden Tumorstadien gemäß UICC, darstellt. Zwar konnten wir auch für CDX2 eine gewisse Assoziation mit einem generell höheren Tumorstadium nachweisen, dies bezog sich aber vor allem auf den Vergleich dieser Gruppen mit sehr frühen Tumoren im Stadium I, während zwischen Stadium II-IV eine weitgehend gleichartige Verteilung zur Darstellung kam. Anders gelagert zeigte sich dies bezogen auf SATB2. Hier konnten wir für alle Aspekte der TNM-Klassifikation sowie für die UICC-Stadien eine sehr starke Assoziation von SATB2-defizienten KRK zu lokal fortgeschrittenen, nodal-positiven oder gar fernmetastasierten Tumoren nachweisen, was angesichts der vorbeschriebenen Häufung in aggressiven Subtypen und allgemein in KRK mit hoher zellulärer Dissoziationsfähigkeit sowie der von einigen Autoren in experimentellen Studien beschriebenen tumorsuppressiv wirkenden Eigenschaften von SATB2 ausgezeichnet in das Gesamtbild passt [245-248] [237, 239, 284, 285].

Weitergehend analysierten wir den Zusammenhang zwischen CDX2- und SATB2-Expression und dem Mikrosatellitenstatus, welcher wohl der basalste molekulare Parameter zur Bestimmung der generellen Histogenese eines KRK darstellt. Passend zu unseren vorherigen Ergebnissen und insbesondere zur beschriebenen starken Assoziation von CDX2 zum Subtyp der Medullären KRK, die so gut wie immer mikrosatelliteninstabil sind [7, 9, 11, 281], konnten wir eine massive Häufung CDX2-defizienter KRK in der Gruppe der mikrosatelliteninstabilen Tumore ausmachen. Eine schwächere Assoziation war hierzu auch für SATB2 nachweisbar, die allerdings bei weitem nicht die Signifikanzstärke von CDX2 erreichen konnte. Da mikrosatelliteninstabile KRK in der Regel einen indolenteren klinischen Verlauf haben [7, 11, 286-288], könnte dies als ein Erklärungsansatz für die prognostischen Schwächen von CDX2 als Biomarker herangezogen werden, auf die wir nachfolgend noch näher eingehen möchten.

Im Jahr 2016 publizierten Dalerba und Kollegen [209] eine international stark wahrgenommene Studie im *New England Journal of Medicine* und postulierten einen Verlust der CDX2-

Expression als Stadien-unabhängigen Biomarker, der ebenso den Überlebensvorteil einer adjuvanten Therapie in den Tumorstadien UICC II/III prädiktiv vorhersagen könne. Auf Grundlage dieser prominent publizierten Arbeit - und weiterer Arbeiten, die eine starke prognostische Relevanz von CDX2 für KRK-Patienten postulierten [201, 216, 276, 289] - war es nun das Hauptziel unserer Studie zum einen die prognostische Potenz von CDX2 und auch von SATB2 im generellen in unserem Kollektiv einzuordnen, aber ebenso zu untersuchen, wie sich die Fähigkeit zur prognostischen Demarkation im Vergleich zu den bereits etablierten konventionellen histopathologischen Prognosefaktoren verhält. Generell konnten wir in explorativen univariaten Überlebenszeitanalysen für CDX2 einen signifikanten Überlebensunterschied zwischen KRK-Patienten mit starker und erniedrigter bzw. gänzlich fehlender Expression von CDX2 nachweisen. Allerdings erwies sich diese statistische Signifikanz in diversen Subgruppenanalysen als äußerst störanfällig. So konnten beispielsweise in wichtigen Subgruppen, wie in mikrosatelliteninstabilen Karzinomen oder Karzinomen im UICC-Stadium II/III, keine prognostische Relevanz der CDX2-Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich überraschenderweise jedoch auch eine starke Assoziation zur Tumorlokalisierung, da CDX2 in KRK des linksseitigen Kolons und des Rektums prognostisch äußerst relevant war, allerdings in rechtsseitigen KRK keinerlei prognostische Bedeutung zeigte. Noch entscheidender war jedoch der Vergleich der prognostischen Relevanz der CDX2-Expression mit den etablierten morphologischen Parametern aus der WHO-Klassifikation, welche sich allesamt als deutlich überlegene Prognosefaktoren zeigten, die in nahezu allen klinischen Subgruppenanalysen und auch sowohl in CDX2-exprimierenden als auch in CDX2-defizienten KRK distinkte Prognosegruppen identifizieren konnten. Passend zu diesen Beobachtungen verschwand jegliche prognostische Relevanz von CDX2 in multivariaten Analysen, welche die WHO-Parameter Tumour Budding, die histologischen Subtypen und das WHO-Grading mit einbeziehen. Hiermit ergibt sich die klare Aussage unsere Arbeit, dass unsere Analysen in unserem sehr großen Kollektiv eindeutig zeigen, dass CDX2 zwar eine gewisse prognostische Demarkationsfähigkeit aufweist, hier aber deutlich hinter den konventionellen histologischen Parametern zurücksteht und diese zur Prognoseabschätzung priorisiert werden sollten.

SATB2 zeigte in unseren Analysen dagegen eine deutlich stärkere Fähigkeit zur prognostischen Demarkation und wies in nahezu allen univariaten Analysen und auch in Subgruppenanalysen einen sehr starken Effekt auf das Patientenüberleben auf. Insbesondere war ein SATB2-Verlust auch in jenen Subgruppen relevant (mikrosatelliteninstabile Karzinome, rechtsseitige KRK), bei denen CDX2 keine prognostische Relevanz zeigte. Bezogen auf die klassischen konventionellen Parameter erwies sich jedoch auch ein SATB2-

Verlust als etwas unterlegener Prognoseparameter, was sich dadurch äußerte, dass in der multivariaten Analyse in der Gesamtkohorte unter Berücksichtigung dieser Parameter SATB2 knapp ein statistisches Signifikanzniveau verfehlte. Allerdings konnten wir - im Gegensatz zu CDX2 - nun in Subgruppen der WHO-Parameter, z.B. in Tumoren mit hoher Tumour Budding-Aktivität, eine prognostische Relevanz des SATB2-Verlusts aufzeigen. Gleichartig gelagert zeigte sich die multivariate Analyse in Tumoren nodal-metastasierter KRK im UICC-Stadium III. Diese Daten deuten darauf hin, dass SATB2 durchaus ein klinisch relevanter Biomarker ist, der insbesondere in Hoch-Risiko-Gruppen des KRK nochmals wichtige Informationen über die Patientenprognose liefern kann.

SATB2 ist somit bezüglich der prognostischen Relevanz als der deutlich potentere Biomarker gegenüber CDX2 anzusehen, was unsere Analysen abschließend auch nochmals dadurch untermauern konnten, dass ein Verlust der SATB2-Expression sowohl in Patienten mit erhaltener CDX2-Expression als auch in Patienten mit CDX2-Verlust statistisch hochgradig relevant war, während CDX2 in den SATB2-Expressionsgruppen keinerlei prognostische Relevanz zeigte.

Die von uns durchgeführte Studie hat mehrere Limitationen.

Zum einen ist unsere Studie im Charakter einer rein retrospektiven Kohortenstudie designt, sodass prospektive Untersuchungen, insbesondere bezüglich der Prognoseabschätzung, hier noch unsere Untersuchungsergebnisse bestätigen müssen.

Eine zweite Limitation ist die Tatsache, dass uns für eine Minderheit der Patienten das genau Therapieregime nicht vorliegt. Da die Behandlung bei KRK aber Stadien-adaptiert sehr gut durch die Therapieempfehlungen der deutschen S3-Leitlinie für KRK[5] definiert ist, können wir hier mit hoher Sicherheit (bis auf Einzelfallentscheidungen, z.B. bei divergierendem Patientenwunsch) von einer leitliniengerechten Behandlung aller Patienten ausgehen.

Letztlich stellt die Untersuchung an TMAs eine weitere Limitation unserer Studie dar, da hier (auch angesichts der Kohorten-Größe) jeweils nur ein kleiner Anteil der gesamten Tumormasse abgebildet werden kann. Jedoch wurde bei der TMA-Anfertigung darauf geachtet, dass die jeweiligen Karzinome durch die TMA-Cores repräsentativ abgebildet werden, was sich auch in unseren vergleichenden Analysen der Ergebnisse zwischen TMA und korrespondierenden Whole Slides widerspiegelte und wir hier eine hohe Konkordanz der Expressionsergebnisse aufzeigen konnten.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertationsschrift folgende wichtige Erkenntnisse herausgearbeitet werden:

- 1) Im Vergleich der beiden intestinalen Transkriptionsfaktoren CDX2 und SATB2, zeigt SATB2 eine wesentlich höhere Frequenz eines Expressionsverlusts, was CDX2 somit insgesamt als sensitiveren Marker zur Sicherung einer kolorektalen Herkunft, beispielsweise in der Metastasendiagnostik, erscheinen lässt. Da zudem beide Marker nur äußerst selten einen kombinierten kompletten Verlust zeigen, kann zudem durch Kombination beider Marker mit hoher Wahrscheinlichkeit eine kolorektale Differenzierung gesichert werden.
- 2) Sowohl CDX2 als auch SATB2 zeigen starke Assoziationen zu den zentralen konventionellen histopathologischen Parametern des KRK, wobei insbesondere SATB2 stark gehäuft in morphologisch aggressiven Tumoren auftritt, während hingegen ein Verlust der CDX2-Expression eher an beiden Enden des Spektrums der biologischen Aggressivität Kolorektaler Karzinome beobachtet werden kann.
- 3) Ein Expressionsverlust beider Transkriptionsfaktoren, aber insbesondere von SATB2, ist häufiger in fortgeschrittenen und metastasierten KRK zu beobachten, während bei CDX2 vor allem die Assoziation zu mikrosatelliteninstabilen Tumoren ins Auge sticht.
- 4) Sowohl der Verlust von SATB2 als auch von CDX2 ist generell von prognostischer Relevanz. Von beiden Transkriptionsfaktoren ist SATB2 der deutlich potentere Prognosefaktor, der interessanterweise auch in Hoch-Risiko-Gruppen in multivariaten Analysen Bestand hat und dort prognostische Subpopulationen identifizieren kann.
- 5) Die konventionellen histopathologischen Parameter sind bezüglich ihrer prognostischen Demarkationsfähigkeit CDX2 und auch SATB2 überlegen, da sie auch in der Gesamtheit aller Kolorektalen Karzinome in multivariaten Analysen statistisch hochgradig signifikant bleiben und in diesen Analysen beide Transkriptionsfaktoren in Bereiche außerhalb der statistischen Signifikanz verweisen.

Inzwischen konnten in weiterführenden Studien Teile unserer Ergebnisse reproduziert und bestätigt werden. So konnten auch Hrudka et al. prognostisch besonders aggressiv verlaufende Karzinomphänotypen durch einen SATB2-Expressionverlust identifizieren und eine Assoziation eines SATB2-Verlusts mit Muzinösen Adenokarzinomen und

Siegelringzelligen Karzinomen sowie high-grade Karzinomen beobachten [290]. Vlahović und Kollegen konnten ebenfalls aufzeigen, dass ein CDX2-Verlust besonders stark mit mikrosatelliteninstabilen Karzinomen und einer geringen Karzinomdifferenzierung assoziiert ist [291]. Diese Ergebnisse konnten Li et al. erneut in einer vergleichenden Analyse der SATB2- und CDX2-Expression an ganzen Tumorschnitten bestätigen und ähnlich zu unseren Ergebnissen die Bedeutung von CDX2 und insbesondere SATB2 bei der prognostischen Stratifizierung unterstreichen [292].

Ausblickend sollten weitere multizentrische Studien folgen, um die molekularen Grundlagen des Expressionsverlusts dieser beiden intestinalen Transkriptionsfaktoren in KRK-Subgruppen – insbesondere eines SATB2-Verlusts in Hoch-Risiko-KRK als auch eines CDX2-Verlusts in MSI-Karzinomen und der auf den ersten Blick ambivalent erscheinenden starken Assoziation eines CDX2-Verlusts mit sowohl prognostisch benigne verlaufenden Medullären Adenokarzinomen als auch aggressiv verlaufenden NEC/MANEC – näher zu charakterisieren. Weiterführend sollte auch die Bedeutung eines SATB2-Verlusts für das therapeutische Vorgehen – v.a. in den morphologischen Hoch-Risiko-KRK – beleuchtet und nach potentiellen therapeutischen Angriffspunkten gefahndet werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] B. Konukiewitz *et al.*, "Loss of CDX2 in colorectal cancer is associated with histopathologic subtypes and microsatellite instability but is prognostically inferior to hematoxylin-eosin-based morphologic parameters from the WHO classification," *Br J Cancer*, vol. 125, no. 12, pp. 1632-1646, Dec 2021, doi: 10.1038/s41416-021-01553-0.
- [2] M. Schmitt *et al.*, "Loss of SATB2 Occurs More Frequently Than CDX2 Loss in Colorectal Carcinoma and Identifies Particularly Aggressive Cancers in High-Risk Subgroups," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 24, Dec 7 2021, doi: 10.3390/cancers13246177.
- [3] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [4] International Agency for Research on Cancer. "Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, all ages." Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populationns=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%252Dorientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%252D](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populationns=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%252Dorientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%252D) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [5] AWMF. *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*, 2019.
- [6] C. Wittekind, *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*. Weinheim: Wiley-VCH, 2017.
- [7] I. D. Nagtegaal, M. J. Arends, and M. Salto-Tellez, "Colorectal adenocarcinoma," in *WHO Classification of Tumours. Digestive system tumours.*, vol. 1, I. A. f. R. o. Cancer Ed., 5 ed. Lyon (France), 2019, ch. 6, pp. 177-187.
- [8] M. Jesinghaus *et al.*, "Genetic heterogeneity in synchronous colorectal cancers impacts genotyping approaches and therapeutic strategies," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 55, no. 3, pp. 268-77, Mar 2016, doi: 10.1002/gcc.22330.
- [9] A. Remo *et al.*, "Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 7, Jul 23 2019, doi: 10.3390/cancers11071036.
- [10] M. Jesinghaus *et al.*, "Genotyping of colorectal cancer for cancer precision medicine: Results from the IPH Center for Molecular Pathology," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 55, no. 6, pp. 505-21, Jun 2016, doi: 10.1002/gcc.22352.
- [11] M. Jesinghaus *et al.*, "Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases," *Am J Surg Pathol*, vol. 45, no. 7, pp. 969-978, Jul 1 2021, doi: 10.1097/PAS.0000000000001692.

- [12] I. D. Nagtegaal *et al.*, "The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system," *Histopathology*, vol. 76, no. 2, pp. 182-188, Jan 2020, doi: 10.1111/his.13975.
- [13] J. R. Conner and J. L. Hornick, "Metastatic carcinoma of unknown primary: diagnostic approach using immunohistochemistry," *Adv Anat Pathol*, vol. 22, no. 3, pp. 149-67, May 2015, doi: 10.1097/PAP.000000000000069.
- [14] R. W. Werling, H. Yaziji, C. E. Bacchi, and A. M. Gown, "CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas," *Am J Surg Pathol*, vol. 27, no. 3, pp. 303-10, Mar 2003, doi: 10.1097/00000478-200303000-00003.
- [15] C. A. Moskaluk, H. Zhang, S. M. Powell, L. A. Cerilli, G. M. Hampton, and H. F. Frierson, Jr., "Cdx2 protein expression in normal and malignant human tissues: an immunohistochemical survey using tissue microarrays," *Mod Pathol*, vol. 16, no. 9, pp. 913-9, Sep 2003, doi: 10.1097/01.MP.0000086073.92773.55.
- [16] L. B. De Lott, C. Morrison, S. Suster, D. E. Cohn, and W. L. Frankel, "CDX2 is a useful marker of intestinal-type differentiation: a tissue microarray-based study of 629 tumors from various sites," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 129, no. 9, pp. 1100-5, Sep 2005, doi: 10.5858/2005-129-1100-CIAUMO.
- [17] K. Magnusson *et al.*, "SATB2 in combination with cytokeratin 20 identifies over 95% of all colorectal carcinomas," *Am J Surg Pathol*, vol. 35, no. 7, pp. 937-48, Jul 2011, doi: 10.1097/PAS.0b013e31821c3dae.
- [18] A. Dragomir, M. de Wit, C. Johansson, M. Uhlen, and F. Ponten, "The role of SATB2 as a diagnostic marker for tumors of colorectal origin: Results of a pathology-based clinical prospective study," *Am J Clin Pathol*, vol. 141, no. 5, pp. 630-8, May 2014, doi: 10.1309/AJCPWW2URZ9JKQJU.
- [19] Y. J. Zhang *et al.*, "SATB2 is a Promising Biomarker for Identifying a Colorectal Origin for Liver Metastatic Adenocarcinomas," *EBioMedicine*, vol. 28, pp. 62-69, Feb 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.01.001.
- [20] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin, "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008," *Int J Cancer*, vol. 127, no. 12, pp. 2893-917, Dec 15 2010, doi: 10.1002/ijc.25516.
- [21] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int J Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-86, Mar 1 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [22] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, "Global cancer statistics, 2002," *CA Cancer J Clin*, vol. 55, no. 2, pp. 74-108, Mar-Apr 2005, doi: 10.3322/canjclin.55.2.74.
- [23] D. M. Parkin, P. Pisani, and J. Ferlay, "Global cancer statistics," *CA Cancer J Clin*, vol. 49, no. 1, pp. 33-64, 1, Jan-Feb 1999, doi: 10.3322/canjclin.49.1.33.
- [24] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 6, pp. 394-424, Nov 2018, doi: 10.3322/caac.21492.

- [25] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683-691, Apr 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- [26] R. L. Siegel *et al.*, "Colorectal cancer statistics, 2020," *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 3, pp. 145-164, May 2020, doi: 10.3322/caac.21601.
- [27] Zentrum für Krebsregisterdaten and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., "Krebs in Deutschland für 2017/2018," Robert Koch-Institut, 2021, vol. 13. Ausgabe. [Online]. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/ki\\_d\\_2021/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf;jsessionid=64B6CF881833877D66FD0EC6FABBF50F.internet081?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/ki_d_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=64B6CF881833877D66FD0EC6FABBF50F.internet081?__blob=publicationFile) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [28] C. E. Bailey *et al.*, "Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010," *JAMA Surg*, vol. 150, no. 1, pp. 17-22, Jan 2015, doi: 10.1001/jamasurg.2014.1756.
- [29] Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. "Colon and Rectum, Recent Trends in SEER Age-Adjusted Incidence Rates, 2000-2018." National Cancer Institute, .  
[https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=20&data\\_type=1&graph\\_type=2&compareBy=age\\_range&chk\\_age\\_range\\_9=9&chk\\_age\\_range\\_157=157&rate\\_type=2&sex=1&race=1&stage=101&advopt\\_precision=1&advopt\\_show\\_ci=on&advopt\\_display=1](https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=20&data_type=1&graph_type=2&compareBy=age_range&chk_age_range_9=9&chk_age_range_157=157&rate_type=2&sex=1&race=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&advopt_display=1) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [30] L. C. Connell, J. M. Mota, M. I. Braghiroli, and P. M. Hoff, "The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment," *Curr Treat Options Oncol*, vol. 18, no. 4, p. 23, Apr 2017, doi: 10.1007/s11864-017-0463-3.
- [31] V. S. Schellerer *et al.*, "Despite aggressive histopathology survival is not impaired in young patients with colorectal cancer : CRC in patients under 50 years of age," *Int J Colorectal Dis*, vol. 27, no. 1, pp. 71-9, Jan 2012, doi: 10.1007/s00384-011-1291-8.
- [32] D. E. Aust and G. B. Baretton, "Sporadische Tumoren des Kolorektums," in *Pathologie – Verdauungstrakt und Peritoneum*, M. Stolte, J. Rüschoff, and G. Klöppel Eds., 3, neubearbeitete Auflage ed. Berlin: Springer, 2013, ch. 28, pp. 611-661.
- [33] T. Reif de Paula, H. L. Simon, M. M. Profeta da Luz, and D. S. Keller, "Right sided colorectal cancer increases with age and screening should be tailored to reflect this: a national cancer database study," *Tech Coloproctol*, vol. 25, no. 1, pp. 81-89, Jan 2021, doi: 10.1007/s10151-020-02329-z.
- [34] G. Herold, "Kolorektales Karzinom," in *Innere Medizin*. Köln, 2019, pp. 490-496.
- [35] W. Hamilton and D. Sharp, "Diagnosis of colorectal cancer in primary care: the evidence base for guidelines," *Fam Pract*, vol. 21, no. 1, pp. 99-106, Feb 2004, doi: 10.1093/fampra/cmh121.
- [36] J. Weitz, A. Schalhorn, M. Kadmon, R. Krempien, and M. W. Büchler, "Kolon- und Rektumkarzinom," in *Die Onkologie*, H. W. and B. C. Eds., 2 ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010, ch. 43, pp. 848-897.

- [37] M. E. Del Giudice, E. T. Vella, A. Hey, M. Simunovic, W. Harris, and C. Levitt, "Systematic review of clinical features of suspected colorectal cancer in primary care," *Can Fam Physician*, vol. 60, no. 8, pp. e405-15, Aug 2014. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122831>.
- [38] F. T. Kolligs, "Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer," *Visc Med*, vol. 32, no. 3, pp. 158-64, Jun 2016, doi: 10.1159/000446488.
- [39] B. B. Su, H. Shi, and J. Wan, "Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection," *World J Gastroenterol*, vol. 18, no. 17, pp. 2121-6, May 7 2012, doi: 10.3748/wjg.v18.i17.2121.
- [40] M. J. Goldstein and E. P. Mitchell, "Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer," *Cancer Invest*, vol. 23, no. 4, pp. 338-51, 2005, doi: 10.1081/cnv-58878.
- [41] C. Hall *et al.*, "A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice," *Ann Coloproctol*, vol. 35, no. 6, pp. 294-305, Dec 2019, doi: 10.3393/ac.2019.11.13.
- [42] Q. Liu *et al.*, "Evaluating the Guiding Role of Elevated Pretreatment Serum Carcinoembryonic Antigen Levels for Adjuvant Chemotherapy in Stage IIA Colon Cancer: A Large Population-Based and Propensity Score-Matched Study," *Front Oncol*, vol. 9, p. 37, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00037.
- [43] I. Marmol, C. Sanchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, and M. J. Rodriguez Yoldi, "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 1, Jan 19 2017, doi: 10.3390/ijms18010197.
- [44] M. Gala and D. C. Chung, "Hereditary colon cancer syndromes," *Semin Oncol*, vol. 38, no. 4, pp. 490-9, Aug 2011, doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.05.003.
- [45] Z. Gatalica and E. Torlakovic, "Pathology of the hereditary colorectal carcinoma," *Fam Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 15-26, 2008, doi: 10.1007/s10689-007-9146-8.
- [46] J. Rüschoff and R. Büttner, "Hereditäre Tumoren," in *Pathologie-Verdauungstrakt und Peritoneum*, M. Stolte, J. Rüschoff, and G. Klöppel Eds., 3 ed. (Pathologie, G. Klöppel, H. H. Kreipe, and W. Remmele, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2013, ch. 34, pp. 727-759.
- [47] K. Thanikachalam and G. Khan, "Colorectal Cancer and Nutrition," *Nutrients*, vol. 11, no. 1, Jan 14 2019, doi: 10.3390/nu11010164.
- [48] A. R. Vieira *et al.*, "Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project," *Ann Oncol*, vol. 28, no. 8, pp. 1788-1802, Aug 1 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx171.
- [49] C. A. Gonzalez and E. Riboli, "Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study," *Eur J Cancer*, vol. 46, no. 14, pp. 2555-62, Sep 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.025.

- [50] V. Fedirko *et al.*, "Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies," *Ann Oncol*, vol. 22, no. 9, pp. 1958-1972, Sep 2011, doi: 10.1093/annonc/mdq653.
- [51] V. Bouvard *et al.*, "Carcinogenicity of consumption of red and processed meat," *Lancet Oncol*, vol. 16, no. 16, pp. 1599-600, Dec 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1.
- [52] E. Botteri *et al.*, "Smoking and Colorectal Cancer Risk, Overall and by Molecular Subtypes: A Meta-Analysis," *Am J Gastroenterol*, vol. 115, no. 12, pp. 1940-1949, Dec 2020, doi: 10.14309/ajg.0000000000000803.
- [53] H. Brenner and C. Chen, "The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention," *Br J Cancer*, vol. 119, no. 7, pp. 785-792, Oct 2018, doi: 10.1038/s41416-018-0264-x.
- [54] J. Celind, C. Ohlsson, M. Bygdell, M. Nethander, and J. M. Kindblom, "Childhood Body Mass Index Is Associated with Risk of Adult Colon Cancer in Men: An Association Modulated by Pubertal Change in Body Mass Index," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 28, no. 5, pp. 974-979, May 2019, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1077.
- [55] J. Martinez-Useros and J. Garcia-Foncillas, "Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue," *J Transl Med*, vol. 14, p. 21, Jan 22 2016, doi: 10.1186/s12967-016-0772-5.
- [56] H. H. Kyu *et al.*, "Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013," *BMJ*, vol. 354, p. i3857, Aug 9 2016, doi: 10.1136/bmj.i3857.
- [57] K. Y. Wolin, Y. Yan, G. A. Colditz, and I. M. Lee, "Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis," *Br J Cancer*, vol. 100, no. 4, pp. 611-6, Feb 24 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6604917.
- [58] A. McTiernan *et al.*, "Physical Activity in Cancer Prevention and Survival: A Systematic Review," *Med Sci Sports Exerc*, vol. 51, no. 6, pp. 1252-1261, Jun 2019, doi: 10.1249/MSS.0000000000001937.
- [59] C. E. Matthews *et al.*, "Amount and Intensity of Leisure-Time Physical Activity and Lower Cancer Risk," *J Clin Oncol*, vol. 38, no. 7, pp. 686-697, Mar 1 2020, doi: 10.1200/JCO.19.02407.
- [60] F. T. Kolligs, A. Crispin, A. Munte, A. Wagner, U. Mansmann, and B. Goke, "Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e20076, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020076.
- [61] A. K. Win *et al.*, "Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 26, no. 3, pp. 404-412, Mar 2017, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0693.
- [62] J. M. Carethers and B. H. Jung, "Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer," *Gastroenterology*, vol. 149, no. 5, pp. 1177-1190 e3, Oct 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.047.

- [63] J. Allen and C. L. Sears, "Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development," *Genome Med*, vol. 11, no. 1, p. 11, Feb 25 2019, doi: 10.1186/s13073-019-0621-2.
- [64] K. Nosho *et al.*, "Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer," *World J Gastroenterol*, vol. 22, no. 2, pp. 557-66, Jan 14 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i2.557.
- [65] D. Kelly, L. Yang, and Z. Pei, "Gut Microbiota, Fusobacteria, and Colorectal Cancer," *Diseases*, vol. 6, no. 4, Dec 11 2018, doi: 10.3390/diseases6040109.
- [66] R. Gao, Z. Gao, L. Huang, and H. Qin, "Gut microbiota and colorectal cancer," *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 36, no. 5, pp. 757-769, May 2017, doi: 10.1007/s10096-016-2881-8.
- [67] H. Najafimehr *et al.*, "A Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between Inflammatory Bowel Disease Family History and Colorectal Cancer," *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2021, p. 4874459, 2021, doi: 10.1155/2021/4874459.
- [68] M. S. Nadeem, V. Kumar, F. A. Al-Abbasi, M. A. Kamal, and F. Anwar, "Risk of colorectal cancer in inflammatory bowel diseases," *Semin Cancer Biol*, vol. 64, pp. 51-60, Aug 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.05.001.
- [69] D. S. Keller, A. Windsor, R. Cohen, and M. Chand, "Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence," *Tech Coloproctol*, vol. 23, no. 1, pp. 3-13, Jan 2019, doi: 10.1007/s10151-019-1926-2.
- [70] C. Canavan, K. R. Abrams, and J. Mayberry, "Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 23, no. 8, pp. 1097-104, Apr 15 2006, doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x.
- [71] S. Foersch, M. J. Waldner, and M. F. Neurath, "Colitis and colorectal cancer," *Dig Dis*, vol. 30, no. 5, pp. 469-76, 2012, doi: 10.1159/000341692.
- [72] S. I. Grivennikov, "Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia," *Semin Immunopathol*, vol. 35, no. 2, pp. 229-44, Mar 2013, doi: 10.1007/s00281-012-0352-6.
- [73] J. Terzic, S. Grivennikov, E. Karin, and M. Karin, "Inflammation and colon cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2101-2114 e5, Jun 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058.
- [74] M. Romano *et al.*, "From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives," *Anticancer Res*, vol. 36, no. 4, pp. 1447-60, Apr 2016. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069120>.
- [75] E. R. Fearon and B. Vogelstein, "A genetic model for colorectal tumorigenesis," *Cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759-67, Jun 1 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
- [76] B. Morson, "President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel," *Proc R Soc Med*, vol. 67, no. 6 Pt 1, pp. 451-7, Jun 1974. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4853754>.

- [77] E. R. Fearon, "Molecular genetics of colorectal cancer," *Annu Rev Pathol*, vol. 6, pp. 479-507, 2011, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
- [78] M. F. Müller, A. E. Ibrahim, and M. J. Arends, "Molecular pathological classification of colorectal cancer," *Virchows Arch*, vol. 469, no. 2, pp. 125-34, Aug 2016, doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
- [79] M. S. Pino and D. C. Chung, "The chromosomal instability pathway in colon cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2059-72, Jun 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- [80] N. Cancer Genome Atlas, "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer," *Nature*, vol. 487, no. 7407, pp. 330-7, Jul 18 2012, doi: 10.1038/nature11252.
- [81] S. Al-Sohaily, A. Biankin, R. Leong, M. Kohonen-Corish, and J. Warusavitarne, "Molecular pathways in colorectal cancer," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 27, no. 9, pp. 1423-31, Sep 2012, doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x.
- [82] C. R. Boland and A. Goel, "Microsatellite instability in colorectal cancer," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 6, pp. 2073-2087 e3, Jun 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064.
- [83] G. Binefa, F. Rodriguez-Moranta, A. Teule, and M. Medina-Hayas, "Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine," *World J Gastroenterol*, vol. 20, no. 22, pp. 6786-808, Jun 14 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6786.
- [84] M. F. Kane *et al.*, "Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines," *Cancer Res*, vol. 57, no. 5, pp. 808-11, Mar 1 1997. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041175>.
- [85] M. L. Veigl *et al.*, "Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no. 15, pp. 8698-702, Jul 21 1998, doi: 10.1073/pnas.95.15.8698.
- [86] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J. P. Issa, "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 15, pp. 8681-6, Jul 20 1999, doi: 10.1073/pnas.96.15.8681.
- [87] D. J. Weisenberger *et al.*, "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer," *Nat Genet*, vol. 38, no. 7, pp. 787-93, Jul 2006, doi: 10.1038/ng1834.
- [88] S. A. Azer, "Overview of molecular pathways in inflammatory bowel disease associated with colorectal cancer development," *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 25, no. 3, pp. 271-81, Mar 2013, doi: 10.1097/MEG.0b013e32835b5803.
- [89] M. Muller *et al.*, "Genomic and molecular alterations in human inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer," *United European Gastroenterol J*, vol. 8, no. 6, pp. 675-684, Jul 2020, doi: 10.1177/2050640620919254.

- [90] K. Rajamaki *et al.*, "Genetic and Epigenetic Characteristics of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer," *Gastroenterology*, vol. 161, no. 2, pp. 592-607, Aug 2021, doi: 10.1053/j.gastro.2021.04.042.
- [91] M. G. van Lier *et al.*, "Yield of routine molecular analyses in colorectal cancer patients  $\leq 70$  years to detect underlying Lynch syndrome," *J Pathol*, vol. 226, no. 5, pp. 764-74, Apr 2012, doi: 10.1002/path.3963.
- [92] J. L. Hornick, "Tumors of the Small and Large Intestines, Including Anal Canal," in *Diagnostic Histopathology of Tumors*, vol. 1, C. D. M. Fletcher Ed., 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2020, ch. 9, pp. 468-510.
- [93] H. T. Lynch, C. L. Snyder, T. G. Shaw, C. D. Heinen, and M. P. Hitchins, "Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015," *Nat Rev Cancer*, vol. 15, no. 3, pp. 181-94, Mar 2015, doi: 10.1038/nrc3878.
- [94] M. J. Arends, F. Carneiro, S. F. Lax, and A. J. Lazar, "Genetic tumour syndromes of the digestive system," in *Digestive System Tumours*, vol. 1, W. C. o. T. e. Board Ed., 5 ed. Lyon: International agency for Research on Cancer, 2019, ch. 14, pp. 511-550.
- [95] M. Pinheiro *et al.*, "A novel exonic rearrangement affecting MLH1 and the contiguous LRRFIP2 is a founder mutation in Portuguese Lynch syndrome families," *Genet Med*, vol. 13, no. 10, pp. 895-902, Oct 2011, doi: 10.1097/GIM.0b013e31821dd525.
- [96] M. J. Ligtenberg, R. P. Kuiper, A. Geurts van Kessel, and N. Hoogerbrugge, "EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients," *Fam Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 169-74, Jun 2013, doi: 10.1007/s10689-012-9591-x.
- [97] R. P. Kuiper *et al.*, "Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome," *Hum Mutat*, vol. 32, no. 4, pp. 407-14, Apr 2011, doi: 10.1002/humu.21446.
- [98] H. F. Vasen *et al.*, "Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP)," *Gut*, vol. 57, no. 5, pp. 704-13, May 2008, doi: 10.1136/gut.2007.136127.
- [99] V. B. Astler and F. A. Coller, "The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum," *Ann Surg*, vol. 139, no. 6, pp. 846-52, Jun 1954, doi: 10.1097/00000658-195406000-00015.
- [100] C. Dukes, "Histological Grading of Rectal Cancer: (Section of Pathology)," *Proc R Soc Med*, vol. 30, no. 4, pp. 371-6, Feb 1937. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19990989>.
- [101] M. J. Pollheimer *et al.*, "Clinical significance of pT sub-classification in surgical pathology of colorectal cancer," *Int J Colorectal Dis*, vol. 25, no. 2, pp. 187-96, Feb 2010, doi: 10.1007/s00384-009-0801-4.
- [102] S. L. Bosch, S. Teerenstra, J. H. de Wilt, C. Cunningham, and I. D. Nagtegaal, "Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions," *Endoscopy*, vol. 45, no. 10, pp. 827-34, Oct 2013, doi: 10.1055/s-0033-1344238.

- [103] S. F. Brockmoeller and N. P. West, "Predicting systemic spread in early colorectal cancer: Can we do better?," *World J Gastroenterol*, vol. 25, no. 23, pp. 2887-2897, Jun 21 2019, doi: 10.3748/wjg.v25.i23.2887.
- [104] R. C. Haggitt, R. E. Glotzbach, E. E. Soffer, and L. D. Wruble, "Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: implications for lesions removed by endoscopic polypectomy," *Gastroenterology*, vol. 89, no. 2, pp. 328-36, Aug 1985, doi: 10.1016/0016-5085(85)90333-6.
- [105] R. Kikuchi *et al.*, "Management of early invasive colorectal cancer. Risk of recurrence and clinical guidelines," *Dis Colon Rectum*, vol. 38, no. 12, pp. 1286-95, Dec 1995, doi: 10.1007/BF02049154.
- [106] S. Kudo, "Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer," *Endoscopy*, vol. 25, no. 7, pp. 455-61, Sep 1993, doi: 10.1055/s-2007-1010367.
- [107] S. Yamamoto *et al.*, "The risk of lymph node metastasis in T1 colorectal carcinoma," *Hepatogastroenterology*, vol. 51, no. 58, pp. 998-1000, Jul-Aug 2004. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15239233>.
- [108] E. Shinto *et al.*, "The subserosal elastic lamina: an anatomic landmark for stratifying pT3 colorectal cancer," *Dis Colon Rectum*, vol. 47, no. 4, pp. 467-73, Apr 2004, doi: 10.1007/s10350-003-0083-9.
- [109] S. Foersch *et al.*, "pT3 colorectal cancer revisited: a multicentric study on the histological depth of invasion in more than 1000 pT3 carcinomas-proposal for a new pT3a/pT3b subclassification," *Br J Cancer*, Jul 21 2022, doi: 10.1038/s41416-022-01889-1.
- [110] I. D. Nagtegaal *et al.*, "Tumor Deposits in Colorectal Cancer: Improving the Value of Modern Staging-A Systematic Review and Meta-Analysis," *J Clin Oncol*, vol. 35, no. 10, pp. 1119-1127, Apr 1 2017, doi: 10.1200/JCO.2016.68.9091.
- [111] J. F. Delattre *et al.*, "A comprehensive overview of tumour deposits in colorectal cancer: Towards a next TNM classification," *Cancer Treat Rev*, vol. 103, p. 102325, Feb 2022, doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102325.
- [112] N. Peparini, "Beyond T, N and M: The impact of tumor deposits on the staging and treatment of colorectal and gastric carcinoma," *Surg Oncol*, vol. 27, no. 2, pp. 129-137, Jun 2018, doi: 10.1016/j.suronc.2018.02.007.
- [113] S. R. Hamilton *et al.*, "Carcinoma of the colon and rectum," in *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*, F. T. Bosman, F. Carneiro, R. H. Hruban, and N. D. Theise Eds., 4 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010, ch. 8, pp. 134-146.
- [114] R. S. Gonzalez *et al.*, "Recent Advances in Digestive Tract Tumors: Updates From the 5th Edition of the World Health Organization "Blue Book"," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 145, no. 5, pp. 607-626, May 1 2021, doi: 10.5858/arpa.2020-0047-RA.
- [115] O. T. Giger, S. C. Comtesse, A. Lugli, I. Zlobec, and M. O. Kurrer, "Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant

- metastasis in patients with colorectal cancer," *Mod Pathol*, vol. 25, no. 7, pp. 1048-53, Jul 2012, doi: 10.1038/modpathol.2012.56.
- [116] A. Lugli *et al.*, "Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016," *Mod Pathol*, vol. 30, no. 9, pp. 1299-1311, Sep 2017, doi: 10.1038/modpathol.2017.46.
- [117] I. Zlobec *et al.*, "Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients," *Br J Cancer*, vol. 110, no. 4, pp. 1008-13, Feb 18 2014, doi: 10.1038/bjc.2013.797.
- [118] A. C. Rogers *et al.*, "Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy," *Mod Pathol*, vol. 27, no. 1, pp. 156-62, Jan 2014, doi: 10.1038/modpathol.2013.124.
- [119] M. Jesinghaus *et al.*, "Colorectal mixed adenoneuroendocrine carcinomas and neuroendocrine carcinomas are genetically closely related to colorectal adenocarcinomas," *Mod Pathol*, vol. 30, no. 4, pp. 610-619, Apr 2017, doi: 10.1038/modpathol.2016.220.
- [120] D. Schizas *et al.*, "Primary Squamous Cell Carcinoma of Colon and Rectum: A Systematic Review of the Literature," *J Invest Surg*, vol. 35, no. 1, pp. 151-156, Jan 2022, doi: 10.1080/08941939.2020.1824044.
- [121] J. V. Juturi, B. Francis, P. W. Koontz, and J. D. Wilkes, "Squamous-cell carcinoma of the colon responsive to combination chemotherapy: report of two cases and review of the literature," *Dis Colon Rectum*, vol. 42, no. 1, pp. 102-9, Jan 1999, doi: 10.1007/BF02235191.
- [122] X. Wu, H. Lin, and S. Li, "Prognoses of different pathological subtypes of colorectal cancer at different stages: A population-based retrospective cohort study," *BMC Gastroenterol*, vol. 19, no. 1, p. 164, Oct 10 2019, doi: 10.1186/s12876-019-1083-0.
- [123] N. Hugen, C. J. H. van de Velde, J. H. W. de Wilt, and I. D. Nagtegaal, "Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype," *Ann Oncol*, vol. 25, no. 3, pp. 651-657, Mar 2014, doi: 10.1093/annonc/mdt591.
- [124] P. Chu, E. Wu, and L. M. Weiss, "Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases," *Mod Pathol*, vol. 13, no. 9, pp. 962-72, Sep 2000, doi: 10.1038/modpathol.3880175.
- [125] J. R. Goldblum, "Large Bowel," in *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, vol. 1, 11 ed.: Elsevier, 2018, ch. 17, pp. 648-702.
- [126] L. R. Ylagan, J. Scholes, and R. Demopoulos, "Cd44: a marker of squamous differentiation in adenosquamous neoplasms," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 124, no. 2, pp. 212-5, Feb 2000, doi: 10.5858/2000-124-0212-C.
- [127] G. Rindi, P. Komminoth, J. Y. Scoazec, and J. Shia, "Colorectal neuroendocrine neoplasms," in *Digestive System Tumours*, I. Nagtegaal, M. J. Arends, R. D. Odze, and A. K. Lam Eds., 5 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019, ch. 6, pp. 188-192.

- [128] M. Volante, G. Rindi, and M. Papotti, "The grey zone between pure (neuro)endocrine and non-(neuro)endocrine tumours: a comment on concepts and classification of mixed exocrine-endocrine neoplasms," *Virchows Arch*, vol. 449, no. 5, pp. 499-506, Nov 2006, doi: 10.1007/s00428-006-0306-2.
- [129] H. J. Lee *et al.*, "Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells," *Mod Pathol*, vol. 26, no. 8, pp. 1123-31, Aug 2013, doi: 10.1038/modpathol.2012.163.
- [130] V. Barresi, L. Reggiani Bonetti, A. Ieni, R. A. Caruso, and G. Tuccari, "Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives," *Histol Histopathol*, vol. 30, no. 9, pp. 1059-67, Sep 2015, doi: 10.14670/HH-11-633.
- [131] R. D. Knox *et al.*, "Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases," *Ann Surg Oncol*, vol. 22, no. 9, pp. 2988-96, Sep 2015, doi: 10.1245/s10434-014-4355-5.
- [132] J. Verhulst, L. Ferdinande, P. Demetter, and W. Ceelen, "Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis," *J Clin Pathol*, vol. 65, no. 5, pp. 381-8, May 2012, doi: 10.1136/jclinpath-2011-200340.
- [133] M. Martinotti *et al.*, "Microsatellite Instability in Medullary Carcinoma of the Colon," *Rare Tumors*, vol. 9, no. 1, p. 6541, Mar 24 2017, doi: 10.4081/rt.2017.6541.
- [134] S. Ogino *et al.*, "Distinct molecular features of colorectal carcinoma with signet ring cell component and colorectal carcinoma with mucinous component," *Mod Pathol*, vol. 19, no. 1, pp. 59-68, Jan 2006, doi: 10.1038/modpathol.3800482.
- [135] C. Rosty *et al.*, "Should the grading of colorectal adenocarcinoma include microsatellite instability status?," *Hum Pathol*, vol. 45, no. 10, pp. 2077-84, Oct 2014, doi: 10.1016/j.humpath.2014.06.020.
- [136] D. S. Klimstra, G. Klöppel, S. La Rosa, and G. Rindi, "Classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system," in *Digestive System Tumours*, vol. 1, W. C. o. T. E. Board Ed., 5 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2019, ch. 1, pp. 16-19.
- [137] H. Ueno, J. Murphy, J. R. Jass, H. Mochizuki, and I. C. Talbot, "Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer," *Histopathology*, vol. 40, no. 2, pp. 127-32, Feb 2002, doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01324.x.
- [138] R. S. Gonzalez *et al.*, "Micropapillary colorectal carcinoma: clinical, pathological and molecular properties, including evidence of epithelial-mesenchymal transition," *Histopathology*, vol. 70, no. 2, pp. 223-231, Jan 2017, doi: 10.1111/his.13068.
- [139] L. De Smedt, S. Palmans, and X. Sagaert, "Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?," *Virchows Arch*, vol. 468, no. 4, pp. 397-408, Apr 2016, doi: 10.1007/s00428-015-1886-5.
- [140] L. De Smedt *et al.*, "Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching," *Br J Cancer*, vol. 116, no. 1, pp. 58-65, Jan 3 2017, doi: 10.1038/bjc.2016.382.

- [141] J. R. Jass *et al.*, "APC mutation and tumour budding in colorectal cancer," *J Clin Pathol*, vol. 56, no. 1, pp. 69-73, Jan 2003, doi: 10.1136/jcp.56.1.69.
- [142] E. Karamitopoulou *et al.*, "Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer," *Histopathology*, vol. 57, no. 2, pp. 233-43, Aug 2010, doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03615.x.
- [143] F. Prall, C. Ostwald, V. Weirich, and H. Nizze, "p16(INK4a) promoter methylation and 9p21 allelic loss in colorectal carcinomas: relation with immunohistochemical p16(INK4a) expression and with tumor budding," *Hum Pathol*, vol. 37, no. 5, pp. 578-85, May 2006, doi: 10.1016/j.humpath.2006.01.005.
- [144] I. Zlobec and A. Lugli, "Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget," *Oncotarget*, vol. 1, no. 7, pp. 651-61, Nov 2010, doi: 10.18632/oncotarget.199.
- [145] I. Zlobec *et al.*, "Role of APAF-1, E-cadherin and peritumoral lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer," *J Pathol*, vol. 212, no. 3, pp. 260-8, Jul 2007, doi: 10.1002/path.2164.
- [146] I. Zlobec and A. Lugli, "Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation," *Nat Rev Cancer*, vol. 18, no. 4, pp. 203-204, Apr 2018, doi: 10.1038/nrc.2018.1.
- [147] C. Du, W. Xue, J. Li, Y. Cai, and J. Gu, "Morphology and prognostic value of tumor budding in rectal cancer after neoadjuvant radiotherapy," *Hum Pathol*, vol. 43, no. 7, pp. 1061-7, Jul 2012, doi: 10.1016/j.humpath.2011.07.026.
- [148] K. Hase, C. Shatney, D. Johnson, M. Trollope, and M. Vierra, "Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer," *Dis Colon Rectum*, vol. 36, no. 7, pp. 627-35, Jul 1993, doi: 10.1007/BF02238588.
- [149] H. Kanazawa *et al.*, "Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer," *Colorectal Dis*, vol. 10, no. 1, pp. 41-7, Jan 2008, doi: 10.1111/j.1463-1318.2007.01240.x.
- [150] F. Prall, H. Nizze, and M. Barten, "Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma," *Histopathology*, vol. 47, no. 1, pp. 17-24, Jul 2005, doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02161.x.
- [151] A. C. Rogers *et al.*, "Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer," *Br J Cancer*, vol. 115, no. 7, pp. 831-40, Sep 27 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.274.
- [152] H. Ueno *et al.*, "Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 127, no. 2, pp. 385-94, Aug 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2004.04.022.
- [153] H. C. van Wyk, J. Park, C. Roxburgh, P. Horgan, A. Foulis, and D. C. McMillan, "The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: a systematic review," *Cancer Treat Rev*, vol. 41, no. 2, pp. 151-9, Feb 2015, doi: 10.1016/j.ctrv.2014.12.007.

- [154] L. M. Wang *et al.*, "Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer," *Am J Surg Pathol*, vol. 33, no. 1, pp. 134-41, Jan 2009, doi: 10.1097/PAS.0b013e318184cd55.
- [155] M. Mark, F. M. Rijli, and P. Chambon, "Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis," *Pediatr Res*, vol. 42, no. 4, pp. 421-9, Oct 1997, doi: 10.1203/00006450-199710000-00001.
- [156] F. Drummond, W. Putt, M. Fox, and Y. H. Edwards, "Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene," *Ann Hum Genet*, vol. 61, no. Pt 5, pp. 393-400, Sep 1997, doi: 10.1046/j.1469-1809.1997.6150393.x.
- [157] F. Beck, T. Erler, A. Russell, and R. James, "Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes," *Dev Dyn*, vol. 204, no. 3, pp. 219-27, Nov 1995, doi: 10.1002/aja.1002040302.
- [158] K. Chawengsaksophak, R. James, V. E. Hammond, F. Kontgen, and F. Beck, "Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice," *Nature*, vol. 386, no. 6620, pp. 84-7, Mar 6 1997, doi: 10.1038/386084a0.
- [159] E. Suh and P. G. Traber, "An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation," *Mol Cell Biol*, vol. 16, no. 2, pp. 619-25, Feb 1996, doi: 10.1128/MCB.16.2.619.
- [160] F. Beck, K. Chawengsaksophak, P. Waring, R. J. Playford, and J. B. Furness, "Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 13, pp. 7318-23, Jun 22 1999, doi: 10.1073/pnas.96.13.7318.
- [161] X. G. Li *et al.*, "CDX2 increases SLC7A7 expression and proliferation of pig intestinal epithelial cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 21, pp. 30597-609, May 24 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8894.
- [162] H. B. Fan *et al.*, "CDX2 Stimulates the Proliferation of Porcine Intestinal Epithelial Cells by Activating the mTORC1 and Wnt/beta-Catenin Signaling Pathways," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 11, Nov 18 2017, doi: 10.3390/ijms18112447.
- [163] G. Bou *et al.*, "CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts," *Development*, vol. 144, no. 7, pp. 1296-1306, Apr 1 2017, doi: 10.1242/dev.141085.
- [164] F. Beck and E. J. Stringer, "The role of Cdx genes in the gut and in axial development," *Biochem Soc Trans*, vol. 38, no. 2, pp. 353-7, Apr 2010, doi: 10.1042/BST0380353.
- [165] K. Chawengsaksophak, W. de Graaff, J. Rossant, J. Deschamps, and F. Beck, "Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 20, pp. 7641-5, May 18 2004, doi: 10.1073/pnas.0401654101.
- [166] Y. Zhu and D. Lohnes, "Regulation of axial elongation by Cdx," *Dev Biol*, vol. 483, pp. 118-127, Mar 2022, doi: 10.1016/j.ydbio.2021.12.011.
- [167] H. C. Ee, T. Erler, P. S. Bhathal, G. P. Young, and R. J. James, "Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and

- carcinoma," *Am J Pathol*, vol. 147, no. 3, pp. 586-92, Sep 1995. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7677172>.
- [168] G. V. Mallo *et al.*, "Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis," *Int J Cancer*, vol. 74, no. 1, pp. 35-44, Feb 20 1997, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970220)74:1<35::aid-ijc7>3.0.co;2-1.
- [169] R. James, T. Erler, and J. Kazenwadel, "Structure of the murine homeobox gene cdx-2. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium," *J Biol Chem*, vol. 269, no. 21, pp. 15229-37, May 27 1994. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7910823>.
- [170] O. Lorentz, I. Duluc, A. D. Arcangelis, P. Simon-Assmann, M. Kedinger, and J. N. Freund, "Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation," *J Cell Biol*, vol. 139, no. 6, pp. 1553-65, Dec 15 1997, doi: 10.1083/jcb.139.6.1553.
- [171] C. Bonhomme *et al.*, "The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development," *Gut*, vol. 52, no. 10, pp. 1465-71, Oct 2003, doi: 10.1136/gut.52.10.1465.
- [172] O. Lorentz *et al.*, "Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic ras," *Oncogene*, vol. 18, no. 1, pp. 87-92, Jan 7 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202280.
- [173] K. Salari *et al.*, "CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 46, pp. E3196-205, Nov 13 2012, doi: 10.1073/pnas.1206004109.
- [174] L. Shen, Q. Shi, and W. Wang, "Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions," *Oncogenesis*, vol. 7, no. 3, p. 25, Mar 13 2018, doi: 10.1038/s41389-018-0034-x.
- [175] UniProt. "Homeobox protein CDX-2." <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99626> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [176] M. Boyd *et al.*, "Genome-wide analysis of CDX2 binding in intestinal epithelial cells (Caco-2)," *J Biol Chem*, vol. 285, no. 33, pp. 25115-25, Aug 13 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.089516.
- [177] I. Hinkel, I. Duluc, E. Martin, D. Guenot, J. N. Freund, and I. Gross, "Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and beta-catenin activity in colon cancer cells," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 4, pp. 875-885 e3, Apr 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.037.
- [178] A. K. Olsen *et al.*, "Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 6, pp. 1361-9, Jun 2013, doi: 10.1093/carcin/bgt037.

- [179] J. Yu *et al.*, "CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt/beta-catenin signaling via transactivation of GSK-3beta and Axin2 expression," *Cell Death Dis*, vol. 10, no. 1, p. 26, Jan 10 2019, doi: 10.1038/s41419-018-1263-9.
- [180] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70, Jan 7 2000, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- [181] S. Kim *et al.*, "PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway," *Gastroenterology*, vol. 123, no. 4, pp. 1163-78, Oct 2002, doi: 10.1053/gast.2002.36043.
- [182] C. C. Wu, T. W. Hsu, C. C. Yeh, and H. B. Huang, "The role of transcription factor caudal-related homeobox transcription factor 2 in colorectal cancer," *Tzu Chi Med J*, vol. 32, no. 4, pp. 305-311, Oct-Dec 2020, doi: 10.4103/tcmj.tcmj\_49\_20.
- [183] T. E. Johnson *et al.*, "Homeodomain Proteins Directly Regulate ATM Kinase Activity," *Cell Rep*, vol. 24, no. 6, pp. 1471-1483, Aug 7 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.089.
- [184] Y. Q. Bai, S. Miyake, T. Iwai, and Y. Yuasa, "CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene," *Oncogene*, vol. 22, no. 39, pp. 7942-9, Sep 11 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206634.
- [185] K. Aoki, F. Kakizaki, H. Sakashita, T. Manabe, M. Aoki, and M. M. Taketo, "Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1," *Cancer Res*, vol. 71, no. 2, pp. 593-602, Jan 15 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2842.
- [186] J. Zheng *et al.*, "Targeted CDX2 expression inhibits aggressive phenotypes of colon cancer cells in vitro and in vivo," *Int J Oncol*, vol. 51, no. 2, pp. 478-488, Aug 2017, doi: 10.3892/ijo.2017.4040.
- [187] J. B. Zheng *et al.*, "Effects of homeodomain protein CDX2 expression on the proliferation and migration of lovo colon cancer cells," *Pathol Oncol Res*, vol. 17, no. 3, pp. 743-51, Sep 2011, doi: 10.1007/s12253-011-9380-0.
- [188] S. P. Kim *et al.*, "Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 315, no. 1, pp. 93-9, Feb 27 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.020.
- [189] H. Mutoh, H. Hayakawa, H. Sakamoto, and K. Sugano, "Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor-kappaB," *J Gastroenterol*, vol. 42, no. 9, pp. 719-29, Sep 2007, doi: 10.1007/s00535-007-2088-y.
- [190] M. Coskun *et al.*, "Involvement of CDX2 in the cross talk between TNF-alpha and Wnt signaling pathway in the colon cancer cell line Caco-2," *Carcinogenesis*, vol. 35, no. 5, pp. 1185-92, May 2014, doi: 10.1093/carcin/bgu037.
- [191] M. Coskun, "The role of CDX2 in inflammatory bowel disease," *Dan Med J*, vol. 61, no. 3, p. B4820, Mar 2014. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814920>.

- [192] H. Shaked *et al.*, "Chronic epithelial NF-kappaB activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 35, pp. 14007-12, Aug 28 2012, doi: 10.1073/pnas.1211509109.
- [193] C. Balbinot *et al.*, "The Cdx2 homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms," *J Exp Med*, vol. 215, no. 3, pp. 911-926, Mar 5 2018, doi: 10.1084/jem.20170934.
- [194] J. N. Freund, I. Duluc, J. M. Reimund, I. Gross, and C. Domon-Dell, "Extending the functions of the homeotic transcription factor Cdx2 in the digestive system through nontranscriptional activities," *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 5, pp. 1436-43, Feb 7 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i5.1436.
- [195] R. J. Guo, S. Funakoshi, H. H. Lee, J. Kong, and J. P. Lynch, "The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 2, pp. 159-66, Feb 2010, doi: 10.1093/carcin/bgp213.
- [196] M. E. Witek *et al.*, "A novel CDX2 isoform regulates alternative splicing," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e104293, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0104293.
- [197] Y. Baba *et al.*, "Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer," *Clin Cancer Res*, vol. 15, no. 14, pp. 4665-73, Jul 15 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0401.
- [198] J. Olsen *et al.*, "CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer," *Exp Mol Pathol*, vol. 100, no. 1, pp. 59-66, Feb 2016, doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.009.
- [199] J. Neumann, V. Heinemann, J. Engel, T. Kirchner, and S. Stintzing, "The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer," *Virchows Arch*, vol. 473, no. 2, pp. 199-207, Aug 2018, doi: 10.1007/s00428-018-2360-y.
- [200] A. Lugli, A. Tzankov, I. Zlobec, and L. M. Terracciano, "Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status," *Mod Pathol*, vol. 21, no. 11, pp. 1403-12, Nov 2008, doi: 10.1038/modpathol.2008.117.
- [201] J. H. Kim, Y. Y. Rhee, J. M. Bae, N. Y. Cho, and G. H. Kang, "Loss of CDX2/CK20 expression is associated with poorly differentiated carcinoma, the CpG island methylator phenotype, and adverse prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer," *Am J Surg Pathol*, vol. 37, no. 10, pp. 1532-41, Oct 2013, doi: 10.1097/PAS.0b013e31829ab1c1.
- [202] H. Dawson *et al.*, "Possible role of Cdx2 in the serrated pathway of colorectal cancer characterized by BRAF mutation, high-level CpG Island methylator phenotype and mismatch repair-deficiency," *Int J Cancer*, vol. 134, no. 10, pp. 2342-51, May 15 2014, doi: 10.1002/ijc.28564.
- [203] L. S. Rozek *et al.*, "CDX2 polymorphisms, RNA expression, and risk of colorectal cancer," *Cancer Res*, vol. 65, no. 13, pp. 5488-92, Jul 1 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3645.

- [204] T. Hinoi *et al.*, "Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon," *Am J Pathol*, vol. 159, no. 6, pp. 2239-48, Dec 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63074-X.
- [205] N. Sakamoto *et al.*, "BRAF(V600E) cooperates with CDX2 inactivation to promote serrated colorectal tumorigenesis," *Elife*, vol. 6, Jan 10 2017, doi: 10.7554/eLife.20331.
- [206] J. Graule *et al.*, "CDX2 in colorectal cancer is an independent prognostic factor and regulated by promoter methylation and histone deacetylation in tumors of the serrated pathway," *Clin Epigenetics*, vol. 10, no. 1, p. 120, Sep 26 2018, doi: 10.1186/s13148-018-0548-2.
- [207] C. Pilati, J. Taieb, R. Balogoun, L. Marisa, A. de Reynies, and P. Laurent-Puig, "CDX2 prognostic value in stage II/III resected colon cancer is related to CMS classification," *Ann Oncol*, vol. 28, no. 5, pp. 1032-1035, May 1 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx066.
- [208] J. Guinney *et al.*, "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," *Nat Med*, vol. 21, no. 11, pp. 1350-6, Nov 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [209] P. Dalerba *et al.*, "CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer," *N Engl J Med*, vol. 374, no. 3, pp. 211-22, Jan 21 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1506597.
- [210] J. M. Bae, T. H. Lee, N. Y. Cho, T. Y. Kim, and G. H. Kang, "Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients," *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 5, pp. 1457-67, Feb 7 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i5.1457.
- [211] J. Olsen, M. L. Espersen, P. Jess, L. T. Kirkeby, and J. T. Troelsen, "The clinical perspectives of CDX2 expression in colorectal cancer: a qualitative systematic review," *Surg Oncol*, vol. 23, no. 3, pp. 167-76, Sep 2014, doi: 10.1016/j.suronc.2014.07.003.
- [212] G. Tomasello *et al.*, "Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis," *Clin Colorectal Cancer*, vol. 17, no. 2, pp. 97-103, Jun 2018, doi: 10.1016/j.clcc.2018.02.001.
- [213] B. Y. Zhang *et al.*, "Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer," *Clin Colorectal Cancer*, vol. 16, no. 2, pp. 124-128, Jun 2017, doi: 10.1016/j.clcc.2016.09.003.
- [214] V. Kaimaktchiev *et al.*, "The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas," *Mod Pathol*, vol. 17, no. 11, pp. 1392-9, Nov 2004, doi: 10.1038/modpathol.3800205.
- [215] S. Bakaris, A. Cetinkaya, F. Ezberci, and H. Ekerbicer, "Expression of homeodomain protein CDX2 in colorectal adenoma and adenocarcinoma," *Histol Histopathol*, vol. 23, no. 9, pp. 1043-7, Sep 2008, doi: 10.14670/HH-23.1043.
- [216] W. Xu *et al.*, "Combination of CDX2 expression and T stage improves prognostic prediction of colorectal cancer," *J Int Med Res*, vol. 47, no. 5, pp. 1829-1842, May 2019, doi: 10.1177/0300060518819620.

- [217] The Human Protein Atlas. "CDX2." <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165556-CDX2/pathology> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [218] R. Moll, "[Transcription factors in tumor diagnosis]," *Pathologe*, vol. 39, no. Suppl 2, pp. 285-290, Dec 2018, doi: 10.1007/s00292-018-0518-7. Transkriptionsfaktoren in der Tumordiagnostik.
- [219] G. M. Groisman, J. Bernheim, M. Halpern, E. Brazowsky, and A. Meir, "Expression of the intestinal marker Cdx2 in secondary adenocarcinomas of the colorectum," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 129, no. 7, pp. 920-3, Jul 2005, doi: 10.5858/2005-129-920-EOTIMC.
- [220] The Human Protein Atlas. "SATB2." <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000119042-SATB2> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [221] N. G. Ordonez, "SATB2 is a novel marker of osteoblastic differentiation and colorectal adenocarcinoma," *Adv Anat Pathol*, vol. 21, no. 1, pp. 63-7, Jan 2014, doi: 10.1097/PAP.0000000000000001.
- [222] K. B. Berg and D. F. Schaeffer, "SATB2 as an Immunohistochemical Marker for Colorectal Adenocarcinoma: A Concise Review of Benefits and Pitfalls," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 141, no. 10, pp. 1428-1433, Oct 2017, doi: 10.5858/arpa.2016-0243-RS.
- [223] G. Dobрева, J. Dambacher, and R. Grosschedl, "SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression," *Genes Dev*, vol. 17, no. 24, pp. 3048-61, Dec 15 2003, doi: 10.1101/gad.1153003.
- [224] A. K. Linnemann, A. E. Platts, and S. A. Krawetz, "Differential nuclear scaffold/matrix attachment marks expressed genes," *Hum Mol Genet*, vol. 18, no. 4, pp. 645-54, Feb 15 2009, doi: 10.1093/hmg/ddn394.
- [225] T. Boulikas, "Nature of DNA sequences at the attachment regions of genes to the nuclear matrix," *J Cell Biochem*, vol. 52, no. 1, pp. 14-22, May 1993, doi: 10.1002/jcb.240520104.
- [226] A. B. Gyorgy, M. Szemes, C. de Juan Romero, V. Tarabykin, and D. V. Agoston, "SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons," *Eur J Neurosci*, vol. 27, no. 4, pp. 865-73, Feb 2008, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06061.x.
- [227] R. Naik and S. Galande, "SATB family chromatin organizers as master regulators of tumor progression," *Oncogene*, vol. 38, no. 12, pp. 1989-2004, Mar 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0541-4.
- [228] Y. A. Zarate, J. Kaylor, and J. Fish, "SATB2-Associated Syndrome," in *GeneReviews((R))*, M. P. Adam *et al.* Eds. Seattle (WA), 1993.
- [229] D. R. FitzPatrick *et al.*, "Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33," *Hum Mol Genet*, vol. 12, no. 19, pp. 2491-501, Oct 1 2003, doi: 10.1093/hmg/ddg248.

- [230] K. Sheehan-Rooney, B. Palinkasova, J. K. Eberhart, and M. J. Dixon, "A cross-species analysis of *Satb2* expression suggests deep conservation across vertebrate lineages," *Dev Dyn*, vol. 239, no. 12, pp. 3481-91, Dec 2010, doi: 10.1002/dvdy.22483.
- [231] Y. A. Zarate and J. L. Fish, "SATB2-associated syndrome: Mechanisms, phenotype, and practical recommendations," *Am J Med Genet A*, vol. 173, no. 2, pp. 327-337, Feb 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38022.
- [232] E. A. Alcamo *et al.*, "*Satb2* regulates callosal projection neuron identity in the developing cerebral cortex," *Neuron*, vol. 57, no. 3, pp. 364-77, Feb 7 2008, doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.012.
- [233] O. Britanova *et al.*, "*Satb2* is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex," *Neuron*, vol. 57, no. 3, pp. 378-92, Feb 7 2008, doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.028.
- [234] G. Dobрева *et al.*, "SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 971-86, Jun 2 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.05.012.
- [235] M. Q. Hassan *et al.*, "A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 46, pp. 19879-84, Nov 16 2010, doi: 10.1073/pnas.1007698107.
- [236] J. Brocato and M. Costa, "SATB1 and 2 in colorectal cancer," *Carcinogenesis*, vol. 36, no. 2, pp. 186-91, Feb 2015, doi: 10.1093/carcin/bgu322.
- [237] Y. Q. Wang *et al.*, "SATB2-AS1 Suppresses Colorectal Carcinoma Aggressiveness by Inhibiting SATB2-Dependent Snail Transcription and Epithelial-Mesenchymal Transition," *Cancer Res*, vol. 79, no. 14, pp. 3542-3556, Jul 15 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2900.
- [238] Y. Wang, J. Shi, K. Chai, X. Ying, and B. P. Zhou, "The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis," *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 13, no. 9, pp. 963-972, Nov 2013, doi: 10.2174/15680096113136660102.
- [239] M. Xu *et al.*, "LncRNA SATB2-AS1 inhibits tumor metastasis and affects the tumor immune cell microenvironment in colorectal cancer by regulating SATB2," *Mol Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 135, Sep 6 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1063-6.
- [240] M. A. Mansour *et al.*, "SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 4, pp. 4993-5006, Jan 26 2016, doi: 10.18632/oncotarget.6651.
- [241] M. A. Mansour *et al.*, "SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling," *FEBS J*, vol. 282, no. 8, pp. 1394-405, Apr 2015, doi: 10.1111/febs.13227.
- [242] P. A. Lochhead, R. Gilley, and S. J. Cook, "ERK5 and its role in tumour development," *Biochem Soc Trans*, vol. 40, no. 1, pp. 251-6, Feb 2012, doi: 10.1042/BST20110663.

- [243] F. Savarese *et al.*, "Satb1 and Satb2 regulate embryonic stem cell differentiation and Nanog expression," *Genes Dev*, vol. 23, no. 22, pp. 2625-38, Nov 15 2009, doi: 10.1101/gad.1815709.
- [244] Y. Li, Y. H. Liu, Y. Y. Hu, L. Chen, and J. M. Li, "Special AT-rich sequence-binding protein 2 acts as a negative regulator of stemness in colorectal cancer cells," *World J Gastroenterol*, vol. 22, no. 38, pp. 8528-8539, Oct 14 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i38.8528.
- [245] C. Ma, B. M. Lowenthal, and R. K. Pai, "SATB2 Is Superior to CDX2 in Distinguishing Signet Ring Cell Carcinoma of the Upper Gastrointestinal Tract and Lower Gastrointestinal Tract," *Am J Surg Pathol*, vol. 42, no. 12, pp. 1715-1722, Dec 2018, doi: 10.1097/PAS.0000000000001159.
- [246] J. Eberhard *et al.*, "A cohort study of the prognostic and treatment predictive value of SATB2 expression in colorectal cancer," *Br J Cancer*, vol. 106, no. 5, pp. 931-8, Feb 28 2012, doi: 10.1038/bjc.2012.34.
- [247] A. Mezheyeuski *et al.*, "Metastatic colorectal carcinomas with high SATB2 expression are associated with better prognosis and response to chemotherapy: a population-based Scandinavian study," *Acta Oncol*, vol. 59, no. 3, pp. 284-290, Mar 2020, doi: 10.1080/0284186X.2019.1691258.
- [248] S. Wang *et al.*, "Down-regulated expression of SATB2 is associated with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer," *J Pathol*, vol. 219, no. 1, pp. 114-22, Sep 2009, doi: 10.1002/path.2575.
- [249] F. Lin *et al.*, "Cadherin-17 and SATB2 are sensitive and specific immunomarkers for medullary carcinoma of the large intestine," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 138, no. 8, pp. 1015-26, Aug 2014, doi: 10.5858/arpa.2013-0452-OA.
- [250] S. De Michele, H. E. Remotti, A. Del Portillo, S. M. Lagana, M. Szabolcs, and A. Saqi, "SATB2 in Neoplasms of Lung, Pancreatobiliary, and Gastrointestinal Origins," *Am J Clin Pathol*, vol. 155, no. 1, pp. 124-132, Jan 4 2021, doi: 10.1093/ajcp/aqaa118.
- [251] M. Moh, G. Krings, D. Ates, A. Aysal, G. E. Kim, and J. T. Rabban, "SATB2 Expression Distinguishes Ovarian Metastases of Colorectal and Appendiceal Origin From Primary Ovarian Tumors of Mucinous or Endometrioid Type," *Am J Surg Pathol*, vol. 40, no. 3, pp. 419-32, Mar 2016, doi: 10.1097/PAS.0000000000000553.
- [252] M. Kriegsmann *et al.*, "Role of conventional immunomarkers, HNF4-alpha and SATB2, in the differential diagnosis of pulmonary and colorectal adenocarcinomas," *Histopathology*, vol. 72, no. 6, pp. 997-1006, May 2018, doi: 10.1111/his.13455.
- [253] C. J. Kim, T. Baruch-Oren, F. Lin, X. S. Fan, X. J. Yang, and H. L. Wang, "Value of SATB2 immunostaining in the distinction between small intestinal and colorectal adenocarcinomas," *J Clin Pathol*, vol. 69, no. 12, pp. 1046-1050, Dec 2016, doi: 10.1136/jclinpath-2015-203588.
- [254] I. Machado, S. Navarro, P. Picci, and A. Llombart-Bosch, "The utility of SATB2 immunohistochemical expression in distinguishing between osteosarcomas and their malignant bone tumor mimickers, such as Ewing sarcomas and chondrosarcomas," *Pathol Res Pract*, vol. 212, no. 9, pp. 811-6, Sep 2016, doi: 10.1016/j.prp.2016.06.012.

- [255] Academic Accelerator. (accessed).
- [256] 3DHISTECH Ltd. "Digitaler Workflow für Tissue Micro Arrays." sysmex. <https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f100/Pdf/Flyer-TMA-Workflow.pdf> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [257] Leica Biosystems. "BOND RX m - Compact, Fully Automated Stainer for IHC, ISH & Emerging Tests." Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd. [https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media\\_product-download/2021-05/201315\\_Rev\\_A\\_BOND\\_RXm\\_Brochure.pdf](https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_product-download/2021-05/201315_Rev_A_BOND_RXm_Brochure.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [258] Leica Biosystems. "BOND Epitope Retrieval Solution 1 " Leica Biosystems Newcastle Ltd. <https://files.leicabiosystems.com/LBS/DE/en/All?keycode=AR9961&lotrangeid=9d626c45-1677-41a2-b21c-b50c724ccb30> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [259] Leica Biosystems. "BOND Polymer Refine Detection " Leica Biosystems Newcastle Ltd. <https://files.leicabiosystems.com/LBS/DE/en/All> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [260] Leica Biosystems. "Aperio AT2 - Fast, High Capacity Digital Pathology Scanner." [https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/2020-10/Aperio\\_AT2\\_Brochure\\_USA.pdf](https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/2020-10/Aperio_AT2_Brochure_USA.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [261] Leica Biosystems. "ImageScope." [https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media\\_document-file/2021-02/MAN-0001-Rev-P\\_12.3.pdf](https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_document-file/2021-02/MAN-0001-Rev-P_12.3.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [262] Abcam. "Anti-CDX2 antibody [EPR2764Y]." Abcam, United Kingdom. <https://www.abcam.com/CDX2-antibody-EPR2764Y-ab76541.html> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [263] J. Budczies *et al.*, "Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e51862, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051862.
- [264] Cell Marque. "SATB2 (EP281)." [http://www.cellmarque.com/cmsial-literature/117-SPOTLIGHT\\_ON\\_SATB2.pdf](http://www.cellmarque.com/cmsial-literature/117-SPOTLIGHT_ON_SATB2.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [265] Ventana Medical Systems. "BenchMark XT - Vollautomatisiertes Färbesystem für IHC und ISH." Roche Diagnostics Deutschland GmbH. [https://assets.cwp.roche.com/f/94122/x/296ba8c556/broschure\\_benchmark\\_xt\\_produktbroschure.pdf](https://assets.cwp.roche.com/f/94122/x/296ba8c556/broschure_benchmark_xt_produktbroschure.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [266] Ventana Medical Systems. "VENTANA anti-PMS2 (A16-4) Mouse Monoclonal Primary Antibody." Roche Diagnostics. [https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/LandingPages/mmr-rxdx/VENTANA-anti-PMS2-\(A16-4\)-1015761USE.pdf](https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/LandingPages/mmr-rxdx/VENTANA-anti-PMS2-(A16-4)-1015761USE.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [267] Ventana Medical Systems. "VENTANA anti-MLH1 (M1) Mouse Monoclonal Primary Antibody." Roche Diagnostics. [https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/LandingPages/mmr-rxdx/VENTANA-anti-MLH1-\(M1\)-1015758USE.pdf](https://diagnostics.roche.com/content/dam/diagnostics/us/en/LandingPages/mmr-rxdx/VENTANA-anti-MLH1-(M1)-1015758USE.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).

- [268] Cell Marque. "MSH2 (G219-1129) Mouse Monoclonal Antibody." <http://www.cellmarque.com/cmsial-ifu/ASR28621050.pdf> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [269] BD Bioscience. "Purified Mouse Anti-MSH6." [https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/products/global/reagents/microscopy-imaging-reagents/immunofluorescence-reagents/610919\\_base/pdf/610918.pdf](https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/products/global/reagents/microscopy-imaging-reagents/immunofluorescence-reagents/610919_base/pdf/610918.pdf) (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [270] Roche Diagnostics. "ultraView Universal DAB Detection Kit." <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/46bf1f60-6a02-ec11-0d91-005056a71a5d?countryIsoCode=pi> (letzte Abfrage 27 Mai 2022).
- [271] G. Hall *et al.*, "Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma," *Pathology*, vol. 42, no. 5, pp. 409-13, 2010, doi: 10.3109/00313025.2010.493871.
- [272] C. R. Boland *et al.*, "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer," *Cancer Res*, vol. 58, no. 22, pp. 5248-57, Nov 15 1998. [Online]. Verfügbar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823339>.
- [273] R. A. Armstrong, "When to use the Bonferroni correction," *Ophthalmic Physiol Opt*, vol. 34, no. 5, pp. 502-8, Sep 2014, doi: 10.1111/opo.12131.
- [274] International Business Machines Corporation (IBM), "IBM SPSS Statistics Base 26," no. 26.0, pp. 1-190. [Online]. Verfügbar: [https://www.ibm.com/docs/en/SSLVMB\\_26.0.0/pdf/de/IBM\\_SPSS\\_Statistics\\_Base.pdf](https://www.ibm.com/docs/en/SSLVMB_26.0.0/pdf/de/IBM_SPSS_Statistics_Base.pdf)
- [275] Spencer E.A., Brassey J., Mahtani K., and H. C., "Wrong sample size bias," *Catalogue Of Bias*.
- [276] S. H. den Uil *et al.*, "Quantitative analysis of CDX2 protein expression improves its clinical utility as a prognostic biomarker in stage II and III colon cancer," *Eur J Cancer*, vol. 144, pp. 91-100, Feb 2021, doi: 10.1016/j.ejca.2020.10.029.
- [277] P. D. Dabir, H. Svanholm, and J. J. Christiansen, "SATB2 is a supplementary immunohistochemical marker to CDX2 in the diagnosis of colorectal carcinoma metastasis in an unknown primary," *APMIS*, vol. 126, no. 6, pp. 494-500, Jun 2018, doi: 10.1111/apm.12854.
- [278] S. M. Brettfeld, B. D. Ramos, R. S. Berry, D. R. Martin, and J. A. Hanson, "SATB2 Versus CDX2: A Battle Royale for Diagnostic Supremacy in Mucinous Tumors," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 143, no. 9, pp. 1119-1125, Sep 2019, doi: 10.5858/arpa.2018-0337-OA.
- [279] A. Lugli, I. Zlobec, M. D. Berger, R. Kirsch, and I. D. Nagtegaal, "Tumour budding in solid cancers," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 18, no. 2, pp. 101-115, Feb 2021, doi: 10.1038/s41571-020-0422-y.

- [280] I. Zlobec *et al.*, "Are tumour grade and tumour budding equivalent in colorectal cancer? A retrospective analysis of 771 patients," *Eur J Cancer*, vol. 130, pp. 139-145, May 2020, doi: 10.1016/j.ejca.2020.02.007.
- [281] G. Lanza, R. Gafa, M. Matteuzzi, and A. Santini, "Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival," *J Clin Oncol*, vol. 17, no. 8, pp. 2429-38, Aug 1999, doi: 10.1200/JCO.1999.17.8.2429.
- [282] R. P. Graham *et al.*, "Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort," *Am J Surg Pathol*, vol. 39, no. 10, pp. 1340-6, Oct 2015, doi: 10.1097/PAS.0000000000000504.
- [283] V. W. K. Lee and K. F. Chan, "Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer," *Pathol Res Pract*, vol. 214, no. 3, pp. 402-407, Mar 2018, doi: 10.1016/j.prp.2017.12.019.
- [284] M. H. Yang, J. Yu, D. M. Jiang, W. L. Li, S. Wang, and Y. Q. Ding, "microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis," *J Transl Med*, vol. 12, p. 109, May 1 2014, doi: 10.1186/1479-5876-12-109.
- [285] M. H. Yang *et al.*, "Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e85353, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0085353.
- [286] J. C. Dudley, M. T. Lin, D. T. Le, and J. R. Eshleman, "Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade," *Clin Cancer Res*, vol. 22, no. 4, pp. 813-20, Feb 15 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1678.
- [287] S. Popat, R. Hubner, and R. S. Houlston, "Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis," *J Clin Oncol*, vol. 23, no. 3, pp. 609-18, Jan 20 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.01.086.
- [288] C. Guastadisegni, M. Colafranceschi, L. Ottini, and E. Dogliotti, "Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data," *Eur J Cancer*, vol. 46, no. 15, pp. 2788-98, Oct 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2010.05.009.
- [289] C. Ma *et al.*, "SATB2 and CDX2 are prognostic biomarkers in DNA mismatch repair protein deficient colon cancer," *Mod Pathol*, vol. 32, no. 8, pp. 1217-1231, Jul 2019, doi: 10.1038/s41379-019-0265-1.
- [290] J. Hrudka *et al.*, "Loss of SATB2 expression correlates with cytokeratin 7 and PD-L1 tumor cell positivity and aggressiveness in colorectal cancer," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 19152, Nov 9 2022, doi: 10.1038/s41598-022-22685-0.
- [291] I. Vlahovic, J. Rajc, I. Svagelj, K. Solic, and D. Svagelj, "Potential predictors for CDX2 expression loss and mismatch repair deficiency in colorectal cancer," *Pathol Oncol Res*, vol. 29, p. 1610908, 2023, doi: 10.3389/pore.2023.1610908.

- [292] J. Li, Q. Zeng, J. Lin, H. Huang, and L. Chen, "Loss of SATB2 and CDX2 expression is associated with DNA mismatch repair protein deficiency and BRAF mutation in colorectal cancer," *Med Mol Morphol*, Aug 15 2023, doi: 10.1007/s00795-023-00366-9.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte altersstandardisierte Krebs-Inzidenz- und -Mortalitätsrate im Jahr 2020, weltweit, geschlechtsunspezifisch über allen Altersgruppen (modifiziert nach [4]).	15
Abbildung 2: Verteilung der Karzinome in Kolon und Rektum: Die Verteilung auf linksseitiges und rechtsseitiges Kolon ist bei einer Gesamtzahl von n = 1004 nahezu ausgewogen (modifiziert nach [11]).	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der stufenweisen Karzinogenese Kolorektaler Karzinome gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz unter Berücksichtigung weiterer alternativer Karzinogenesewege (modifiziert nach [62, 75, 78, 80, 83]).	20
Abbildung 4: Histomorphologische Übersicht über die häufigsten Subtypen des Kolorektalen Karzinoms (jeweils in HE-Färbung).	28
Abbildung 5: Low-grade Adenokarzinom NOS (jeweils HE-Färbung).	30
Abbildung 6: High-grade Adenokarzinom NOS (jeweils HE-Färbung).	30
Abbildung 7: Tumour Budding in verschiedenen Stadien (jeweils in HE-Färbung).	31
Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von CDX2.	34
Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von SATB2.	36
Abbildung 10: Altersverteilung in der Kohortenpopulation bei Erstdiagnose eines Kolorektalen Karzinoms nach Geschlecht stratifiziert (n=1039).	51
Abbildung 11: Transformation des Anteils CDX2-exprimierender Karzinomzellen (hier links als Boxplot dargestellt) in eine dichotome Klassifikation in eine CDX2 <sup>stark</sup> - und CDX2 <sup>negativ/schwach</sup> -Gruppen an der 10. Perzentile ( $\cong$ 60% CDX2-positiver Karzinomzellen) mithilfe des Cutoff-Finders [263] (rechte Seite).	53
Abbildung 12: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (n=1039) bezogen auf die Parameter der Ausbreitungsdiagnostik pT-Stadium (A), pN-Stadium (B), pM-Stadium (C), UICC-Stadien (D) sowie die Lokalisation der Karzinome (E) (modifiziert nach [1]).	55
Abbildung 13: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen auf die Subtypen des Kolorektalen Karzinoms in der Gesamtkohorte (n=1039) (modifiziert nach [1]).	57
Abbildung 14: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in Bezug auf die WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [1]).	58
Abbildung 15: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in Bezug auf die Tumour Budding-Aktivität der Karzinome (modifiziert nach [1]).	58

Abbildung 16: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen bezüglich Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).	59
Abbildung 17: Graphische Darstellung der Überlebensparameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) in Kaplan-Meier-Kurven bezogen auf die CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (modifiziert nach [1]).	60
Abbildung 18: Graphische Darstellung der univariaten Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach MSI- (A, C, E) und MSS- (B, D, F) Karzinomen jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).	63
Abbildung 19: Graphische Darstellung der univariaten Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach Tumorlokalisation jeweils für die Parameter OS (A, B), DSS (C, D) und DFS (E, F) (modifiziert nach [1]).	65
Abbildung 20: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in der Gesamtkohorte unter Einschluss der Parameter CDX2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, UICC-Stadium, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).	66
Abbildung 21: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in UICC III-Karzinomen unter Einschluss der Parameter CDX2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [1]).	67
Abbildung 22: Transformation des Anteils SATB2-exprimierender Karzinomzellen (hier links als Boxplot dargestellt) in eine dichotome Klassifikation in eine SATB2 <sup>stark-</sup> und SATB2 <sup>negativ/schwach-</sup> Gruppen an der 20. Perzentile ( $\cong$ 70% SATB2-positiver Karzinomzellen) mithilfe des Cutoff-Finders [263] (rechte Seite).	69
Abbildung 23: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte (n=1039) bezogen auf die Parameter der Ausbreitungsdiagnostik pT-Stadium (A), pN-Stadium (B), pM-Stadium (C), UICC-Stadien (D) sowie die Lokalisation der Karzinome (E) (modifiziert nach [2]).	72
Abbildung 24: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen auf die Subtypen des Kolorektalen Karzinoms in der Gesamtkohorte (n=1039) (modifiziert nach [2]).	74
Abbildung 25: In der Kohorte vertretene Subtypen (A-H) in der HE-Färbung (I) sowie jeweils exemplarisch ein Vertreter der SATB2 <sup>stark-</sup> (II) und der SATB2 <sup>negativ/schwach-</sup> Expressionsgruppe (III).	76
Abbildung 26: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in Bezug auf die WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [2]).	77
Abbildung 27: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in Bezug auf die Tumour Budding-Aktivität der Karzinome (modifiziert nach [2]).	77

Abbildung 28: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen bezüglich Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).	78
Abbildung 29: Graphische Darstellung der Überlebensparameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) in Kaplan-Meier-Kurven bezogen auf die Gesamtkohorte (n=1039) (modifiziert nach [2]).	79
Abbildung 30: Prognostische Relevanz der SATB2-Expression in univariaten Überlebensanalysen in UICC III-Karzinomen für die Parameter OS (A), DSS (B) und DFS (C) (modifiziert nach [2]).	79
Abbildung 31: Graphische Darstellung der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach low-grade (A, C, E) und high-grade Karzinomen (B, D, F) jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	82
Abbildung 32: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) der SATB2-Expressionsgruppen dargestellt in den Tumour Budding-Subgruppen Bd1 (A), Bd2 (B), Bd3 (C) (modifiziert nach [2]).	83
Abbildung 33: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) in den SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach Mikrosatelliten-stabilen (A) und Mikrosatelliten-instabilen Karzinomen (B) (modifiziert nach [2]).	84
Abbildung 34: Krankheitsspezifisches Überleben (DSS) der SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach Lokalisation der Karzinome im rechtsseitigen (A) oder linksseitigen Kolon (B) (modifiziert nach [2]).	85
Abbildung 35: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in der Gesamtkohorte unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, UICC-Stadium, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).	86
Abbildung 36: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in UICC III-Karzinomen unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, Tumour Budding, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).	87
Abbildung 37: Multivariate krankheitsspezifische Überlebenszeitanalyse (DSS) in Bd3-Karzinomen unter Einschluss der Parameter SATB2-Expression, KRK-Subtypen, UICC-Stadien, WHO-Grade, Alter, Geschlecht, Resektionsstatus und Mikrosatellitenstatus (modifiziert nach [2]).	87
Abbildung 38: Graphische Darstellung der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier der SATB2-Expressionsgruppen geschichtet nach CDX2-Expressionsgruppen jeweils für OS (A, B), DSS (C, D) und DFS (E, F) (modifiziert nach [2]).	90

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische TNM-Klassifikation Kolorektaler Karzinome (modifiziert nach [6]).	23
Tabelle 2: Stadieneinteilung Kolorektaler Karzinome nach Union For International Cancer Control (UICC) (modifiziert nach [6]).	24
Tabelle 3: Übersicht über wesentliche Charakteristika der Subtypen des Kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach [7, 9, 126-129]).	27
Tabelle 4: Einteilung zur Beurteilung des CDX2-Expressionsmusters kolorektaler Karzinome im TMA (modifiziert nach [1]).	42
Tabelle 5: Einteilung zur Beurteilung der CDX2-Färbeintensität kolorektaler Karzinomzellen im TMA (modifiziert nach [1]).	43
Tabelle 6: Einteilung zur Beurteilung der SATB2-Färbeintensität kolorektaler Karzinomzellen im TMA (modifiziert nach [2]).	45
Tabelle 7: Einteilung zur Beurteilung des SATB2-Expressionsmusters kolorektaler Karzinome im TMA (modifiziert nach [2]).	46
Tabelle 8: Verteilung und Prognosewert der wesentlichen klinisch-pathologischen Parameter einschließlich der Transkriptionsfaktoren SATB2 und CDX2 in der Gesamtkohorte (modifiziert nach [2]).	50
Tabelle 9: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsgruppe und Expressionsmuster (modifiziert nach [1]).	52
Tabelle 10: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsgruppe und Expressionsintensität (modifiziert nach [1]).	52
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen CDX2-Expressionsmuster und Expressionsintensität.	52
Tabelle 12: Verteilung der CDX2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte stratifiziert nach verschiedenen klinisch-pathologischen und morphologischen Parametern (in Spaltenprozent) (modifiziert nach [1]).	56
Tabelle 13: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression stratifiziert nach UICC-Stadien jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).	60
Tabelle 14: Univariate Analyse der CDX2-Expression in den einzelnen histologischen Subtypen des Kolorektalen Karzinoms jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).	61
Tabelle 15: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS in WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [1]).	61

Tabelle 16: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expression stratifiziert nach Tumour Budding-Aktivität jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [1]).	62
Tabelle 17: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen für jeweils MSS- und MSI-Karzinome des rechtsseitigen und linksseitigen Kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach [1]).	64
Tabelle 18: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsgruppe und Expressionsmuster (modifiziert nach [2]).	70
Tabelle 19: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsgruppe und Expressionsintensität (modifiziert nach [2]).	70
Tabelle 20: Zusammenhang zwischen SATB2-Expressionsmuster und Expressionsintensität.	70
Tabelle 21: Verteilung der SATB2-Expressionsgruppen in der Gesamtkohorte stratifiziert nach verschiedenen klinisch-pathologischen und morphologischen Parametern (in Spaltenprozent) (modifiziert nach [2]).	73
Tabelle 22: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expression stratifiziert nach UICC-Stadien jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	80
Tabelle 23: Univariate Analyse der SATB2-Expression in den einzelnen histologischen Subtypen des Kolorektalen Karzinoms jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	81
Tabelle 24: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS in WHO-Grading-Gruppen (modifiziert nach [2]).	81
Tabelle 25: Univariate Überlebensanalyse der SATB2-Expressionsgruppen in Tumour Budding-Subgruppen jeweils für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	83
Tabelle 26: Univariate Überlebensanalyse der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach Mikrosatellitenstatus für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	84
Tabelle 27: Korrelation der Expressionsmuster von SATB2 und CDX2 (modifiziert nach [2]).	89
Tabelle 28: Korrelation der Expressionsintensitäten von SATB2 und CDX2.	89
Tabelle 29: Korrelation der SATB2- und CDX2-Gruppen (modifiziert nach [2]).	89
Tabelle 30: Univariate Überlebenszeitanalyse der SATB2-Expressionsgruppen stratifiziert nach CDX2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]).	89

**Tabelle 31: Univariate Überlebenszeitanalyse der CDX2-Expressionsgruppen stratifiziert nach SATB2-Expressionsgruppen für die Parameter OS, DSS und DFS (modifiziert nach [2]). ..... 91**

## 10. Publikationsverzeichnis Maxime Schmitt

### Publikationen mit Erstautorenschaft:

**Schmitt M.\***, Silva M.\*, Konukiewitz B., Lang C., Steiger K., Halfter K., Engel J., Jank P., Pfarr N., Wilhelm D., Foersch S., Denkert C., Tschurtschenthaler M., Weichert W., Jesinghaus M. (2021)

*Loss of SATB2 Occurs More Frequently Than CDX2 Loss in Colorectal Carcinoma and Identifies Particularly Aggressive Cancers in High-Risk Subgroups*

in: **Cancers** (13)

10.3390/cancers13246177

**Impact Factor (2 Jahre): 6.575 [255]**

### Publikationen mit Co-Autorenschaft:

Jesinghaus M.\*, Boxberg M.\*, **Schmitt M.**, Kriegsmann M., Harms A., Lang C., Muley T., Winter H., Kriegsmann K., Warth A., Stenzinger A., Denkert C., Hoffmann H., Safi S., Weichert W. (2022)

*Cellular dissociation grading on biopsies of pulmonary squamous cell carcinoma provides prognostic information across all stages and is congruent with resection specimen grading.*

In: **The Journal of Pathology - Clinical Research** (8)

10.1002/cjp2.295

**Impact Factor (2 Jahre): 4.373 [255]**

Foersch S.\*, Lang-Schwarz C.\*, Eckstein M., Geppert C., **Schmitt M.**, Konukiewitz B., Groll T., Schicktanz F., Engel J., Gleitsmann M., Westhoff CC., Frickel N., Litmeyer AS., Grass A., Jank P., Lange S., Tschurtschenthaler M., Wilhelm D., Roth W., Vieth M., Denkert C., Nagtegaal I., Weichert W., Jesinghaus M. (2022)

*pT3 colorectal cancer revisited: a multicentric study on the histological depth of invasion in more than 1000 pT3 carcinomas-proposal for a new pT3a/pT3b subclassification*

in: **British Journal of Cancer** (127)

10.1038/s41416-022-01889-1

**Impact Factor (2 Jahre): 9.082 [255]**

Konukiewitz B., Kasajima A., **Schmitt M.**, Schwamborn K., Groll T., Schicktanz F., Delbridge C., Schütze L. M., Wilhelm D., Lang C., Lange S., Foersch S., Jank P., Steiger K., Werder A. v., Denkert C., Weichert W., Klöppel G., Jesinghaus M. (2021)

*Neuroendocrine Differentiation in Conventional Colorectal Adenocarcinomas: Incidental Finding or Prognostic Biomarker?*

in: **Cancers** (13)

10.3390/cancers13205111

**Impact Factor (2 Jahre): 6.575 [255]**

Konukiewitz B., **Schmitt M.**, Silva M., Pohl J., Lang C., Steiger K., Halfter K., Engel J., Schlitter A. M., Boxberg M., Pfarr N., Wilhelm D., Foersch S., Tschurtschenthaler M., Weichert W., Jesinghaus M. (2021)

*Loss of CDX2 in colorectal cancer is associated with histopathologic subtypes and microsatellite instability but is prognostically inferior to hematoxylin-eosin-based morphologic parameters from the WHO classification*

in: **British Journal of Cancer** (125)

10.1038/s41416-021-01553-0

**Impact Factor (2 Jahre): 9.082 [255]**

Jesinghaus M., **Schmitt M.**, Lang C., Reiser M., Scheiter A., Konukiewitz B., Steiger K., Silva M., Tschurtschenthaler M., Lange S., Foersch S., Becker K. F., Saur D., Friess H., Halfter K., Engel J., Boxberg M., Pfarr N., Wilhelm D., Weichert W. (2021)

*Morphology Matters: A Critical Reappraisal of the Clinical Relevance of Morphologic Criteria From the 2019 WHO Classification in a Large Colorectal Cancer Cohort Comprising 1004 Cases*

in: **The American Journal of Surgical Pathology** (45)

10.1097/PAS.0000000000001692

**Impact Factor (2 Jahre): 6.298 [255]**

\* geteilte Erstautorenschaft

## 11. Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank in besonderem Maß an meinen Betreuer Professor Dr. med. Moritz Jesinghaus, der mich nicht nur bei der Ausarbeitung dieser Arbeit und den assoziierten Studien auf hervorragende Weise unterstützte, sondern mich auch frühzeitig mit großem Engagement förderte, mich zur Weiterbildung im Fach Pathologie bewegt hat, mich für wissenschaftliche Fragestellungen begeistern kann, mich in ein wissenschaftliches Umfeld integriert und mir stets mit Rat und Tat bei zahlreichen wissenschaftlichen und fachbezogenen Fragen zur Seite steht.

Mein weiterer Dank gilt meinem Mentor Herrn Markus Tschurtschenthaler PhD, der diese Arbeit mitbetreute und mir ebenfalls stets unterstützend zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Wilko Weichert (†2023) für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Leitung am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologischen Anatomie der Technischen Universität München durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich für die stets gute Zusammenarbeit bei Herrn Miguel Silva und Frau Corinna Lang bedanken.

Ebenso gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologischen Anatomie der Technischen Universität München, die mich bei meinen Projekten unterstützt haben, insbesondere Professor Dr. med. Björn Konukiewitz, Dr. med. Atsuko Kasajima, Dr. med. vet. Katja Steiger, Nicole Pfarr Dipl.-Biol., Christian Beese, Christina Schott, Marion Mielke, Olga Seelbach sowie Simone Köppel.

Ferner möchte ich mich bei Dr. med. Sebastian Försch für die Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus richtet sich mein Dank an Professor Dr. med. Carsten Denkert und Herrn Paul Jank für die Unterstützung bei meinem Berufseinstieg, für das in mich gesetzte Vertrauen bei der weiteren wissenschaftlichen Zusammenarbeit und die Möglichkeit weiterhin wissenschaftlichen Fragestellungen nachgehen zu dürfen.

Mein spezieller Dank richtet sich an Dr. med. Maximilian E. Dämmrich, Dr. med. Bernd Blume, Professor Dr. med. Jobst Dämmrich und Dr. med. Bernhard Heine sowie allen Mitarbeitern der Gemeinschaftspraxis für Pathologie in Schweinfurt, die mich frühzeitig für das Fach Pathologie begeistern konnten und mir in diversen Praktika und Famulaturen Einblicke in ihr Fach gewährten.

Bei all meinen Freunden und Studienkollegen möchte ich mich für die Unterstützung, das Verständnis und den Rückhalt bedanken, die mir entgegengebracht wurden und mir in meinem Leben und ganz besonders während der Promotionsphase Halt gaben.

Letztlich gilt mein außerordentlicher Dank meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und immer fortwährende Motivation. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Harald und Simone Schmitt und meinen Großeltern Günter und Elfriede Helmschrod (†2022) sowie Meinhard und Paulina Schmitt bedanken, ohne die mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Im Gedenken an meine Großmutter Elfriede Helmschrod, die mich stets motivierte, mit großem Eifer den Fortschritt meines Studiums und dieser Arbeit verfolgte und leider nicht mehr den Abschluss erleben konnte, widme ich ihr diese Arbeit.