



Technische Universität München
TUM School of Medicine and Health

**Vergleichende Analyse der prognostischen Relevanz der
zentralen morphologischen Parameter der 5. Auflage der
WHO-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms**

Corinna Maria Lang

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

Vorsitz: Prof. Kathrin Schumann, Ph.D.

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Moritz Jesinghaus
2. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen

Die Dissertation wurde am 05.08.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 05.12.2024 angenommen.

„Die Gesundheit ist nicht alles, aber ohne Gesundheit ist alles nichts.“

Arthur Schopenhauer

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Zusammenfassung	9
3	Einleitung	10
3.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms.....	11
3.2	Ätiologie und genetische Veränderungen.....	13
3.3	Klinisches Bild und Diagnostik.....	14
3.4	Diagnostik des kolorektalen Karzinoms.....	15
3.5	TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	16
3.6	WHO-Klassifikation.....	19
3.6.1	WHO Grading	19
3.6.2	Tumor Budding.....	22
3.6.3	Histologische Subtypen des kolorektalen Karzinoms.....	25
3.7	Therapie des kolorektalen Karzinoms	34
3.8	Fragestellung der Arbeit	38
4	Material und Methoden	40
4.1	Erstellung der Kohorte.....	40
4.2	Erstellung eines Tissue Microarray der Kohorte.....	42
4.3	Histopathologische Analysen	43
4.3.1	Analyse des histopathologischen Subtyps kolorektaler Karzinome	44
4.3.2	Beurteilung der Tumor Budding Aktivität.....	44
4.3.3	Bestimmung des WHO Gradings	44
4.3.4	Analyse des Mikrosatellitenstatus	46
4.4	Statistische Methodik.....	48

5	Ergebnisse	49
5.1	Analyse der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte.....	49
5.1.1	Häufigkeit und Verteilung der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte	49
5.1.2	Prognostische Relevanz der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte	49
5.2	Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: Morphologische Subtypen des kolorektalen Karzinoms	52
5.2.1	Häufigkeit und Verteilung morphologischer KRK-Subtypen.....	52
5.2.2	Assoziation der histomorphologischen KRK Subtypen mit klinisch-pathologischen Parametern	55
5.2.3	Prognostische Relevanz histologischer KRK Subtypen in univariaten Überlebensanalysen	56
5.3	Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: WHO Grading	60
5.3.1	Häufigkeit und Verteilung von low- und high-grade Karzinomen	60
5.3.2	Assoziation des WHO Gradings mit klinisch-pathologischen Parametern	60
5.3.3	Prognostische Relevanz des WHO Gradings in univariaten Überlebensanalysen	60
5.4	Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: Tumor Budding	63
5.4.1	Häufigkeit und Verteilung der ITBCC-Subgruppen	63
5.4.2	Assoziation des Tumor Buddings gemäß ITBCC mit klinisch-pathologischen Parametern	63
5.4.3	Prognostische Relevanz des Tumor Buddings gemäß UICC in univariaten Überlebensanalysen	63
5.6	Interaktionen zwischen den histomorphologischen Subtypen des KRKs, der Tumor Budding Aktivität und dem WHO Grading.....	67
5.6.1	Häufigkeit und Verteilung der KRK Subtypen in Abhängigkeit der Tumor Budding Aktivität	67
5.6.2	Häufigkeit und Verteilung der KRK Subtypen in Abhängigkeit des WHO Gradings.....	67
5.6.3	Häufigkeit und Verteilung des Tumor Buddings und des WHO Gradings zueinander	68
5.6.4	Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen KRK Subtypen und Tumor Budding.	68
5.6.5	Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen KRK Subtypen und WHO Grading...	69
5.6.6	Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen Tumor Budding und WHO Grading..	69

5.7	Multivariate Analyse aller morphologischen Parameter	75
6	Diskussion	79
7	Abbildungsverzeichnis	88
8	Tabellenverzeichnis	91
9	Literaturverzeichnis	93
10	Lebenslauf.....	99
11	Veröffentlichungen.....	100
12	Danksagung	102
13	Eidesstaatliche Erklärung.....	104

1 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
a	Autopsie
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatöses Polyposis-Coli-Gen
ARID1a	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ATOH1	Atonal bHLH Transkriptionsfaktor 1
BAT	Mononucleotide-Repeat BAT (Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker)
BAX	Bcl-2-ähnliches Protein/ Bcl-2-associated X protein
Bd	Tumor Budding
BRAF	Proto-Onkogen B-Raf
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cCr	Klinische Komplettremission/ Clinical complete remission
CDX2	Caudal-related Homebox Transcription Factor 2
CIMP Pathway	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp
CIN Pathway	Chromosomale Instabilität
CK20	Zytokeratin 20
CpG	5'C-Phosphat-G-3'
KRK	Kolorektales Karzinom/ colorectal carcinoma
CT	Computertomografie
DFS	Krankheitsfreies Überleben/ Disease free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Krankheitsspezifisches Überleben/ Disease specific survival
EMA	Epithelmembran-Antigen
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
G	WHO Grading
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HR	Hazard Ratio

IGF2P	Insulinartiger Wachstumsfaktor 2/ Insulin-like growth factor 2
ITBCC	International Tumor Budding Consensus Conference
KI	Konfidenzintervall
KRAS	Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene
L	Lymphgefäßinvasion
Lk	Lymphknoten
LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom/ Large-cell neuroendocrine carcinoma
m	Multiple Primärtumore
MANEC	Gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MUC1	Mucin-1-Gen
MUC2	Mucin-2-Gen
MLH1	MutL-Protein homolog 1
(d)MMR	(deficient) Mismatch-Repair
MRI	Klinikum rechts der Isar, München
MRT	Magnetresonanztomografie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSH2	MutS-Homolog 2
MSH6	MutS-Homolog 6
MSS	Mikrosatellitenstabilität
mTOR	Mechanistisches Zielmolekül von Rapamycin/ Mechanistic Target of Rapamycin
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NET	Neuroendokriner Tumor
NOS	Nicht anderweitig spezifiziertes Adenokarzinom
OS	Gesamtüberleben/ Overall survival
p	P-Wert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PME	Partielle Mesorektumexzision
PMS	Postmeiotic Segregation increased 2
Pn	Perineuralscheideninvasion
R	Resektionsstatus
r	Rezidiv-Status

RF	Risikofaktor
SATB2	Special AT-rich Sequence-binding Protein 2
SCNEC	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom/ Small-cell neuroendocrine carcinoma
SE	Standardfehler/ standard error
SD	Standardabweichung
SMAD4	MAD-Homolog-4-Gen
SMARCB1	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4-gene
SPSS	Statistical Package für the Social Sciences
SSTR2A	Somatostatin-Rezeptor-2A-Gen
TB	Tumor Budding
Tis	Carcinoma in situ
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGF β -R2	Transforming Growth Factor β -Rezeptor 2
TMA	Tissue Microarray
TME	Totale Mesorektumexzision
(p)TNM	(pathologische) Tumor-Nodus-Metastasen
TNT	Totale neoadjuvante Therapie
TP53	Tumor Protein p53-Gen
TTF1	Thyreoidale Transkriptionsfaktor 1
TUM	Technische Universität München
UICC	Union For International Cancer Control
V	Venöse Gefäßinvasion
WHO	World Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wachstumsfaktor Wnt, Wingless-/Int-1-Gen
W&W	Beobachtendes Abwarten/ Watch and Wait
y	Zustand nach neoadjuvanter Therapie

Gender Erklärung

Für die folgenden formulierten Texte wird ausdrücklich eine männliche Schreibweise verwendet. Dadurch sollen eine bessere sprachliche Lesbarkeit und ein höheres Textverständnis gewahrt werden. Sämtliche Personen und Bezeichnungen beziehen sich dabei gleichermaßen auf alle Geschlechter.

2 Zusammenfassung

In der 2019 erschienen fünften Auflage der WHO-Klassifikation der kolorektalen Karzinome wurden neben der Reklassifikation der histologischen Subtypen des kolorektalen Karzinoms (KRK) sowohl der zelluläre Dissoziationsparameter Tumor Budding zu den essenziellen Diagnosekriterien hinzugefügt als auch das konventionelle WHO Grading-System vom klassischen dreistufigen (G1-G3) in ein zweistufiges System (low- vs. high-grade) umgestellt. Die Interaktion dieser histologischen Parameter untereinander und ob diese als unabhängige Faktoren einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben, ist bis dato noch weitgehend unerforscht.

Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation von 2019 haben wir eine großangelegte Single-Center Kohorte von 1004 KRK bezüglich des WHO Gradings, der Tumor Budding Aktivität und des histologischen Subtyps reklassifiziert. Wir untersuchten die Interaktion dieser Parameter, ihren Zusammenhang zum Tumorstadium und ihre Signifikanz für das Patientenüberleben.

In univariaten Analysen (Log Rank Test) waren alle drei Parameter prognostisch relevant ($p < 0.001$), wobei die KRK Subtypen und das Tumor Budding auch hier schon eine bessere prognostische Demarkation als das klassische WHO Grading erlaubten. In multivariaten Analysen (Cox Regression) unter Einbeziehung aller Parameter konnten die KRK Subtypen (Krankheitsspezifisches Überleben (DSS), **Tabelle 17**: $p < 0.001$; Gesamtüberleben (OS), **Tabelle 18**: $p = 0.008$) und das Tumor Budding (DSS, **Tabelle 17**: $p < 0.001$; OS, **Tabelle 18**: $p < 0.001$), aber nicht das klassische WHO Grading (DSS, **Tabelle 17**: $p = 0.33$; OS, **Tabelle 18**: $p = 0.03$), als stadienunabhängige Prognoseparameter in allen Überlebensanalysen beschrieben werden. Die KRK Subtypen und das Tumor Budding konnten gegenseitig und innerhalb des WHO Gradings prognostische Vorhersagen tätigen wohingegen umgekehrt das WHO Grading innerhalb dieser beiden Parameter prognostisch nur eine geringe oder keine Relevanz zeigte.

Unsere Analyse der zentralen morphologischen Parameter gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms stellte somit zu einem die KRK Subtypisierung als starken stadienunabhängigen Prognoseparameter in den Vordergrund und identifizierte zum anderen insbesondere das Tumor Budding als stärksten histomorphologischen Prognosefaktor, das dem konventionellen WHO-Grading-System überlegen ist.

Die Ergebnisse unserer Studie wurden bereits 2021 vor der Einreichung dieser Dissertation von uns in dem Artikel „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 der Zeitschrift „American Journal of Surgical Pathology – Volume 45“ auf den Seiten 969-978 veröffentlicht.

3 Einleitung

Der Terminus kolorektales Karzinom (KRK) beschreibt maligne epitheliale Neoplasien, die von der Schleimhaut des Kolons oder des Rektums ausgehen, und stellt aus Sicht des Pathologen einen Oberbegriff dar, unter dem neben dem klassischen Adenokarzinom vom nicht anderweitig spezifizierten Typ (Adenokarzinom NOS) zahlreiche morphologische Subtypen subsummiert sind. Diese sowie weitere essenzielle histomorphologischen Parameter werden nach den bindenden Maßgaben der WHO-Klassifikation definiert.⁵

In der neusten Auflage der WHO-Klassifikation maligner Tumoren des Gastrointestinaltrakts wurden im Kapitel bezüglich des kolorektalen Karzinoms die Klassifikation der verschiedenen histologischen Subtypen überarbeitet, das ursprünglich dreistufige WHO Grading in ein zweistufiges Gradingssystem umgewandelt und der zelluläre Dissoziationsparameter Tumor Budding als ein weiteres zentrales histopathologisches Klassifikationskriterium eingeführt.⁶

Da die WHO-Klassifikation die bindenden Kriterien für die histopathologische Diagnostik vorgibt, war das Ziel dieser Promotionsarbeit, diese in der aktuellen WHO-Klassifikation teils neu eingeführten (Tumor Budding) beziehungsweise substanziell überarbeiteten histologischen Kriterien (WHO Grading / Histologische Subtypen) in einem großen Kollektiv kolorektaler Karzinome bezüglich Ihrer Frequenz und Ihrer Interaktion miteinander genauer zu charakterisieren. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Untersuchung der vergleichenden prognostischen Relevanz dieser drei zentralen Vorhersageparameter, mit speziellem Augenmerk auf deren Bedeutsamkeit in spezifischen klinisch-pathologischen Subgruppen und in multivariaten Analysen unter Einbeziehung weiterer Faktoren wie beispielsweise des postoperativen Tumorstadiums. Um herauszuarbeiten, welche dieser Parameter insgesamt die präziseste prognostische Demarkation erlaubt, untersuchten wir die oben genannten Parameter in einer beträchtlichen retrospektiven Kohorte von 1004 resezierten kolorektalen Karzinomen und assoziierten die Daten unserer histopathologischen Reevaluation mit klinisch-pathologischen Charakteristika und dem Krankheitsverlauf.

Unsere Analysen zeigen, dass alle drei zentralen morphologischen Parameter der WHO-Klassifikation grundlegend prognostisch relevant sind, wobei insbesondere dem Zell-Dissoziationsparameter Tumor Budding sowie der korrekten Identifikation der verschiedenen histologischen Subtypen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Das klassische WHO Grading, das momentan noch den am weitesten verbreiteten morphologischen Parameter darstellt, zeigt sich in unseren Analysen als deutlich störanfälliger Parameter, der insbesondere in spezifischen Subgruppen prognostisch dem Tumor Budding als auch der Subtypisierung unterlegen ist. ⁴

3.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Im Jahr 2016 haben etwa 32.300 Männer und 25.990 Frauen in Deutschland die Diagnose eines KRKs erhalten, wobei das KRK bei Männern die insgesamt dritthäufigste auftretende und am zweithäufigste zum Tode führende Karzinomneuerkrankung war. Ähnlich verhielt es sich auch bei den Frauen, bei denen das KRK in beiden Kategorien den zweiten Platz belegte.⁷ Eine genauere Übersicht der Karzinomneuerkrankungen in Deutschland aufgeteilt nach Geschlecht im Jahr 2016 zeigt **Abbildung 1**.

Das Lebenszeitrisiko an einem KRK zu erkranken, betrug im Jahr 2016 für Frauen 4,9% und für Männer 6,0% und das Mortalitätsrisiko bei Frauen 2,3% und bei Männern 2,8%, wobei im internationalen Vergleich Deutschland bezüglich der Inzidenz bei Frauen auf Platz 8 und bei Männern auf Platz 6 lag ⁷. Insgesamt variiert die Inzidenz des KRKs weltweit, mit höheren Inzidenzen in hochentwickelten Industriestaaten ⁸, wobei das KRK mit einem Erkrankungsgipfel von 76 Jahren bei Frauen und 72 Jahren bei Männern international als eine Erkrankung des höheren Lebensalters gesehen wird. ⁷

Seit 2004 kann eine Abnahme der KRK-Neuerkrankungen in der deutschen Bevölkerung beobachtet werden, die auf ein effektives Frühscreening und einen vermehrten Einsatz der Koloskopie bei enteralen Beschwerden zurückzuführen ist ³. Trotz eines Rückgangs der Inzidenzrate des KRKs bei beiden Geschlechtern ³, erkranken gleichzeitig immer mehr junge Menschen unter 50 Jahren an KRK ⁹.

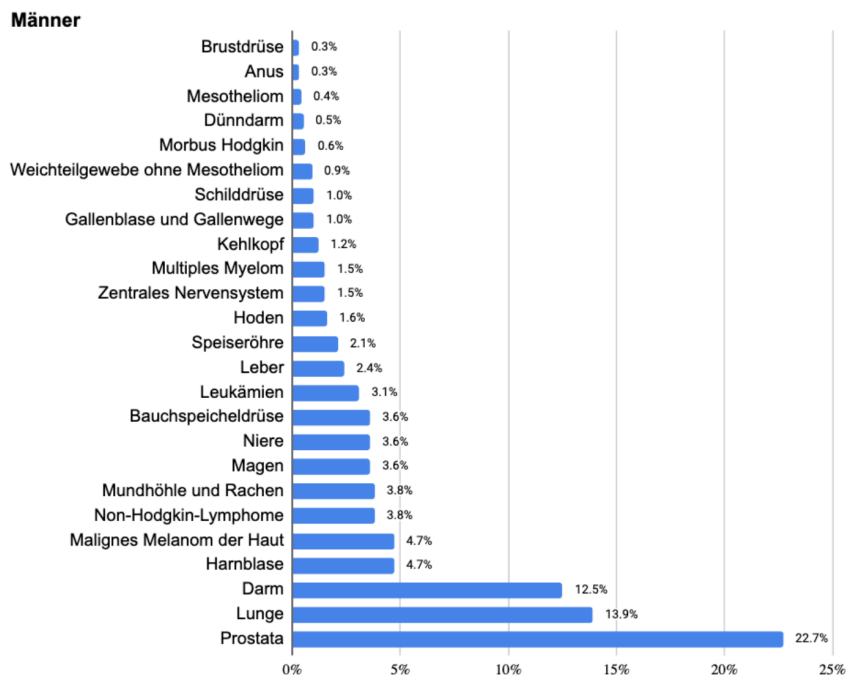
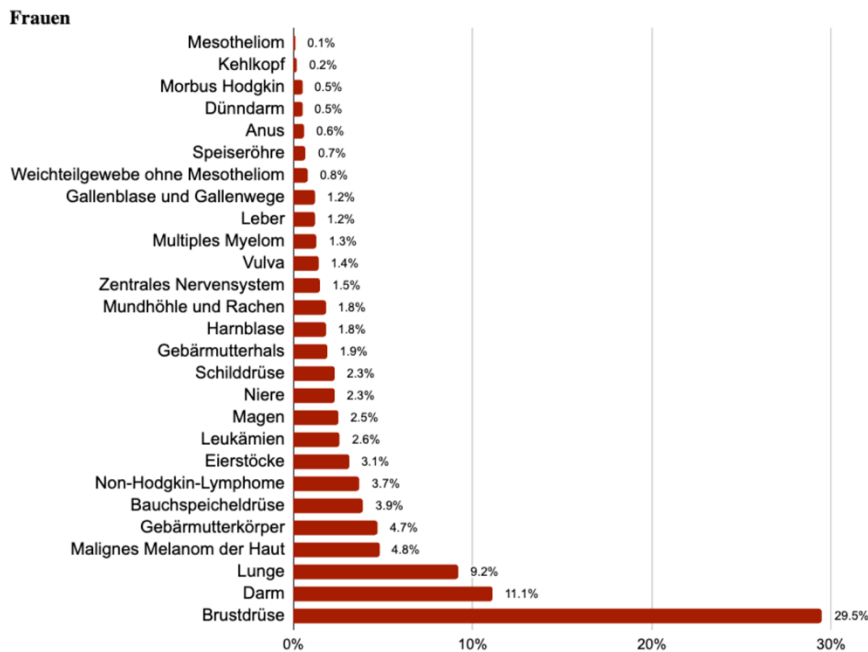


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Lokalisationen an allen Karzinomneuerkrankungen in Deutschland 2016 aufgeteilt nach Frauen und Männern.³

3.2 Ätiologie und genetische Veränderungen

Das KRK ist eine multifaktorielle und heterogene Erkrankung, wobei circa 75% der KRK sporadisch entstehen, rund 20% der Betroffenen über eine familiäre Belastung berichten und 3-5% der KRK über das Vorkommen einer vererbten Keimbahnmutation wie z.B. bei dem Lynch-Syndrom oder der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) begründet werden ¹⁰.

Das klassische Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt einen mehrstufigen Prozess der Karzinogenese. Der Grad der histopathologisch zu beobachtenden Veränderungen korreliert stark mit den auftretenden molekularen Veränderungen, wobei mehrere molekulare Signalwege mit drei zentralen Mechanismen der genetischen Instabilität beschrieben worden sind. ⁵

Der Weg der chromosomalen Instabilität (CIN Pathway), auch als der konventionelle Karzinogeneseweg bezeichnet, beschreibt eine Akkumulation genetischer Veränderungen, die bedingt durch ihre Summe eine reguläre Mukosa über verschiedene Adenom-Stadien bis hin zu einem Karzinom modifizieren. Der CIN Pathway beginnt mit der primären bi-allelischen Mutation innerhalb des Wnt-Signalweges, klassischerweise des Adenomatösen Polyposis Coli (APC) Tumor Supressorgens, wodurch die Regulation des proteosomalen Abbaus des Beta-Catenins gestört wird und es zu einer Anreicherung des Beta-Catenins innerhalb der normalen kolorektalen Mukosa kommt. Bedingt dadurch kommt es zu einer Fehlregulation der Zellproliferation, des Zellzyklus und der Apoptose und somit insgesamt zu einer chromosomalen Instabilität der Zellen. ¹¹ Durch weitere Mutationen innerhalb der Onkogene KRAS, NRAS und der Tumorsuppressorgene SMAD2/4 und TP53 progressiert sich das tubuläre oder villöse frühe Adenom allmählich, über einen unkontrollierten Wachstum der Zellen, zu einem Adenokarzinom ¹⁰.

Als zweiter Punkt ist der Mikrosatelliteninstabile-Karzinogeneseweg zu nennen, der entweder durch somatische Mutationen, Keimbahnmutationen oder DNA-CpG-Insel-Hypermethylierungen (CIMP Pathway) charakterisiert und insgesamt für circa 15% bis 30% aller kolorektaler Karzinome ursächlich ist ¹². Der Weg der Mikrosatelliteninstabilität ist durch Veränderungen innerhalb der Gene, die für eine fehlerfreie DNA-Mismatch-Reperatur (MMR) verantwortlich sind, charakterisiert. Während der DNA-Replikation sind insbesondere die repetitiven Sequenzen (Mikrosatelliten, Short-Tandem-Repeats) im Genom für Basenfehlpaarungen anfällig, sodass bei einer vorliegenden MMR-Defizienz (dMMR), es zu einer Akkumulation von Defekten innerhalb der Mikrosatelliten kommt. Als betroffene, relevante MMR-Proteine sind hierbei insbesondere MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 zu

nennen. In 80% der mikrosatelliteninstabilen KRK bestehen initiale epigenetische Veränderungen in Form von Hypermethylierungen des Gens MLH1.^{10,13} Neben der sporadisch auftretenden MSI (3-15%) sind auch Keimbahnmutationen wie zum Beispiel das Lynch-Syndrom/HNPCC (hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis) (1-3%) beschrieben^{5,10}.

Als dritter Mechanismus der genetischen Instabilität wird ein Defekt der Korrekturlesefunktion der DNA-Polymerase oder in seltenen Fällen des DNA-Replikations-Enzymkomplexes und damit eine einhergehende hohe Mutationsrate innerhalb der Gene beschrieben. Hierbei entstehen meistens Passanger-Mutationen, die selten einen kausalen Zusammenhang zu Wachstum und Proliferation aufweisen, sowie wenige Driver-Mutationen, die jedoch durch ihre entscheidende Stellung innerhalb des Signaltransduktionsweges der Zelle einen Wachstumsvorteil schaffen und somit die Proliferation einer Tumorzelle begünstigen.⁵

Neben diesen drei eben beschriebenen Karzinogenesewegen existieren noch zahlreiche weitere Mischformen¹.

Ätiologisch gelten Lifestyle-Faktoren wie Ernährung (rotes Fleisch, tierische Fette, hoher Zuckergehalt und ballaststoffarme Lebensmittel), Bewegungsarmut, Adipositas und ein hoher Alkohol- und Zigarettenkonsum ebenfalls als Risikofaktoren für die Entwicklung eines KRKs^{7,14}. Zudem werden in den letzten Jahren vermehrt Einflüsse des individuellen Mikrobioms auf die kolorektale Karzinogenese diskutiert^{8,14}.

3.3 Klinisches Bild und Diagnostik

Das klinische Bild eines KRKs wird durch allgemeine und lokale Symptome bestimmt, wobei diese gewöhnlich erst in einem fortgeschrittenen Stadium bestehen und charakteristische Frühsymptome eines KRKs fehlen. Am häufigsten wird ein KRK im linken Kolon sowie im Rektum diagnostiziert, wobei ein Auftreten im gesamten kolorektalen System inklusive der Appendix möglich ist.¹

Zu den allgemeinen Symptomen zählen unter anderem ungewollter Gewichtsverlust, Anorexie, Körperschwäche, Symptome einer Anämie durch okkulten Blutverlust und paraneoplastische Symptome. Änderungen der Stuhlgewohnheit, Dyschezie, Schmerzen, Bauchkrämpfe, Ileus und rektale Blutungen werden den lokalen Symptomen zugeordnet.¹⁵ Bei einer Metastasierung des KRKs kommen je nach Ort der Metastasierung weitere klinische Symptome hinzu.

Das Staging beim KRK umfasst eine digitale rektale Untersuchung zur Überprüfung der Sphinkterfunktion gefolgt von einer kompletten Koloskopie mitsamt einer Biopsie aus allen auffälligen Darmabschnitten. Die präoperative Ausbreitungsdiagnostik umfasst bei gesicherter Diagnose des Weitem eine Abdomensonographie zum Ausschluss von Lebermetastasen, eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen zum Ausschluss von Lungenmetastasen und einer Bestimmung des prognostischen Tumormarkers Karzinoembryonales Antigen (CEA). Sollte ein Rektumkarzinom vorliegen wird das Staging um eine starre Rektoskopie zur Angabe des Abstands des distalen Tumorrandes von der Linea dentata, ein MRT oder CT des Beckens mit Bestimmung des Abstands des Tumors zur mesorektalen Faszie und bei lokal begrenzten Tumoren um eine rektale Endosonographie erweitert. ¹

3.4 Diagnostik des kolorektalen Karzinoms

Die mikroskopische Untersuchung von Gewebeproben durch den Pathologen spielt in der Behandlung einer Tumorerkrankung zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine zentrale Rolle. Eine vollständige Koloskopie zur Detektion kolorektaler Polypen und Karzinomen gilt als Standardverfahren, wobei die Möglichkeit für eine Biopsieentnahme zur histologischen Diagnostik als auch eine Polypektomie als zeitgleiche therapeutische Intervention während der Koloskopie zur Verfügung stehen.

Prätherapeutisch wird zur Sicherung einer Verdachtsdiagnose anhand einer endoskopischen Biopsie eine histologische Diagnose angestrebt, wobei je nach Dignität über das weitere therapeutische Vorgehen entschieden wird: Ergibt die Untersuchung atypische epitheliale Veränderungen, die ein in die Submukosa infiltrierendes Wachstum (pT1 oder höheres Stadium) aufweisen, erfolgt die Einordnung als Karzinom. Anschließend wird das Karzinom einem UICC-Stadium zugeordnet und in Abhängigkeit von der Lokalisation des Karzinoms fällt die Entscheidung für oder gegen einen primären operativen Eingriff sowie über die Sinnhaftigkeit einer Radiochemotherapie. ¹⁶

Zur postoperativen Tumordiagnostik an resezierten KRK wird zum einen die exakte Tumorausdehnung anhand der TNM-Klassifikation bestimmt, welche von einer genauen Tumortypisierung gemäß aktueller WHO-Klassifikation begleitet wird. Insgesamt stellt dies die Entscheidungsgrundlage zur Indikation einer adjuvanten Therapie. Hierbei steht insbesondere die Bestimmung des pN-Status im Vordergrund, die anhand 12 oder mehr resezierter regionaler Lymphknoten erfolgt. Liegt eine R0-Resektion des Primärtumors vor wird bei Patienten mit einem Kolonkarzinom des UICC-Stadiums II mit Risikofaktoren und III eine

adjuvante Therapie eingeleitet. Eine adjuvante Therapie erfolgt analog auch bei primären R0-Resektionen des Rektumkarzinoms in UICC-Stadien II und III, die keine neoadjuvante Radiochemotherapie erhalten haben.¹⁶ Details zu den jeweiligen Therapieschemata werden im **Kapitel 3.7** ausführlicher behandelt.

Die Befunde aus den unterschiedlichen histologischen Untersuchungen komplementieren sich und werden gemeinsam in einem postoperativen pathologischen Befund aufgeführt. Eine ärztlich beaufsichtigte Nachsorge sollte unabhängig vom Tumorstadium stattfinden, da selbst nach kurativer Therapie innerhalb von 5 Jahren ein erhöhtes Rezidivrisiko besteht¹⁶.

3.5 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Die Klassifikation der anatomischen Tumorausdehnung erfolgt anhand der TNM-Kriterien, wobei T (Tumor) die Tiefeninvasion des Primärtumors angibt, N (Nodus) das Fehlen oder Vorhandensein sowie die Anzahl betroffener regionärer Lymphknoten (zur Beurteilung eines KRKs wird eine Untersuchung von mindestens 12 Lymphknoten benötigt) und der Wert M (Metastasen) für das Fehlen oder Vorliegen von Fernmetastasen¹⁷.

Die Kombinationen der drei TNM-Kriterien werden von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in Stadien zusammengefasst und als international anerkanntes Tumorstadien-System zur Prognoseabschätzung in klinischen Settings, zur jeweiligen Therapiewahl, für epidemiologische Studien und zur Datensammlung der Krebsregister weltweit genutzt¹. Eine detaillierte Tumor-Stadieneinteilung für das KRK ist der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Präfixe vor dem TNM-System spezifizieren das Setting, in dem der Tumor diagnostiziert worden ist. Der Terminus für eine histopathologisch gesicherte Ausbreitungsdiagnostik lautet *pTNM* (pathologische Klassifikation). Erfolgte das Staging nach einer neoadjuvanten Therapie, wie zum Beispiel einer Radiochemotherapie, so wird zusätzlich der Präfix *y* (Zustand nach Therapie) verwendet. Bezieht sich die Diagnostik auf ein Lokalrezidiv stellt man ein *r* als Präfix voran und bei Autopsien ein *a*. Als weitere Symbole werden unter anderem *c* (klinisches Stadium) und *u* (Ultraschalldiagnostik) eingesetzt. Kombinationen aus unterschiedlichen Präfixen vor dem TNM-System werden zur genaueren Beschreibung des diagnostischen Settings verwendet.⁵

Eine Erweiterung der TNM-Klassifikation erfolgt durch die Angabe einer Lymphgefäßinvasion im regionalen Tumorgewebe (Tumorzellen in den Lymphbahnen (L1) oder nicht vorhanden (L0)), einer Veneninvasion (Tumorzellen in der Gefäßwand mikroskopisch sichtbar (V1),

makroskopisch sichtbar (V2) oder nicht vorhanden (V0)) und einer perineuralen Invasion (Tumorzellen in den Perineuralscheiden (Pn1) oder nicht vorhanden (Pn0))^{17,18}. Zusätzlich wird nach einer Operation der Resektionsstatus dokumentiert, wobei zwischen vollständiger Entfernung des Karzinoms (R0), mikroskopisch sichtbaren Tumorresten am Resektionsrand (R1) und makroskopisch sichtbaren Tumorresten am Resektionsrand (R2) unterschieden wird^{1,2}.

Basierend auf der Einteilung anhand der TNM-Klassifikation wird über das weitere Therapieschehen entschieden. Während bei Patienten mit einem kurativ resezierten KRK im Stadium I keine adjuvante Therapie indiziert ist, kann für Patienten im Stadium II mit histopathologischen Risikofaktoren, die unter anderem separat im **Kapitel 3.7** besprochen werden, bereits eine adjuvante Therapie in Betracht gezogen werden. Die TNM-Klassifikation ist somit nicht nur das weltweit am häufigsten verwendete System, sondern stellt einen der wichtigsten prognostischen Faktoren dar.^{16,17}

Tabelle 1: Die Klassifikation der Tumorstadien der Kolonkarzinome erfolgt anhand der TNM-Kriterien von denen sich die UICC-Stadien ableiten lassen; LK – Lymphknoten. (modifiziert nach ¹⁷)

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1, T2	N1a (1 betroffener LK)	M0
	T1	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
IIIB	T1, T2	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T2, T3	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T3, T4a	N1 (1-3 betroffene LK)	M0
IIIC	T3, T4a	N2b (≥ 7 betroffene LK)	M0
	T4a	N2a (4-6 betroffene LK)	M0
	T4b	N1, N2	M0
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a (Fernmetastasen in einem Organ oder einer Lokalisation ohne Peritonealbefall)
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b (Fernmetastasen in zwei oder mehr Organen oder Lokalisationen ohne Peritonealbefall)
IVC	Jedes T	Jedes N	M1c (Peritonealbefall mit oder ohne Fernmetastasen in anderen Organen oder Lokalisationen)

3.6 WHO-Klassifikation

Die WHO-Klassifikation maligner Tumoren stellt organübergreifend das diagnostische Grundgerüst für Pathologen weltweit dar. Durch die Vorgabe bindender diagnostischer Kriterien, welche anhand der neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse laufend aktualisiert werden, stellt sie die Basis der modernen morphomolekularen Diagnostik der heutigen Pathologie. Diese kann somit weltweit nach uniformen, diagnostischen Kriterien ablaufen. Nachdem im Jahr 2010 der vierte Teil für die gastrointestinalen Tumoren erschienen war, wurde im Jahr 2019 die fünfte Auflage der WHO-Klassifikation mit dem Titel „WHO classification of Tumours: Digestive System Tumours, 5th edition“ veröffentlicht⁵.

In dieser fünften Auflage der WHO-Klassifikation wurden im Vergleich zu der Voraufgabe aus dem Jahr 2010 zentrale morphologische Parameter des kolorektalen Karzinoms tiefgreifend überarbeitet. Das klassische WHO Grading, der klinisch gebräuchlichste histopathologische Parameter, wurde systematisch grundlegend umgestellt, zudem wurden Nomenklatur und diagnostische Kriterien der histologischen Varianten/Subtypen des kolorektalen Karzinoms revidiert. Aufgrund von zahlreichen Studien, die eine sehr hohe prognostische Relevanz bescheinigten, wurde zudem der zelluläre Dissoziationsparameter Tumor Budding als weiteres essenzielles morphologisches Kriterium zusätzlich in die fünfte Version der WHO-Klassifikation kolorektaler Karzinome inkludiert.⁵ Die einzelnen Parameter werden in den folgenden Abschnitten detaillierter vorgestellt.

3.6.1 WHO Grading

Das Grading (Englisch: Abstufung) von Adenokarzinomen beurteilt anhand der histologischen Beschaffenheit zunächst grundlegend, inwieweit eine Neoplasie in ihrer Morphologie von ihrem Ausgangsgewebe abweicht. Anhand der morphologischen Eigenschaften werden dann mittels entitätsspezifischer Parameter verschiedene Tumorgrade gebildet (klassisch dreistufiges System: G1 = gut differenziert (hohe Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe), G2 = mäßig differenziert (mäßige Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe) bis G3 = gering differenziert (wenig/keine Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe) anhand derer sich im Idealfall prognostische Aussagen über das biologische Verhalten eines Tumors ableiten lassen.⁵

Hier ist prinzipiell die Annahme, dass gut differenzierte Karzinome eine eher günstige Prognose aufweisen, während gering differenzierte Karzinome als prognostisch ungünstig anzusehen sind. Die Graduierungssysteme bzw. die zugrundeliegenden Kriterien für das Tumor Grading von Karzinomen sind je nach Lokalisation des Primärtumors (und nach Tumortyp)

höchst variabel. Während beispielsweise das klinisch hochgradig relevante und ausnahmsweise 5-stufige Gleason-Grading bei Prostatakarzinomen durch die Drüsenarchitektur diktiert wird, ist das Elston-Ellis-Grading bei Mammakarzinomen ein multiparametrisches Scoring-System, das neben der Drüsenausbildung, weitere Faktoren wie die mitotische Aktivität und die Kernpleomorphie berücksichtigt und diese in einen Summenscore inkorporiert, der sich in ein Grading-System von G1-G3 aufschlüsselt.¹⁵

Die klinisch-pathologisch jeweils gültigen Grading-Systeme, welche dann auch in histopathologischen Befunden angegeben werden müssen, werden jeweils von den Expertengremien als bindende Kriterien für die WHO-Klassifikationen der jeweiligen Organsysteme festgelegt. Das laut WHO definierte Grading kolorektaler Karzinome wird traditionell lediglich anhand der Drüsenausbildung festgelegt, wobei eine hohe Ausbildung von Drüsenstrukturen ein Ausdruck hoher Tumordifferenzierung darstellt.

In der neusten WHO-Klassifikation von 2019 (5te Edition) wurde das konventionelle WHO Grading Schema kolorektaler Karzinome von den jahrzehntelang etablierten dreistufigen System (G1-G3) auf ein zweistufiges System (low- vs. high-grade) geändert, wobei die früher als gut (G1: >95% Drüsenausbildung) und moderat (G2: >50-95% Drüsenausbildung) differenzierten Karzinome nun zusammengefasst als low-grade und die früher gering (G3: <50% Drüsenausbildung) differenzierten Karzinome als high-grade KRK bezeichnet werden (siehe **Abbildung 2**). Da die meisten Karzinome eine heterogene Morphologie aufweisen, wird das Grading anhand der am wenigsten differenzierten Komponenten festgelegt, wobei die Invasionsfront zur Beurteilung als suboptimal gilt.⁵

Traditionell wird das Tumor Grading in den klinischen Entscheidungsprozess, welche Behandlung der Patient mit einem KRK erhalten soll, mit einbezogen. Jedoch ist das lediglich auf Drüsenbildung basierende WHO Grading in seiner Anwendbarkeit limitiert, da seine Relevanz, bezogen auf die diversen histologischen KRK-Sondervarianten oder MSI-H Karzinome, bis dato nicht sicher belegt ist.^{19,20}

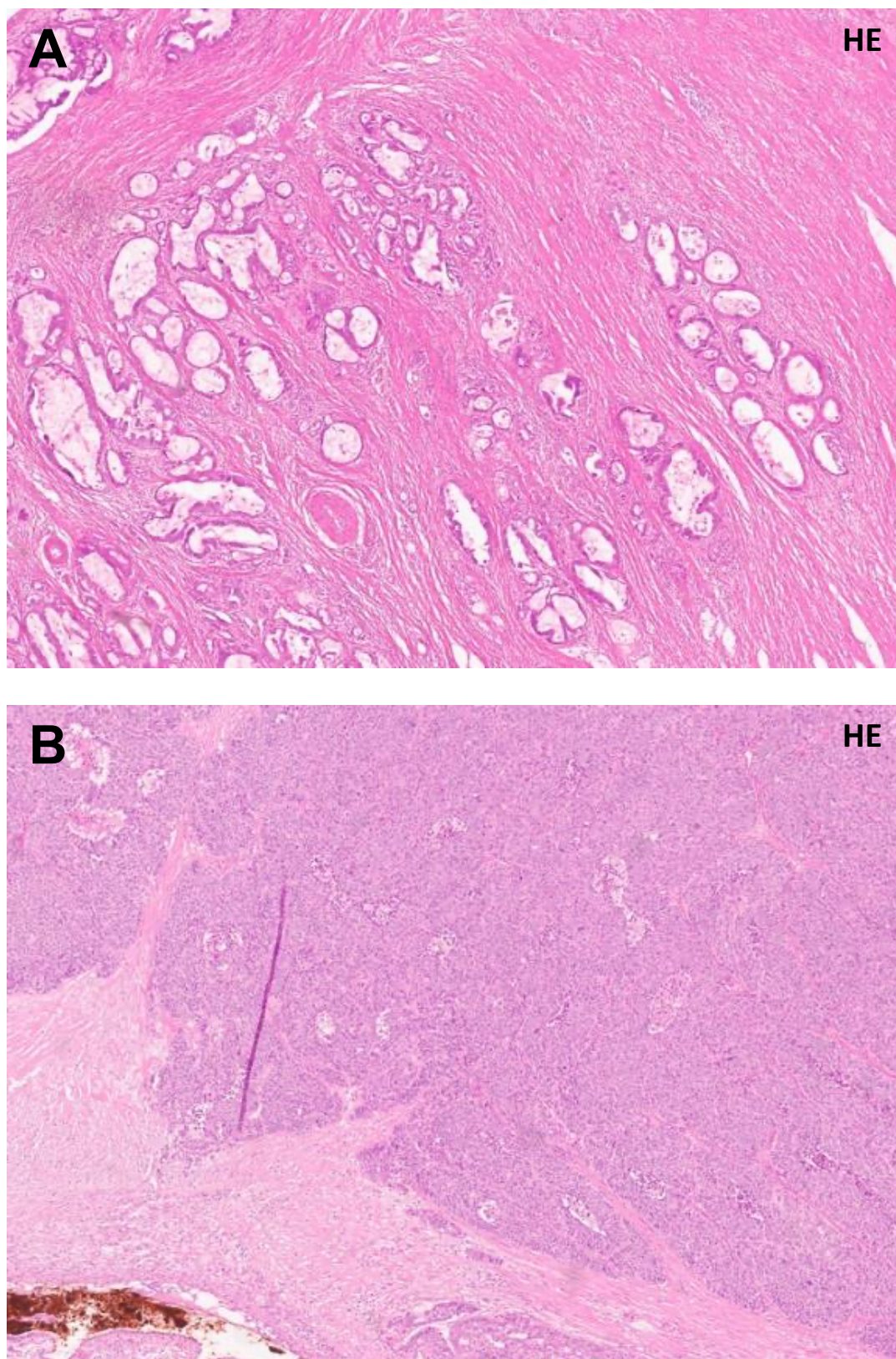


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahmen zweier verschiedener Resektate von Adenokarzinomen des kolorektalen Systems in HE-Färbung mit jeweils unterschiedlich starker Ausprägung der Drüsendifferenzierung nach der neuen WHO Grading-Klassifikation: WHO-Grading low-grade (A) und high-grade (B).

3.6.2 Tumor Budding

Unter Tumor Budding versteht man das Vorhandensein kleiner Tumorzellgruppen von weniger als fünf Zellen sowie isolierte Tumoreinzelnzellen (Tumor Buds), die eingebettet in ein desmoplastisches Tumorstroma das umgebende Parenchym infiltrieren beziehungsweise destruieren²¹.

Während Malignome ohne Tumor Budding Aktivität das umgebende Gewebe lokalisiert in großen Verbänden mit sogenannter „Pushing Border“ infiltrieren, zeigen Neoplasien mit verstärktem Tumor Budding eine dezentral-dissoziative Gewebeeinfiltration mit verstärkter perineuraler und angiolymphatischer Invasion²⁰. Tumor Buds können zentral innerhalb einer Neoplasie oder an der invasiven Front zu finden sein⁵.

Das Phänomen Tumor Budding wurde bis dato in zahlreichen malignen Tumorentitäten und insbesondere in diversen Karzinomentitäten (z.B. Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, Zervixkarzinom, Kopf-Hals-Karzinome) beschrieben und in zahlreichen Studien mit einem schlechten Patientenüberleben und adversen klinisch-pathologischen Parametern (z.B. höheres pTNM Stadium, Lymph-/ Blutgefäßinvasion) assoziiert, wobei die Tumor Budding Aktivität sowohl an Operationspräparaten als auch in prätherapeutischen Biopsien erhoben werden kann²²⁻²⁶.

Bezüglich der molekularbiologischen Grundlagen des Tumor Buddings kamen mehrere Studien zu der Annahme, dass das Tumor Budding das morphologische Korrelat des Konzepts der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) darstellt. Tumor Buds können laut dieser Aussage somit mesenchymale Zelleigenschaften annehmen und dadurch bedingt ihre Zellpolarität oder auch ihre Zell-Zell Kontakte verlieren, was sie zu ihrem dissoziierten Wachstum befähigt.²⁷ Die Grundlage für diese These bilden Ergebnisse verschiedener Studien, die zeigen konnten, dass Tumor Buds ihre ursprünglichen epithelialen Biomarker mit mesenchymalen Biomarkern ersetzen²⁸.

Die Kriterien für die Bezeichnung von Tumorzellgruppen kleiner 5 Zellen als Tumor Buds ist einheitlich in der Literatur und in allen Organsystemen, beziehungsweise Tumorentitäten, akzeptiert, allerdings bestehen zwischen den zahlreichen Studien und diversen Entitäten deutliche Unterschiede, wie das Ausmaß der Tumor Budding Aktivität angegeben und in welchen Bereichen eines Karzinoms die Tumor Budding Aktivität analysiert werden soll

^{23,26,27,29,30}

Nach Erscheinen zahlreicher Studien zur prognostischen Bedeutung des Tumor Buddings im KRK, die generell stets eine deutlich schlechtere Prognose für Karzinome mit erhöhtem Budding postulierten, bei denen allerdings teils deutlich divergente Kriterien zur Erhebung des Tumor Budding Status verwendet wurden^{29,31,32}, wurde zur Vereinheitlichung der Kriterien und zur besseren Reproduzierbarkeit in klinischen Studien im Rahmen der Internationalen Tumor Budding Konferenz im Jahre 2016, von einem Expertengremium für kolorektale Karzinome, folgender Konsens erzielt: Bei kolorektalen Karzinomen wird Tumor Budding, also per definitionem isolierte Tumoreinzellen oder kleine Tumorzellgruppen mit weniger als fünf Zellen, an der Invasionsfront eines KRKs mittels eines repräsentativen Schnittes in HE-Färbung analysiert³⁰. Zuerst wird in der Übersichtsvergrößerung die gesamte Invasionsfront des Karzinoms untersucht und hierbei das Areal identifiziert, das in der Übersicht die größte Tumor Budding Aktivität zeigt. Nachfolgend wird dann standardisiert in einer 20-fachen Vergrößerung die Anzahl der Tumor Buds in einem Mikroskopierfeld mit der Größe von 0.785 mm² bestimmt. Die Einteilung erfolgt, wie in **Tabelle 2** zu sehen, über ein dreistufiges System (Bd1, Bd2, Bd3), wobei maximal vier Tumor-Buds in diesem Bereich einer geringen Tumor Budding Aktivität entsprechen (low budding - Bd1), 5-9 Buds entsprechen einer intermediären Tumor Budding Aktivität (intermediate budding - Bd2) und 10 oder mehr Buds einer hohen Tumor Budding Aktivität (high budding - Bd3) zugeordnet werden (siehe **Abbildung 3**).³⁰

Tabelle 2: Einteilung der Tumor Budding Kategorien nach der Anzahl der gefundenen Tumor Buds in einem Mikroskopierfeld mit 20-facher Vergrößerung und einer Größe von 0.785mm². (modifiziert nach³⁰)

Tumor Budding Kategorie	Anzahl der Tumor Buds per 0.785mm ²
Bd1 (low)	0 - 4
Bd2 (intermediate)	5 – 9
Bd3 (high)	10 oder mehr

Diese vorgeschlagene Graduierung des Tumor Buddings anhand des international konsentierten Systems wurde in der 2019 erschienenen aktualisierten Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstrakts im Kapitel zu den KRK so implementiert und ebenso in die essentiellen diagnostischen Kriterien der WHO für das kolorektale Karzinom übernommen⁵.

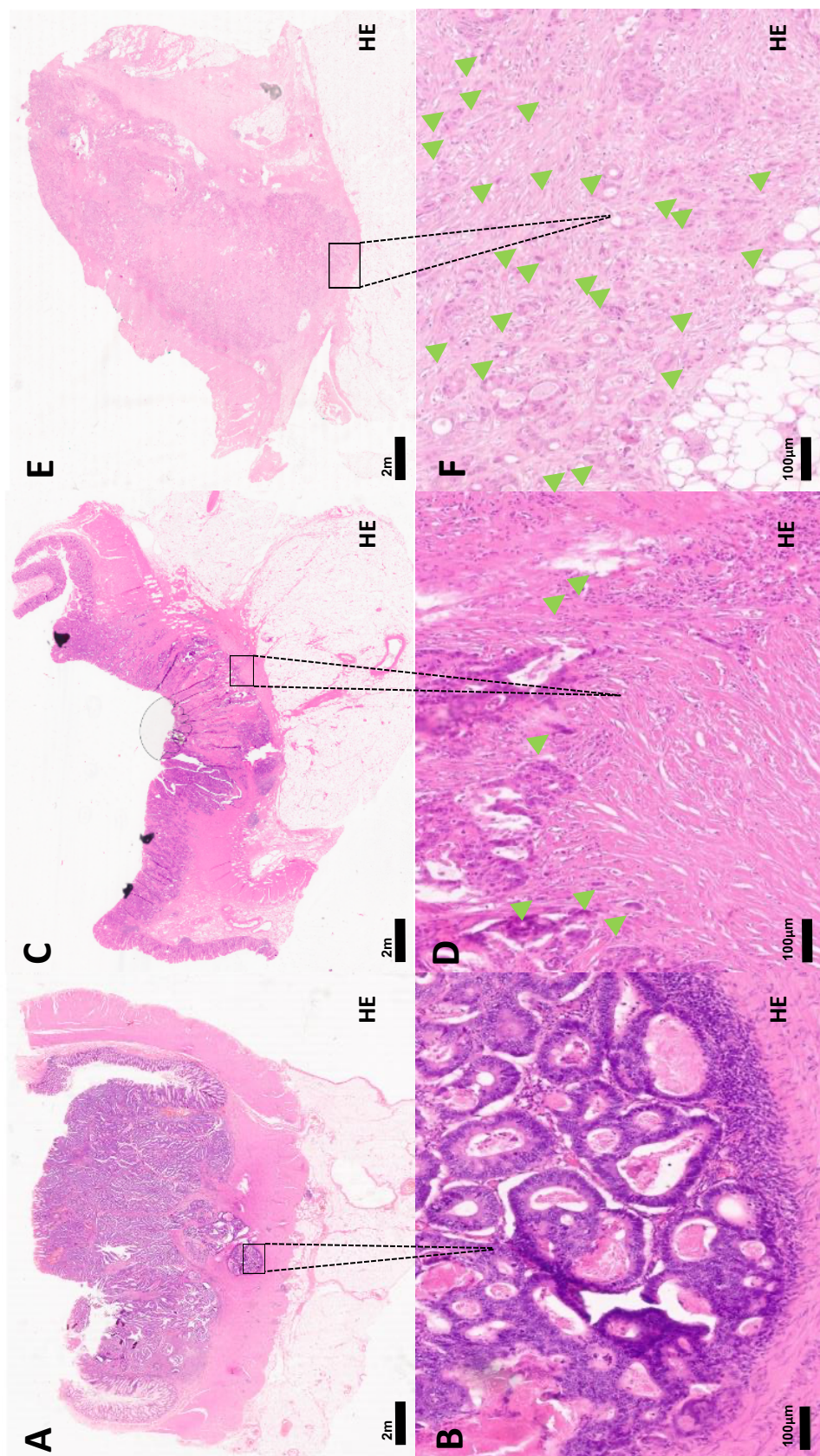


Abbildung 3: Die Abbildungen A, C und E zeigen Übersichtsvergrößerungen von Schnittpräparaten in HE-Färbung von KRK Adenokarzinomen, wobei die Abbildungen B, D und F jeweils vergrößerte Ausschnitte von Bereichen, wo man die meisten Tumor Buds vermutet, präsentiert. In den Abbildungen D und F zeigen die grünen Pfeile auf einzelne Tumor Buds. Durch die Auswertung der Anzahl der Tumor Buds in den jeweiligen Schnittpräparaten kann man hier eine Unterteilung des Tumor Boddings vornehmen: A und B) Bd1, C und D) Bd2 und E und F) Bd3.

3.6.3 Histologische Subtypen des kolorektalen Karzinoms

In der im Jahr 2019 erschienenen 5. Auflage der WHO-Klassifikation „Tumours of the colon and rectum“ werden anhand ihres histopathologischen Erscheinungsbildes, neben dem klassischen Adenokarzinom NOS, insgesamt 10 weitere histologische Subtypen des KRKs (muzinöses Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinom, medulläres Karzinom, serratiertes Adenokarzinom, mikropapilläres Adenokarzinom, adenom-artiges Adenokarzinom, adenosquamöses Karzinom, Karzinom mit sarkomatoiden Komponenten, undifferenziertes Karzinom, gemischte adenoneuroendokrine Karzinome/ neuroendokrine Karzinome) voneinander unterschieden. Neben dem klassischen Adenokarzinom sind, verglichen mit der Voraufgabe aus dem Jahr 2010³³, neue morphologische Varianten wie das adenom-artige Adenokarzinom dazugekommen³⁴, während früher aufgelistete KRK Subtypen wie das kribriiforme Adenokarzinom oder das Spindelzellkarzinom nicht mehr erwähnt werden^{5,35,36}. Im Folgenden sind nun die einzelnen Subtypen samt der von der aktuellen WHO-Klassifikation vorgegebenen diagnostischen Kriterien aufgeführt.

3.6.3.1 Adenokarzinom NOS (nicht weiter spezifiziert)

Der größte Anteil aller kolorektaler Karzinome gehört zur Kategorie der Adenokarzinome, wobei die klassischen Adenokarzinome vom kolorektalen Typ gemäß der WHO-Klassifikation als Adenokarzinom NOS (nicht weiter spezifiziert) bezeichnet werden. Wie in **Abbildung 4A** dargestellt, ist das Adenokarzinom NOS histologisch ein Adenokarzinom mit intestinalem Baumuster, welches je nach Differenzierungsgrad variabel gut ausgeformte tubuläre Drüsenstrukturen oder solide kribriiforme Tumorzellkomplexe ausbildet. Klassischerweise lassen sich in den Drüsenlumina der Adenokarzinom NOS sogenannte Komedonekrosen nachweisen, die zwar nicht gänzlich spezifisch sind, aber sich dennoch in so gut wie allen Adenokarzinomen NOS finden lassen. Zytologisch ist das Adenokarzinom NOS durch atypische, zumeist blass-eosinophile Epithelzellen gekennzeichnet, die eine in Richtung des Kerns verschobene Kern-Plasma-Relation und hyperchromatische, teils stiftförmig elongierte Zellkerne mit vermehrten Mitosen aufweisen.^{5,37} Immunhistochemisch zeigt das Adenokarzinom NOS in der Regel eine starke Positivität für die intestinalen Transkriptionsfaktoren CDX2 und SATB2 sowie typischerweise eine ausgeprägte Expression von Zytokeratin 20 (CK20)^{38,39}. Das Adenokarzinom NOS hat keine vorbeschriebene Prädilektion für eine bestimmte Region des kolorektalen Systems und wird gleichartig häufig in mikrosatellitenstabilen und mikrosatelliteninstabilen Tumoren beobachtet^{5,37}. Die Prognose der Adenokarzinome NOS an und für sich ist variabel und hängt neben dem Tumorstadium auch vom Vorhandensein anderer histologischer Parameter ab⁵, die in den nächsten Absätzen weitergehend beschrieben werden.

3.6.3.2 Mikropapilläres Adenokarzinom

Die histologischen Merkmale eines mikropapillären Adenokarzinoms sind, wie in **Abbildung 4B** dargestellt, schmale runde oder ovale solide Tumorzellkomplexe, die in der Regel keine Ausbildung drüsiger Strukturen zeigen. Diese werden typischerweise von starken stromalen Retraktionsartefakten umgeben, die vaskuläre Kanäle nachahmen.⁵ Die Inzidenz variiert je nach Single-Center-Studie zwischen 5% und 20%, wobei Karzinome mit reinem mikropapillären Wachstumsmuster äußerst selten sind und meist konventionelle Adenokarzinome Komponenten eines mikropapillären Karzinoms aufweisen.^{5,37} Mikropapilläres Wachstumsmuster lässt sich vor allem auch häufig in Adenokarzinomen außerhalb des Gastrointestinaltrakts diagnostizieren. So galten die mikropapillären Adenokarzinome zuvor als prognostisch ungünstige Varianten duktaler Mammakarzinome, sowie auch als aggressive histologische Karzinomvarianten z.B. des Ovars, des Urogenitaltrakts oder der Lunge.⁴⁰ Gemäß der neuen WHO-Klassifikation müssen zur Diagnose der mikropapillären Variante eines KRKs lediglich mehr als 5 % des Gesamttumors ein mikropapilläres Muster aufzeigen⁵. Immunhistochemisch weisen mikropapilläre Adenokarzinome eine Expression des Epithelmembran-Antigens EMA (MUC1), einen Verlust von MUC2 sowie eine reduzierte Färbung oder gar eine Abwesenheit von E-Cadherin auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen nicht nur den mesenchymalen Marker Vimentin exprimieren, sondern auch eine nukleäre Expression des Proteins SMAD4, dessen Anwesenheit eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des Transforming-Growth-Factor β (TGF β) spielt, aufweisen. Molekulare Analysen zeigten gehäuft TP53, KRAS oder BRAF Mutationen sowie eine Tendenz zur Mikrosatellitenstabilität.^{37,41,42} Dieser Subtyp des KRKs, der sich häufig im rechten Kolon oder im Rektum befindet, betrifft vor allem Patienten ab dem 50ten Lebensjahr, wohingegen jüngere Patienten nur in sehr seltenen Fällen die Diagnose eines mikropapillären Adenokarzinoms erhalten⁴³. In der Literatur wird ein höheres Risiko für Lymphknoten-Metastasierung beschrieben und häufig auch eine Positivität für schlechte Prognosefaktoren, wie eine lymphatische, extramurale vaskuläre und perineurale Invasion⁵.

3.6.3.3 Serratiertes Adenokarzinom

Das serratierte Adenokarzinom ist, wie in **Abbildung 4C** illustriert, durch morphologische Ähnlichkeiten zu serratierten Polypen gekennzeichnet. Vor Beginn unserer Studie wurde dieser Subtyp mit einer Prävalenz von 10-15% unter allen KRK beschrieben. Histologisch zeigt sich eine große sägezahnartig, verzweigte Drüsenarchitektur, die häufig von kleinherdigen, extrazellulären Schleimablagerungen begleitet wird.⁵ Die im Adenokarzinom NOS häufig beobachteten Komedonekrosen treten in serratierten Adenokarzinomen typischerweise nicht oder nur sehr fokal auf. Zytologisch zeigen sich klassischerweise stark eosinophile oder auch

klarzellige, zytoplasmareiche Tumorzellen mit vesikulären Zellkernen, wobei eine niedrige Kern-Plasma-Relation vorliegt. Die molekulare Entstehung von serratierten Adenokarzinomen ist sehr vielfältig, wobei ein hoher Methylierungsgrad (CIMP) bei den meisten Tumoren dieses Subtyps beobachtet wird.³⁷ Im Gegensatz zu den Adenokarzinomen NOS weisen serratierte Adenokarzinome eine stärkere Expression von Genen wie dem Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (HIF-1 α), Fascin 1, Hippocalcin und Annexin A10, die an morphogenese-, hypoxie-, zytoskelett- und vesikeltransportbezogene Funktionen der Zelle beteiligt sind, auf. Eine MSI kann in bis zu 20% der serratierten Karzinome gefunden werden.^{43,44} Im Vergleich zum konventionellen Adenokarzinom ist das serratierte Adenokarzinom durch eine aktive Invasionsfront mit zytoplasmatischen Pseudofragmenten sowie geringer lymphozytärer Infiltration und einer erhöhten Resistenz beim Versuch einer zielgerichteten Tumorthherapie charakterisiert⁴⁵. Als Erklärung werden unter anderem häufiger auftretende Mutationen in Genen wie KRAS und BRAF aufgeführt⁴⁴. Insgesamt wird in der vorbestehenden Literatur eine Tendenz des serratierten Adenokarzinoms zum rechten Kolon postuliert. Beim Vorliegen einer linksseitigen Lokalisation im gastrointestinalen Trakt wird dem KRK-Subtyp zudem eine schlechtere Prognose zugeschrieben.³⁷

3.6.3.4 Muzinöses Adenokarzinom

Das muzinöse Adenokarzinom ist ein histologischer Subtyp des KRKs bei dem, wie in **Abbildung 4D** illustriert, ausgedehnte extrazelluläre Schleimablagerungen kennzeichnend sind. Die vor Beginn unserer Arbeit beschriebene Prävalenz unter den primären KRK beträgt für das muzinöse Adenokarzinom laut der WHO-Klassifikation einen Wert zwischen 5% und 20%.⁵ Histologisch stellt sich dieser Subtyp mit atypischen Drüsenepithelien, eingebettet in extrazelluläre Schleimseen, dar, die sich von den ebenso schleimbildenden Siegelringzellkarzinomen dadurch unterscheiden, dass das produzierte Muzin nach extrazellulär sekretiert wird.⁴⁶ Siegelringartige Zellformen innerhalb des Muzins werden allerdings häufig beobachtet. Die von der WHO beschriebenen Diagnosekriterien für ein muzinöses Adenokarzinom geben vor, dass mehr als 50% des Gesamttumors diese histologischen Eigenschaften aufweisen muss. Eine muzinöse Komponente <50% entspricht einer Partialdifferenzierung.^{5,37} Muzinöse Adenokarzinome können prinzipiell in allen drüsenbildenden Organen auftreten und werden dort oft auch als sogenannte Kolloidkarzinome bezeichnet⁴⁶. Die molekulare Pathogenese des muzinösen KRK-Subtyps unterscheidet sich von Adenokarzinomen NOS durch höhere Mutationsraten in Genen der MAPK- und PI3K/Akt/mTOR-Signalwegen sowie durch höhere Raten an MSI- und CIMP-High. MSI-High muzinöse Tumore haben ein exophytisches Wachstumsmuster und treten vermehrt bei jüngeren Patienten auf. Im Vergleich zu Adenokarzinomen NOS ist eine Mutation des TP53

in muzinösen Karzinomen seltener. ATOH1, ein Transkriptionsfaktor, der die MUC2-Expression im Darmepithel aktiviert, wird bei muzinösen und Siegelringzellkarzinomen aufrechterhalten, aber bei nicht-muzinösen Karzinomen unterdrückt. Insgesamt ist somit die Expression von MUC2 und unter anderem auch von MUC5AC erhöht, während des Weiteren MUC1 (EMA) reduziert ist.^{37,46} Gemäß vorbestehender Literatur tritt das muzinöse KRK bevorzugt im rechten Kolon auf und scheint vermehrt Frauen zu betreffen⁴⁷. Die Prognose wird übergreifend kontrovers diskutiert, wobei dem muzinösen KRK meistens eine schlechtere Prognose als dem NOS zugeschrieben wird^{5,48,49}.

3.6.3.5 Adenom-artiges Adenokarzinom

Das adenom-artige Adenokarzinom ist ein neu definierter Subtyp in der aktuellen WHO-Klassifikation. Früher villöses Adenokarzinom oder invasives papilläres Adenokarzinom genannt⁵, ist das histologische Erscheinungsbild, wie in **Abbildung 4E** dargestellt, von adenom-artigen Adenokarzinomen durch invasive, villöse Drüsen mit breitem Stroma-Stiel gekennzeichnet, die zwar klar als invasiv zu bezeichnen sind, in Ihrer Gesamtmorphologie allerdings aufgrund ihrer Architektur stark an ein Adenom erinnern³⁷. Insgesamt wird der Subtyp, dessen Inzidenz je nach Literaturangabe zwischen 1% bis 9% variiert, dadurch beschrieben, dass mehr als 50% der invasiven Komponente ein adenom-artiges Aussehen mit niedrig-gradiger villöser Architektur aufweist⁵. Zytologisch zeigt dieser Subtyp häufig nur geringe Atypien. Die blande Morphologie und die adenom-artige Architektur führten zur Namensgebung dieser histologischen Variante und sind ebenso ursächlich dafür, dass insbesondere an Biopsien die diagnostische Einordnung als invasives Karzinom, beziehungsweise die Abgrenzung von einem Adenom, schwierig ist.⁵⁰ Im Vergleich zum Adenokarzinom NOS zeigt das adenom-artige Adenokarzinom eine minimalere desmoplastische Reaktion, eine erhöhte Präsenz an intraepithelialen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und geringere pTNM-Stadien⁵¹. In der bestehenden Literatur wird das adenom-artige Adenokarzinom mit einer geringen Rate an Metastasierungen und meistens mit einer günstigen Prognose assoziiert^{5,50}.

3.6.3.6 Medulläres Karzinom

Wie in **Abbildung 4F** gezeigt, werden KRK mit einem soliden Wachstumsmuster, die aus stark vergrößerten Zellen mit vesikulären Nuclei, prominenten Nucleoli und reichlich eosinophilen Zytoplasma aufgebaut sind, als medulläre Karzinome bezeichnet. Wichtige Charakteristika medullärer Karzinome sind zudem ein eher breit-flächiges, verdrängendes Infiltrationsmuster mit einer sogenannten Pushing-Border sowie eine auffallende Infiltration an intraepithelialen Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten.⁵ Der Prozentsatz des Gesamttumors, der

medulläre Eigenschaften besitzen muss, um eine Klassifikation als medulläres Karzinom zu rechtfertigen, wurde nicht abschließend definiert⁴³ und ist auch in der aktuellen WHO-Klassifikation nicht eindeutig hinterlegt⁵. Dieser Subtyp weist häufig eine Mikrosatelliteninstabilität in Kombination mit einer BRAF Mutation und einem abnormalen immunhistochemischen Muster mit Verlust von CDX2 und dem Filamentprotein Cytokeratin 20 (CK20), das vor allem von gastrointestinalen Epithelzellen gebildet wird, sowie negative neuroendokrine Marker, auf⁵. Im Wesentlichen sind medulläre Karzinome eine solide Variante des Adenokarzinoms mit geringerer glandulärer Differenzierung ihrer pleomorphen Tumorzellen und einer oftmals hoher morphologischer Ähnlichkeit zu schlecht differenzierten sowie zu undifferenzierten Adenokarzinomen⁵². Die mangelhafte histologische Abgrenzung könnte auch der Grund dafür sein, dass in Tumorregistern weltweit das medulläre Karzinom seltener genannt und seine Prävalenz unter allen kolorektalen Adenokarzinomen auf weniger als 3% geschätzt wird⁵³. Klinisch scheint das medulläre Karzinom häufiger ältere Frauen zu betreffen, vermehrt im rechtsseitigen Kolon aufzutreten und eine geringere Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen aufzuweisen⁵². Insgesamt wird dem medullären Karzinom in der bestehenden Literatur eine bessere Prognose als dem konventionellen, schlecht differenzierten Adenokarzinom zugeschrieben⁵.

3.6.3.7 Siegelringzellkarzinom

Das Siegelringzellkarzinom ist ein seltener histologischer Subtyp des Adenokarzinoms bei dem, wie in **Abbildung 4G** dargestellt, mehr als 50% der Läsion eine siegelringzellige Morphologie, wie man sie klassischerweise bei Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs oder des Magens nach dem diffusen Typ nach Lauren sieht, aufweist³⁷. Vor Beginn unserer Arbeit wurde die Prävalenzrate des siegelringzelligen Subtyps kolorektaler Karzinome je nach Literatur zwischen 0,5% und 2,6% beziffert⁵⁴. Als Siegelringzellen bezeichnet man einzellige Infiltrate mit prominenter, intrazytoplasmatischer Schleimbildung, die zu einem an den Rand der Zelle verdrängten, meist abgeplatteten Zellkern führen und vom morphologischen Erscheinungsbild somit stark an einen Siegelring erinnern, was die Terminologie dieses Zelltyps begründet⁵. Im Vergleich zu den Siegelringzellkarzinomen des Magens sind die des Kolorektums mit einem höheren Gehalt an extrazellulärem Muzin assoziiert und infiltrieren seltener diffus in das umliegende Gewebe. Die Unterscheidung zwischen metastasierten Magenkarzinom und kolorektalen Siegelringzellkarzinom kann sich schwierig gestalten, da sie sich morphologisch ähneln und in der Regel vergleichbare immunhistochemische Eigenschaften aufweisen, einschließlich der Negativität für MUC1, der Negativität für den Thyreoidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) und der Positivität für MUC2. Die Expressionsrate von CDX2 ist in Siegelringzellkarzinomen variabel, während in den

meisten Fällen eine Reaktivität für SATB2 und ein Verlust der E-Cadherin-Expression vorliegen.³⁷ Dieser Subtyp des KRKs wird, im Vergleich zum konventionellen KRK, meistens in jüngeren Individuen beschrieben und scheint laut früheren Studien öfter das weibliche Geschlecht zu betreffen. Als häufigste Lokalisation des Subtyps wird das rechtsseitige Kolon inklusive des Coecums diskutiert, wobei es hierzu verschiedene Angaben in der Literatur gibt.^{37,43} Laut der WHO wird die Diagnose eines Siegelringzellkarzinoms häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt, wobei es bei diesem Subtyp zu einer früheren Metastasierung und multiplen untypischen Lokalisationen der Metastasen kommt⁵. Insgesamt wird das Siegelringzellkarzinom in der bestehenden Literatur im Vergleich zum Adenokarzinom NOS und zum muzinösen Karzinom als ein aggressiver Tumor mit schlechter Prognose beschrieben⁴⁹.

3.6.3.8 Neuroendokrine Karzinome (NEC)/ Kolorektal gemischte adenoneuroendokrine Karzinome (MANEC)

Neuroendokrine Karzinome (NEC) machen etwa 1% aller kolorektalen Karzinome aus, wobei die Inzidenz in den letzten Jahren zunehmend ist. NEC des Kolorektums präsentieren sich meistens als organoide Strukturen mit prominenten Trabekeln, rosetten- und palisadenartigen Mustern sowie mit zentralen Nekrosen in soliden Nestern.⁵ Morphologisch weisen NECs eine starke mitotische Aktivität auf und können, ähnlich wie neuroendokrine Karzinome der Lunge, groß- (LCNEC) als auch in seltenen Fällen als kleinzellige (SCNEC) Primärtumore auftreten. Immunhistochemisch liegt eine Positivität für Synaptophysin (siehe **Abbildung 4H**), was ein integrales Membran-Glykoprotein darstellt, das sowohl in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen als auch in normalen neuroendokrinen Epithelzellen, wie zum Beispiel Pankreasinseln, vorkommt, sowie des Weiteren eine Positivität für Chromogranin A, CD56 und SSTR2A vor.^{24,37} Gemischte adenoneuroendokrine Karzinome (MANEC) sind als Sonderform der kolorektalen NEC seltene und klinisch aggressiv verlaufende KRK mit erheblicher morphologischer Heterogenität. MANEC weisen laut der WHO sowohl eine neuroendokrine Komponente als auch Anteile von Adenokarzinomen auf, die jeweils mehr als 30% des Karzinoms einnehmen müssen um als solche klassifiziert zu werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass kolorektale NEC und MANEC eine enge genetische Verwandtschaft und ein ähnliches Spektrum an Mutationen wie konventionelle KRK aufweisen. Im Vergleich dazu haben sie jedoch einen aggressiveren klinischen Verlauf und werden zum Zeitpunkt der Diagnose oft mit einer weitreichenden Metastasierung festgestellt. Die sachgemäße Diagnose von MANECs ist nicht nur für eine Aussage über den potenziellen klinischen Verlauf wichtig, sondern auch für die daraus abgeleitete therapeutische Strategie, da die Existenz einer schlecht differenzierten neuroendokrinen Komponente die betroffenen Patienten in der Regel für spezifische Chemotherapien mit Zytostatika, die häufig aus einer Kombination von

Platinderivaten und Topoisomerasehemmern wie zum Beispiel Cisplatin und Etoposid besteht, qualifiziert.^{5,37,55}

3.6.3.9 Undifferenziertes Karzinom

Als undifferenzierte Kolonkarzinome bezeichnet man solche Karzinome, die abseits eines Nachweises ihrer epithelialen Herkunft, die in der Regel nur immunhistochemisch durch eine fokale Anfärbbarkeit mit Breitspektrums-Zytokeratinen gelingt, keine Anzeichen einer morphologischen, immunhistochemischen oder molekularen Liniendifferenzierung zeigen⁵. Von dem medullären kolorektalen Tumoren unterscheidet sich das undifferenzierte Karzinom, wie in **Abbildung 4I** gezeigt, durch die Abwesenheit eines synzytialen Wachstumsmusters, sowie dem Fehlen prominenter lymphoplasmazellulärer Infiltrate und der Abwesenheit einer grenzüberschreitenden Ausbreitung.^{5,37} Die tumorspezifische 5-Jahres Überlebensrate wird in der vorbestehenden Literatur als gering beschrieben und das undifferenzierte Karzinom insgesamt den aggressiven Karzinomen zugeordnet³⁷.

3.6.3.10 Karzinom mit sarkomatoiden Komponenten

Karzinome mit sarkomatoiden Komponenten stellen eine kleine, morphologisch heterogene Untergruppe kolorektaler Karzinome dar, die wie in **Abbildung 4J** gezeigt, durch einen spindelzelligen oder auch rhabdoiden Aufbau gekennzeichnet sind. Insgesamt erinnern diese an ein Sarkom und können differentialdiagnostisch, insbesondere an einem Biopsiematerial, schwierig von diesem abzugrenzen sein.⁵ Assoziierte Anteile eines klassischen Adenokarzinom NOS oder Anteile anderweitiger drüsenbildender Varianten sind oftmals kleinfleckig bei der Untersuchung größerer Resektate nachweisbar. Der Verlust der nukleären Immunfärbung SMARCB1 (INI1), einer Kerneinheit des SWI/SNF Chromatin Remodeling Komplexes, sowie der Verlust oder die Koaktivierung verschiedener Bestandteile der SWI/SNF Protein-Familie, einschließlich SMARCA4, SMARCA2 und/ oder SMARCB1, sowie einige ARID1a Abnormalitäten sind für diesen Subtyp charakteristisch.^{5,37} Sarkomatoide Karzinome werden gehäuft in Kopf- und Halstumoren, Lungentumoren und Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane diagnostiziert. Das Vorkommen dieses seltenen Subtyps manifestiert sich bei gastrointestinalen Karzinomen vornehmlich im Ösophagus oder im Magen, während im kolorektalen System diese Variante als sehr selten und als prognostisch ungünstig vorbeschrieben ist.⁵⁶

3.6.3.11 Adenosquamöses Karzinom

Das adenosquamöse Karzinom, dessen Inzidenz in den meisten Fällen mit einem Wert unter 0,1% angegeben wird⁵, setzt sich morphologisch zu einem aus malignen Plattenepithelzellen

als auch aus bösartigen Drüsenelementen zusammen, die entweder miteinander vermischt oder als separate Komponenten innerhalb des Karzinoms in Erscheinung treten³⁷. Dieser seltene Subtyp wird durch individuelle Keratinisierung, interzelluläre Brücken, Hornperlen und Dyskeratosen charakterisiert. Das adenosquamöse Karzinom kann unter anderem auch als seltene Wachstumsvariante maligner Tumoren in anderen Organen außerhalb des Gastrointestinaltraktes auftreten. Während adenosquamöse Karzinome der Mamma in der bestehenden Literatur meistens ein geringeres Tumorstadium und eine bessere Prognose aufweisen, werden adenosquamöse Karzinome der Lunge als eine seltene aggressive Form des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beschrieben.⁵⁷ Im Gastrointestinaltrakt zeigt das adenosquamöse Karzinom eine gleichmäßige Verteilung zwischen dem rechten und linken Kolon³⁷. Insgesamt werden adenosquamöse Karzinome in verschiedenen Quellen eher mit einer höheren Metastasierungsrate, einer schlechteren Prognose und einem fortgeschritteneren Tumorstadium in Verbindung gebracht als konventionelle KRK^{5,58}.

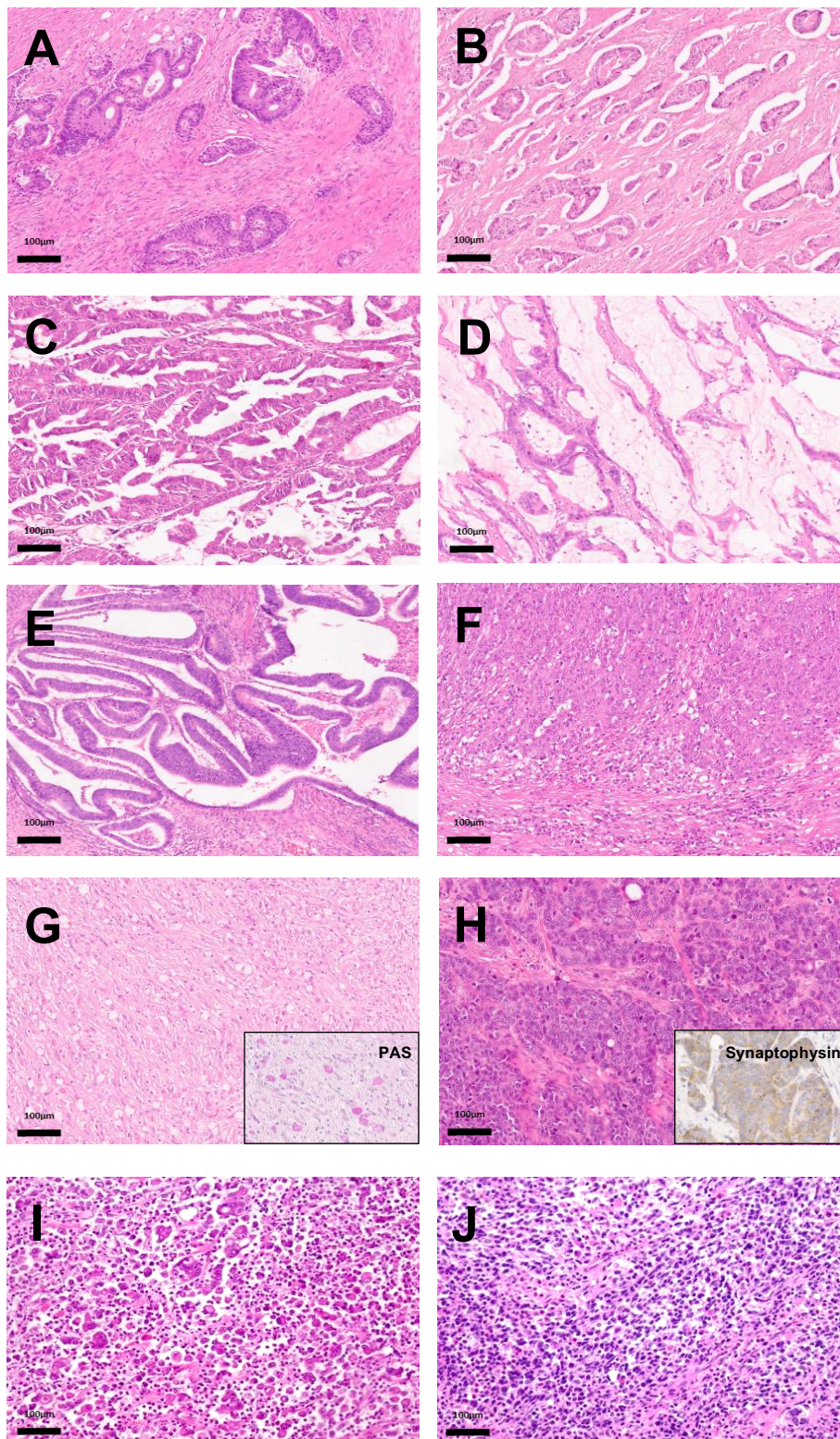


Abbildung 4: Histomorphologie des kolorektalen Karzinoms **A**) Adenokarzinom NOS (Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), 10x); **B**) Mikropapilläres Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **C**) Serratiertes Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **D**) Muzinöses Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **E**) Adenom-artiges Adenokarzinom, als auch ein Beispiel für ein WHO low-grade KRK (HE-Färbung, 10x); **F**) Medulläres Karzinom (HE-Färbung, 20x) & kleines Bild in PAS-Färbung, 40x); **G**) Siegelringzellkarzinom (großes Bild in HE-Färbung, 20x & kleines Bild in PAS-Färbung, 40x); **H**) Gemischtes adeno-neuroendokrines Karzinom, als auch ein Beispiel für ein WHO high-grade KRK (HE-Färbung, 20x), kleines Bild (Synaptophysin positiv, 40x); **I**) Undifferenziertes Karzinom (HE-Färbung, 10x); **J**) Karzinom mit sarkomatoiden Komponenten (HE-Färbung, 10x).

3.7 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie eines kolorektalen Karzinoms ist maßgeblich von dem klinischen Staging, also der Ausdehnung des Primärtumors (T), dem Lymphknotenstatus (N) und dem Vorliegen von Fernmetastasen (M), abhängig. Basierend auf dem Ergebnis entscheidet man sich grob gesagt bei dem Vorhandensein von Fernmetastasen für eine neoadjuvante oder palliative Chemotherapie und bei dem Fehlen von Fernmetastasen für eine operative Resektion des Karzinoms als primäre Therapie. Im zweiten Fall wird anschließend zur operativen Versorgung ein variables postoperatives Therapieschemata erarbeitet, dass zu einem von dem pathologischen Staging (pTNM) und den pathologischen Risikofaktoren, wie den individuellen patientenbezogenen Charakteristika, dem Therapieziel als auch den molekularen Eigenschaften beispielsweise bezogen auf den MSI-Status und Mutationen innerhalb der RAS- und BRAF-Gene, abhängig ist. Im folgenden Abschnitt wird darauf Wert gelegt insgesamt einen Überblick über die jeweiligen Leitlinien zu schaffen, da detailreiche Erklärungen, der zum Teil sehr speziellen und sich rasch wandelnden Therapieformen, den Rahmen dieser Dissertation überschreiten würden.

Das Stadium I des Kolonkarzinoms erfordert eine radikale chirurgische Resektion des Primärtumors, einschließlich der Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes mit mindestens 12 Lymphknoten in Form von einer totalen mesokolischen Exzision (TME). Eine anschließende adjuvante Therapie wird nicht empfohlen.¹⁶

Das Stadium II besitzt ebenfalls einen kurativen Therapieanspruch und erfordert eine vollständige chirurgische Resektion des Kolonkarzinoms sowie eine TME. Eine adjuvante Chemotherapie kann die Rezidivrate reduzieren und das 5-Jahres-Überleben erhöhen, insbesondere bei Patienten mit einem höherem klinischen Rezidivrisiko, wozu ein T4 Stadium, eine Tumorperforation, ein intraoperativer Tumoreinriss, weniger als 12 untersuchte Lymphknoten oder histopathologisch bewiesene Lymph- oder Blutgefäßinfiltration zählen. Bei etwa 20% der Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium II ist eine MSI im Tumorgewebe nachweisbar, was mit einer besseren Prognose korreliert und als Argument gegen eine adjuvante Chemotherapie sprechen kann.^{1,16}

Im Stadium III bleibt der kurative Therapieanspruch ähnlich zu Stadium I und II weiterhin bestehen. In den allermeisten Fällen wird eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU/Folinsäure (bzw. Capecitabin) und Oxaliplatin durchgeführt. Dies kann die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant erhöhen als auch die Rezidivrate enorm reduzieren.¹

Im Stadium IV ist die Wahl der Therapie in erster Linie abhängig von der Resektabilität der Metastasen. Weiteren Einfluss auf die Therapiewahl haben individuelle Besonderheiten des Patienten, das übergeordnete Therapieziel und molekulare Untersuchungen auf MSI, RAS- und BRAF-Mutationen. ¹ Einen groben Überblick über die Therapiestruktur des Kolonkarzinoms gibt **Abbildung 5**.

Die Therapie eines Rektumkarzinoms unterscheidet sich nicht wesentlich von der Therapie eines Kolonkarzinoms. Der größte Unterschied liegt hierbei in der vermehrten Verordnung einer neoadjuvanten Therapie. Gemäß interdisziplinären Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft können weitere Ansätze bei der Ausarbeitung des Therapieplans hinzugefügt werden, einschließlich einer Kurzzeit-Strahlentherapie oder einer totalen neoadjuvanten Therapie. Das Konzept der „Totalen neoadjuvanten Therapie“ (TNT) ist eine Erweiterung der neoadjuvanten Radio- oder Radiochemotherapie um eine zusätzliche Chemotherapie, die für Tumoren mit ungünstigen Stadien und/oder bei beabsichtigtem Organerhalt eingesetzt werden kann. ² Für mehr Details zur Therapie des Rektumkarzinoms siehe **Abbildung 6**.

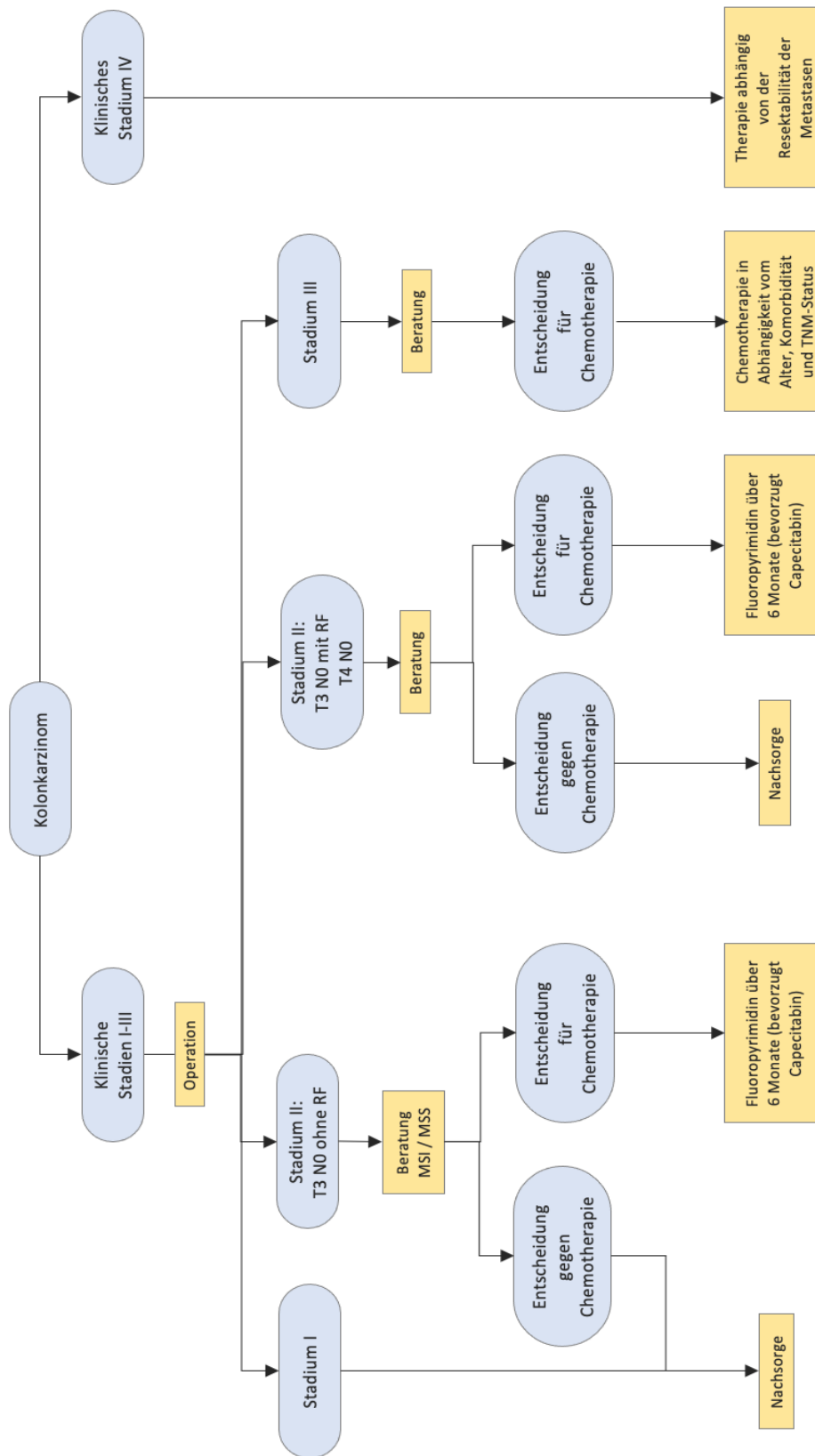


Abbildung 5: Das Flussdiagramm stellt eine Übersicht der Therapiestruktur des Kolonkarzinoms in Abhängigkeit von dem klinischen Stadium dar. Im Stadium I-III ist die radikale chirurgische Resektion des Kolonkarzinoms der erste Schritt woraufhin je nach Stadium der Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie getroffen wird. Im Stadium IV ist die Therapie von der Resektabilität der Metastasen abhängig. RF- Risikofaktoren (modifiziert nach¹)

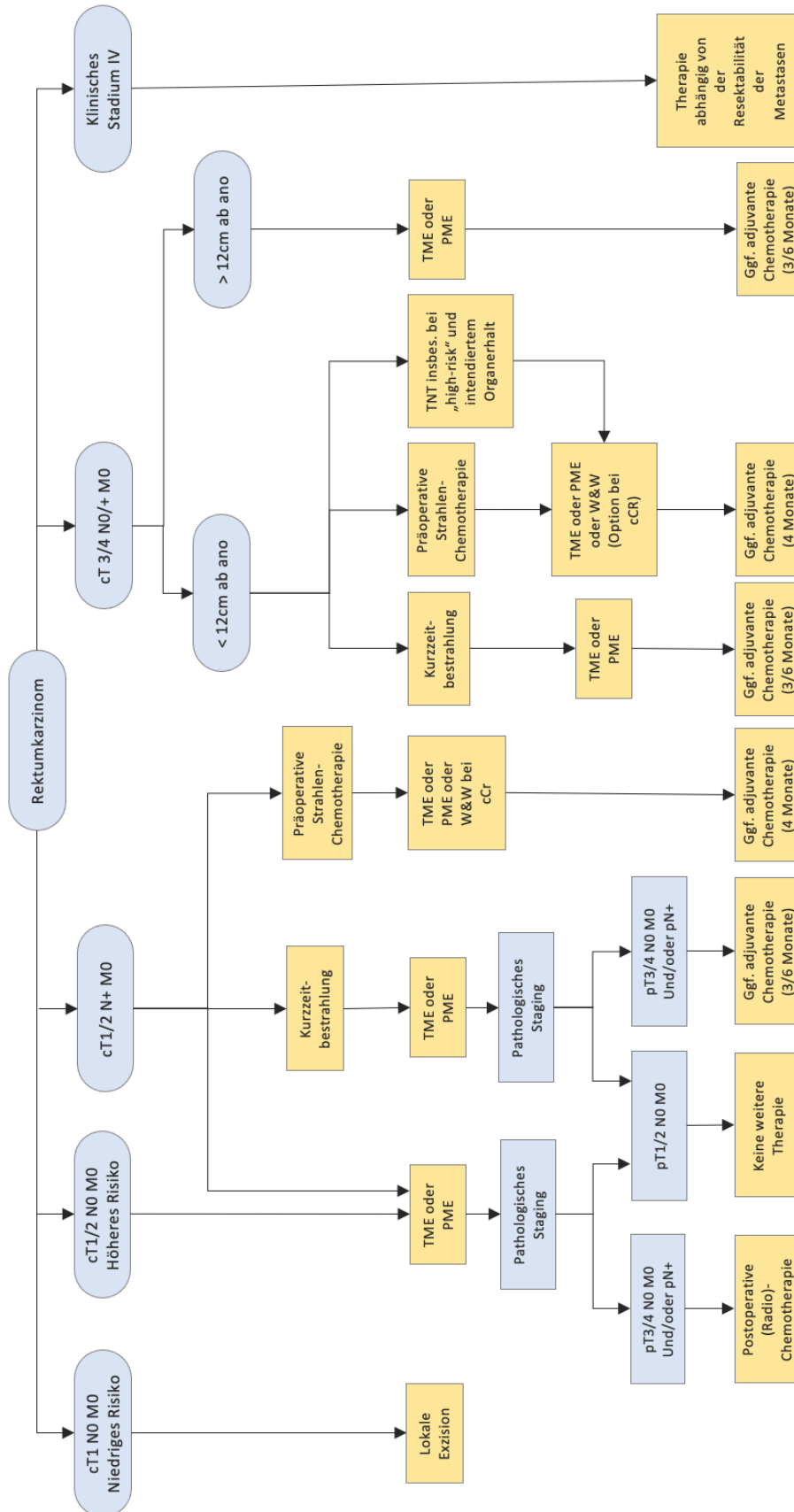


Abbildung 6: Das Flussdiagramm stellt eine Übersicht der Therapiestruktur des Rektumkarzinoms in Abhängigkeit von dem klinischen Stadium dar. Rektumkarzinome mit einem niedrigen Risiko für eine Metastasierung erhalten eine lokale Exzision. Hingegen werden Rektumkarzinome mit einem höheren Risiko neben einer neoadjuvanten Therapie gegebenenfalls zusätzlich mit einer adjuvanten Therapie behandelt. cCR – klinische Komplettremission; PME – Partielle Mesorektumexzision; TME – Totale Mesorektumexzision; W&W – Watch and wait; TNT – totale neoadjuvante Therapie (modifiziert nach ²)

3.8 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit haben wir eine große Kohorte von 1004 KRK-Patienten histologisch, gemäß der einleitend beschriebenen morphologischen Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation von 2019, die bezüglich der essenziellen morphologischen Aspekte signifikante Veränderungen im Vergleich zur Voraufgabe von 2010 mit sich brachte, untersucht. Wie bereits umfassend erläutert, enthalten diese Veränderungen vor allem die Umstrukturierung des klassischen WHO Gratings von einem drei- auf ein zweistufiges System, das Hinzukommen oder Wegfallen spezifischer histologischer Subtypen und die Einführung des zellulären Dissoziationsparameters Tumor Budding.

Trotz des tiefgreifenden Einflusses dieser Umstellungen auf die tägliche diagnostische Arbeit von Pathologen weltweit, waren bei Veröffentlichung der aktuellen WHO-Klassifikation die klinische und prognostische Relevanz sowie die Interaktion dieser geänderten Parameter untereinander noch weitgehend unklar.

Durch histologische Reklassifikation von mehr als 1000 resezierten KRK sollten im Rahmen dieser Promotionsarbeit folgende zentrale Fragen beantwortet werden.

- (1) Wie häufig sind spezielle histologische Subtypen gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation in einem großen KRK-Kollektiv nachweisbar und zeigt die Unterscheidung der verschiedenen histologischen Subtypen eine prognostische Demarkation zwischen den einzelnen Varianten? Gibt es Assoziationen zu weiteren klinisch-pathologischen Parametern?
- (2) Wie häufig ist die Frequenz der verschiedenen WHO-Grading-Subgruppen und lassen sich Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern finden? Zeigt das klassische Grading nach der Umstellung des drei- auf das zweistufige System eine prognostische Relevanz?
- (3) Wie hoch ist die Frequenz der verschiedenen Tumor Budding-Subgruppen? Wie ist deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern und inwieweit kann man durch das Tumor Budding detailliertere prognostische Aussagen treffen?
- (4) Wie hängen die drei histomorphologischen Parameter KRK Subtypisierung, Tumor Budding und WHO Grading zusammen? Inwiefern beeinflussen diese sich gegenseitig?

- (5) Was sind Stärken und Schwächen der jeweiligen histologischen Parameter und in welchen klinischen Szenarien kommen diese am ehesten zum Tragen? Welche der drei zentralen histopathologischen Parameter des KRKs hat auch in multivariaten Analysen inklusive des Tumorstadiums Bestand?
- (6) Welche sind insgesamt die prognostisch stärksten morphologischen Parameter der neuen WHO-Klassifikation und sollten in histopathologischen Befunden der KRK künftig in den Vordergrund gestellt werden?

4 Material und Methoden

4.1 Erstellung der Kohorte

Zu Beginn unserer Studienarbeit identifizierten wir mittels des institutsinternen Informationssystems Nexus/LAB alle Patienten, für die im Nexus-System die Diagnose eines resezierten KRKs hinterlegt wurde (Suchschlüssel: DI 6C). Lediglich Patienten mit KRK wurden eingeschlossen. Patienten mit nicht-epithelialen Neoplasien, hoch differenzierten neuroendokrinen Tumoren und Appendixtumoren wurden ausgeschlossen. Das ursprünglich gewählte Suchraster von 2003 bis 2017 wurde im weiteren Verlauf der Studie auf die Jahrgänge 1997 bis 2002 und den Jahrgang 2018 erweitert. Insgesamt konnten wir 1004 Patienten mit reseziertem KRK identifizieren, für die sowohl ausreichend klinisch-pathologische Informationen als auch Gewebe zur Verfügung standen.

Nachfolgend begannen wir für alle Patienten die wichtigen klinisch-pathologischen Daten zusammenzustellen. Aus dem Nexus-System entnahmen wir die pathologischen Kriterien wie Tumorlokalisierung, Tumorgröße, TNM-Klassifikation, Vorhandensein einer Lymph-, Blutgefäß- oder Perineuralscheideninvasion und der Tumordifferenzierung während des Diagnosezeitpunktes. Aus diesen Daten extrapolierten wir das Tumorstadium gemäß UICC. Im nächsten Schritt wurden mittels des klinikinternen Patientenmanagementsystems PKIS/SAP Spezifika bezüglich der chirurgischen Therapie und der medikamentösen Therapie extrahiert. Die Nachverfolgung des klinischen Verlaufs wurde unter Nutzung der im Bayerischen Krebsregister eingepflegten Verlaufsinformationen sowie durch Aufzeichnungen in Arztbriefen dokumentiert. Folgende Überlebensparameter wurden von uns erhoben und wie folgt definiert: Für das Gesamtüberleben („Overall Survival“; OS) wurden alle registrierten Todesfälle von den Patienten in unserer Kohorte erfasst, unabhängig von der Todesursache. Das krankheitsspezifische Überleben („Disease Specific Survival“; DSS) erfasste nur Tumorassoziierte Todesfälle als Ereignisse, die auch eindeutig als solche klassifiziert wurden. Ein lokoregionales Tumorrezidiv oder eine neu aufgetretene Fernmetastase in zeitlichem Abstand zur Primärdiagnose wurde als Progress und somit als Ereignis für das krankheitsfreie Überleben („Disease Free Survival“; DFS) gewertet. Die Endpunkte aller Überlebensvergleiche waren entweder definierte Ereignisse wie bspw. der Tod eines Patienten oder Loss of Follow-up, wobei in diesem Fall der Zeitpunkt des letzten verfügbaren Eintrags für den jeweiligen Patienten dokumentiert wurde.

Die gewonnenen Informationen wurden zunächst in einer Excel-Tabelle (Excel 2019, Microsoft) gesammelt und anschließend zur Selektion der tumortragenden Schnittpräparate

und Gewebelöcke aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München genutzt. Daran anknüpfend erfolgte die erstmalige Inspektion der Schnitt- und Gewebepreparate. Nachfolgend wurden die gesammelten Daten aus der Excel-Tabelle geordnet und bereinigt und erstmals in eine Tabelle des Statistikprogramms SPSS (Statistical Program for the Social Sciences Institute, IBM, Chicago, Illinois, USA) überführt, mit dem anschließend alle weiteren statistischen Untersuchungen durchgeführt worden sind.

Für das Projekt wurde zudem ein Ethikvotum der lokalen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität in München unter der Referenznummer 252/16 eingeholt.

4.2 Erstellung eines Tissue Microarray der Kohorte

Um effektiv an dieser sehr großen Kohorte Biomarker-Untersuchungen, wie beispielsweise die Erhebung des MSI-Status durchführen zu können, wurden kleine Proben von jedem in unserer Kohorte inkludierten Karzinome, auf einem Tissue Microarray kondensiert. Tissue Microarray (TMA) ist eine Bezeichnung für einen Paraffinblock, in den zylindrische Stanzbiopsien von zahlreichen verschiedenen Tumorproben eingebracht werden können. Dies ermöglicht die Untersuchungen von bis zu hunderten einzelnen Gewebeproben auf einem Objektträger. Zur Konstruktion wurden die Spenderblöcke und die dazugehörigen, archivierten Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Schnitte mittels eines Lichtmikroskops untersucht und passende tumorzelltragende Areale unter dem Lichtmikroskop manuell auf den Schnitten markiert. Hierbei wurden, wie in **Abbildung 7** gezeigt, jeweils vier tumortragende Areale aus dem Tumorzentrum und vier tumortragende Areale von der Invasionsfront ausgewählt.



Abbildung 7: Beispiel für ein Schnittpräparat eines KRKs in HE-Färbung für die Lichtmikroskopie mit 4 zentral markierten Arealen (blau) und 4 an der Invasionsfront markierten Arealen (rot).

Die Schnitte wurden als Schablonen zur Identifizierung der Areale auf den Spenderparaffinblöcken genutzt, um anschließend die markierten Spenderblöcke in einen automatisierten Tissue-Microarrayer (TMA Grandmaster, Sysmex, Budapest, Hungary) zu

laden. Für unsere Kohorte wurden je Patient somit insgesamt 8 Proben entnommen, die auf vier verschiedenen Kopien des TMA-Kollektivs hinterlegt wurden.

4.3 Histopathologische Analysen

Die primäre histopathologische Analyse der KRK-Resektate wurde an den bereits zur Verfügung stehenden Hämatoxylin- und Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten durchgeführt. Im Falle schlecht beurteilbarer HE-Schnitte wurde das Blockmaterial erneut angeschnitten und neue HE-Schnitte angefertigt. Die Begutachtung der Tumoren erfolgte durch Corinna Lang unter der Supervision zweier erfahrenen Pathologen mit einem Schwerpunkt für gastrointestinale Pathologie (Prof. Dr. Moritz Jesinghaus, Prof. Dr. Wilko Weichert) an einem mehrköpfigen Demonstrationslichtmikroskop. Anschließend wurden die ausgewählten Tumoren bezüglich aller Parameter klassifiziert. Für jeden Fall wurden alle tumortragende Schnitte eingehend betrachtet, wobei immer mindestens zwei Schnitte je Patient evaluiert wurden, um repräsentativ mehrere Abschnitte des Tumors in die endgültige Beurteilung einfließen lassen zu können. Falls zur Diagnose eines spezifischen Parameters, bei entsprechendem morphologischen Verdacht, Zusatzuntersuchungen indiziert waren (z.B. Synaptophysin in der Immunhistochemie bei Verdacht auf neuroendokrine Differenzierung), so wurden diese nachfolgend durchgeführt.

Alle 1004 Karzinome wurden gemäß der 2019 erschienen WHO-Klassifikation reevaluiert und je einem spezifischen KRK Subtyp, einem WHO Grading (low-grade/high-grade) sowie einer der ITBCC Tumor Budding-Subgruppen (Bd1, Bd2, Bd3) zugeordnet. Zusätzlich wurden alle Tumoren auf eine intra- oder extramurale Veneninvasion, eine Lymphgefäßinvasion und auf das Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion untersucht. Das Tumorstadium wurde anhand der achten Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren bestimmt.

Bei Uneinigkeit der Hauptuntersucher bezüglich einer oder mehrerer Kriterien wurde der Fall bis zur Konsensfindung diskutiert und der Konsensentscheid als finale Einordnung in unseren Aufzeichnungen festgehalten.

Zur Analyse der Interobserver-Variabilität wurden 100 zufällig ausgesuchte und bereits klassifizierte Tumoren erneut durch einen weiteren gastrointestinalen Pathologen (Prof. Dr. Björn Konukiewitz) untersucht, welcher bezogen auf die ursprüngliche Klassifizierung verblindet war.

4.3.1 Analyse des histopathologischen Subtyps kolorektaler Karzinome

Die Subtypisierung der KRK erfolgte nach den in der WHO-Klassifikation 2019 vorgeschlagenen Kriterien, wobei alle dort aufgeführten KRK Subtypen berücksichtigt wurden (Kriterien siehe **Kapitel 3.6.3**). Hierbei wurden in unseren Analysen, trotz der Aufführung in einem gesonderten Kapitel der WHO-Klassifikation, auch reine NECs und kolorektale MANECs einbezogen, da sich gezeigt hat, dass diese Tumoren genetisch eng mit konventionellen kolorektalen Adenokarzinomen verwandt sind, nicht aber mit konventionellen neuroendokrinen Tumoren und somit als histologische Variante der KRK anzusehen sind ^{4,24}. Tumoren der Appendix und hoch-differenzierte neuroendokrine Tumoren (NET) wurden von dieser Studie ausgeschlossen, da diese sich histogenetisch von den KRK unterscheiden ^{6,59}.

4.3.2 Beurteilung der Tumor Budding Aktivität

Zur Beurteilung der Tumor Budding Aktivität wurden die Tumoren daraufhin untersucht, ob und in welcher Ausprägung sogenannte Tumor Buds an der Invasionsfront der Tumoren zu erkennen waren. Tumor Buds wurden gemäß der gängigen Vorgabe als Tumorzellkomplexe unter fünf Tumorzellen definiert, die in irregulärer Lagerung und begleitet von einer Stromadesmoplasie das umgebende Gewebe infiltrieren. Wie in der WHO-Klassifikation von 2019 empfohlen, benutzen wir als Klassifikationsalgorithmus die Einteilung des Expertengremiums der Internationalen Tumor Budding Konsensus Konferenz (ITBCC) aus dem Jahr 2016 ³⁰. Hierbei kam das dreistufige System (Bd1, Bd2, Bd3), wobei maximal vier Tumor Buds einer geringen Tumor Budding Aktivität (low budding - Bd1), 5 - 9 Tumor Buds eine intermediären Tumor Budding Aktivität (intermediate budding - Bd2) und 10 oder mehr Tumor Buds einer hohen Tumor Budding Aktivität (high budding - Bd3) entsprechen, zum Tragen. In **Tabelle 3** kann das detaillierte Ablaufschema für die Klassifizierung eines KRKs zu einer Tumor Budding Subgruppe genauer betrachtet werden.

4.3.3 Bestimmung des WHO Gradings

In Übereinstimmung mit der WHO-Klassifikation von 2019 erfolgte die histopathologische Einstufung anhand der Drüsenbildung in „low-grade“ ($\geq 50\%$ Drüsenbildung, ehemals gut [Grad 1] oder mäßig differenziert [Grad 2]) und „high-grade“ ($< 50\%$ Drüsenbildung, ehemals schlecht differenziert [Grad 3]). Alle KRK wurden in ihrer Gesamtheit bezüglich ihrer Ausbildung tubulärer/drüsiger Strukturen beurteilt, wobei nur wirklich gut ausgeformte Drüsen auch als solche gewertet wurden. Miteinander verschmolzene Drüsen die z.B. ein kribriiformes Wachstum zeigten, wurden schon als Ausdruck eines soliden Wachstumsmusters betrachtet.

Tabelle 3: Ablaufschema für die Zuordnung eines kolorektalen Karzinoms zu einer Tumor Budding Kategorie im klinisch-pathologischen Alltag. (modifiziert nach ^{30,60})

Schritte																															
1	Unter den möglichen HE-Schnitten eines kolorektalen Karzinoms wird der HE-Schnitt mit dem höchsten Grad an Tumor Budding für die Zuteilung des Tumor Budding Grades gewählt.																														
2	Am HE-Schnitt werden zehn Felder mit einer zehnfachen Vergrößerung auf die lokalen „Hotspots“ untersucht.																														
3	In den gefunden „Hotspots“ wird jeweils mit Hilfe einer 20-fachen Vergrößerung die lokalen Tumor Buds gezählt.																														
4	Das Ergebnis der Zählung wird durch einen Normalisierungsfaktor geteilt. Dies ist notwendig, um den Wert bezogen auf die verschiedenen Öffnungsgrößen des Okulars des jeweils verwendeten Mikroskops zu standardisieren.																														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Durchmesser Okular (mm)</th> <th>Betrachtete Fläche (mm²)</th> <th>Normalisierungsfaktor zu 0.785 mm²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>18</td><td>0.636</td><td>0.81</td></tr> <tr><td>19</td><td>0.709</td><td>0.903</td></tr> <tr><td>20</td><td>0.785</td><td>1</td></tr> <tr><td>21</td><td>0.866</td><td>1.103</td></tr> <tr><td>22</td><td>0.95</td><td>1.21</td></tr> <tr><td>23</td><td>1.039</td><td>1.323</td></tr> <tr><td>24</td><td>1.131</td><td>1.440</td></tr> <tr><td>25</td><td>1.227</td><td>1.563</td></tr> <tr><td>26</td><td>1.327</td><td>1.69</td></tr> </tbody> </table>	Durchmesser Okular (mm)	Betrachtete Fläche (mm ²)	Normalisierungsfaktor zu 0.785 mm ²	18	0.636	0.81	19	0.709	0.903	20	0.785	1	21	0.866	1.103	22	0.95	1.21	23	1.039	1.323	24	1.131	1.440	25	1.227	1.563	26	1.327	1.69
Durchmesser Okular (mm)	Betrachtete Fläche (mm ²)	Normalisierungsfaktor zu 0.785 mm ²																													
18	0.636	0.81																													
19	0.709	0.903																													
20	0.785	1																													
21	0.866	1.103																													
22	0.95	1.21																													
23	1.039	1.323																													
24	1.131	1.440																													
25	1.227	1.563																													
26	1.327	1.69																													
5	Das durch die Berechnung erhaltene Ergebnis wird einem der drei Tumor-Budding-Kategorien (Bd1, Bd2, Bd3) zugeordnet.																														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tumor Budding Kategorie</th> <th>Anzahl Tumor Buds per 0.785mm²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Bd1 (low)</td><td>0 - 4</td></tr> <tr><td>Bd2 (intermediate)</td><td>5 – 9</td></tr> <tr><td>Bd3 (high)</td><td>10 oder mehr</td></tr> </tbody> </table>	Tumor Budding Kategorie	Anzahl Tumor Buds per 0.785mm ²	Bd1 (low)	0 - 4	Bd2 (intermediate)	5 – 9	Bd3 (high)	10 oder mehr																						
Tumor Budding Kategorie	Anzahl Tumor Buds per 0.785mm ²																														
Bd1 (low)	0 - 4																														
Bd2 (intermediate)	5 – 9																														
Bd3 (high)	10 oder mehr																														

4.3.4 Analyse des Mikrosatellitenstatus

Der Status der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde anhand der Immunhistochemie der Mismatch-Reparaturproteine (MMR-Proteine) MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 auf dem von unserem Kollektiv erstellten TMA mit zwei tumortragenden Kernen, die sich zu einem an der Invasionsfront und zum anderen im Tumorzentrum befanden, untersucht (siehe hierzu **Abbildung 8**). Die MMR-Proteine sind in der klinisch-pathologischen Routinediagnostik breit genutzte Surrogatmarker für die Analyse des MSI-Status, wobei ein zugrunde liegender Funktionsverlust in einem der zentralen Mismatch-Reparaturgene durch eine fehlende immunhistochemische Reaktion in den Zellkernen des Tumors nachgewiesen wird. Ein klassischer Befund im Rahmen einer MSI wäre der Expressionsverlust der Heterodimerisierungsproteine MLH1/PMS2 oder MSH2/MSH6. In unserer Studie wurden die KRK mit einem konkordanten Verlust (< 10% positive Tumorzellen) für MLH1/PMS2 oder MSH2/MSH6 oder einem isolierten Verlust von PMS2 oder MSH6 als MMR-defizient (dMMR) und somit als mikrosatelliteninstabil (MSI-high/ hochgradige Mikrosatelliteninstabilität) eingestuft. Tumore mit einer erhaltenen Färbung hingegen als mikrosatellitenstabil (MSS).⁶¹ Zur Qualitätssicherung wurde eine PCR-basierte molekulare MSI-Analyse mit dem etablierten Marker-Panel, das als Bethesda-Panel bezeichnet wird und aus den zwei Mononukleotidmarkern Big Adenine Tract (BAT)-25 und BAT-26, sowie aus den drei polymorphen Dinukleotidmarkern D5S346, D2S123 und D17S250^{62,63} besteht, für 50 Fälle durchgeführt. Unter Verwendung des Bethesda-Panels wurden KRK mit Mikrosatelliteninstabilität an zwei oder mehr dieser Loci als KRK mit hochfrequenter Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high) interpretiert und KRK ohne Mikrosatelliteninstabilität an einem dieser fünf Loci als mikrosatellitenstabil (MSS) eingestuft. Wurde hingegen nur bei einem der fünf empfohlenen Loci eine Mikrosatelliteninstabilität gefunden, wurde dieses KRK der niederfrequenten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-low) zugeordnet. Wir konnten in unsere Studie insgesamt eine Konkordanz von 100% bezüglich des Expressionsverlustes der MMR-Proteine als indirektes Nachweisverfahren einer Mikrosatelliteninstabilität und der molekularen MSI-Analyse mittels Bethesda-Panel zeigen⁴.

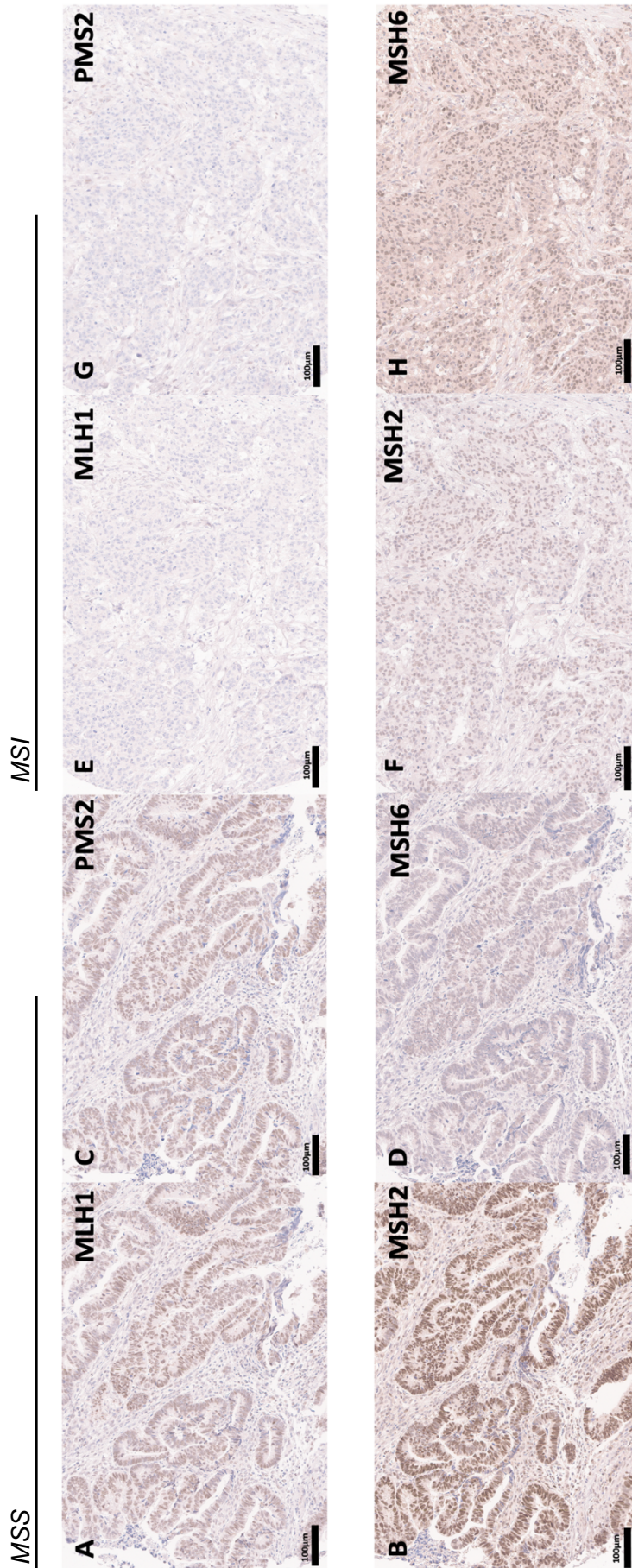


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung des immunohistochemischen Expressionsverhaltens der Mikrosatellitenmarker MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 anhand zweier KRKs, einmal eines KRKs mitsamt erhaltenem Expressionsverhalten (A-D) und eines KRKs ohne vollständig erhaltenem Expressionsverhalten (E-H). Man beachte bei dem zweiten KRK den Expressionsverlust der Heterodimere MLH1 (E) und PMS2 (G) bei simultan erhaltener Expression der Marker MSH2 (F) und MSH6 (H). Durch den Expressionsverlust des Mikrosatellitenmarker MLH1 mitsamt des MMR-Bindungspartner PMS2 kann somit das zweite KRK als MSI klassifiziert werden.

4.4 Statistische Methodik

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS, Version 26 (Statistical Program for the Social Sciences Institute, Chicago, Illinois, USA), wobei alle statistischen Tests als zweiseitige Testverfahren mit einem Signifikanzniveau von $\leq 0.05\%$ (p -Wert ≤ 0.05) durchgeführt worden sind.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde der *Pearson- χ^2 -Test* (Pearson-Chi-Quadrat-Test) eingesetzt. Der Test misst die Abweichung zwischen den beobachteten Häufigkeiten und den, aufgrund bestimmter Annahmen gemachten, erwarteten Häufigkeiten. Die Daten werden hierfür in einer Kontingenztafel dargestellt, die die Anzahl der Beobachtungen für jede Kombination der beiden Variablen angibt. Hierbei gilt als Voraussetzung unter anderem, dass die Stichprobengröße groß genug ist und dass die erwartete Häufigkeit in jeder Zelle größer als 5 sein kann. Anderenfalls wurde bei kleineren Stichprobengrößen der *Exakte Test nach Fisher* für die Ermittlung der p -Werte verwendet. Zur Überprüfung der Interrater-Reliabilität wurde der *Cohens Kappa Koeffizient* herangezogen. Bei der Interpretation der Kappa-Werte wurde die von Landis und Koch ⁶⁴ vorgeschlagene Klassifizierung zugrunde gelegt (<0 = „weniger als zufällige Übereinstimmung“; 0.01-0.20 = „geringe Übereinstimmung“; 0.21-0.40 = „ausreichende Übereinstimmung“; 0.41-0.60 = „mäßige Übereinstimmung“; 0.61-0.80 = „erhebliche Übereinstimmung“; 0.81-0.99 = „nahezu perfekte Übereinstimmung“).

Zur Untersuchung der Überlebensdaten wurde die *Kaplan-Meier-Methode* verwendet, wobei drei Ereigniszeiträume definiert worden sind. Der erste Ereigniszeitraum wurde als das Gesamtüberleben (OS = overall survival) definiert, wobei der Zeitraum von der Diagnosestellung bis zum Todeszeitpunkt angegeben worden ist. Der Todeszeitpunkt wurde hierbei erhoben, unabhängig ob die zugrunde liegende Ursache mit der Tumorerkrankungen in einem Zusammenhang stand oder nicht. Als zweiter Ereigniszeitraum wurde das krankheitsspezifische Überleben (DSS = disease-specific survival) herangezogen, was als Zeitraum zwischen der Diagnosestellung und dem Todeszeitpunkt definiert wurde. Im Unterschied zum OS ist das Versterben des Patienten tumorabhängig. Das krankheitsfreie Überleben (DFS = disease-free survival) als dritter Ereigniszeitraum beschreibt den Zeitraum zwischen der Diagnosestellung und dem Auftreten eines Rezidivs oder einer Fernmetastase. Die jeweiligen Ereignisse der Ereigniszeiträume OS, DSS und DFS oder ein Verlust der Patientennachverfolgung wurden als Endpunkte der Studie definiert. Zur Errechnung signifikanter Unterschiede in den Überlebenszeiten verschiedener Gruppen wurde der *Log-Rank-Test* und für die multivariate Überlebensanalyse das *Cox-Proportional-Hazard-Model* verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte

5.1.1 Häufigkeit und Verteilung der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte

Die Kohorte umfasste 1004 Patienten. Davon waren 575 (57%) der Patienten männlich und 429 (43%) waren weiblich. Der Altersmedian des Diagnosealters lag bei 69 Jahren (Spannweite: 9 - 96 Lebensjahre). Bezüglich der Tumorlokalisation zeigte sich eine annähernd gleichartige Verteilung zwischen rechtsseitigen (Coecum bis Kolon transversum) und linksseitigen (Kolon descendens bis Rektum) KRK. Vierhundertsechundachtzig KRK (48.4%) waren rechtskolisch und 518 KRK linkskolisch lokalisiert (51.6%). Die genaue Lokalisation im kolorektalen System ist **Tabelle 4** zu entnehmen. Die klinische Nachbeobachtungszeit betrug im Mittel 61.8 Monaten pro Patient (Spannweite: 1 Monat – 233 Monate). Im Rahmen der dokumentierten Nachbeobachtung wurden Rezidive bei 323 Patienten beschrieben (32.2%). Insgesamt verstarben 409 Patienten (41%) während der Nachbeobachtungszeit, wobei 294 (72%) als tumorspezifisch gewertet wurden. Die Erhebung der TNM-Klassifikation maligner Tumoren wurden gemäß der aktuellen achten Auflage⁵ neu bestimmt. Bezüglich der lokalen Ausdehnung (pT Stadium) zeigten sich 260 postoperativ als lokal begrenzt (pT1/2: 25.9%) und 744 KRK zeigten eine fortgeschrittene lokale Tumorausdehnung (pT3/4: 74.1%). Regionäre Lymphknotenmetastasen (pN1/2) wurden bei 452 Patienten (45%) detektiert. Histologisch gesicherte Fernmetastasen lagen zum Zeitpunkt der Resektion bei 152 Patienten (15.1%) vor. Die Kombination der gesammelten Parameter resultierte in folgende daraus abgeleitete UICC-Stadien: 207 KRK wurden dem UICC-Stadium I (20.6%), 326 Tumoren wurden dem UICC-Stadium II (32.5%), 319 Karzinome dem UICC Stadium III (31.8%) und 152 (15.1%) Karzinome dem UICC-Stadium IV zugeordnet. Bei der Bestimmung des MSI-Status zeigten sich 849 mikrosatellitenstabile KRK (84.6%) sowie 155 mikrosatelliteninstabile Karzinome (15.4%).⁴ Die exakte Verteilung der klinisch-pathologischen Parameter unserer Kohorte und deren Korrelation mit dem Patientenüberleben ist **Tabelle 4** zu entnehmen.

5.1.2 Prognostische Relevanz der klinisch-pathologischen Charakteristika der Kohorte

Das Patientenalter zeigte wie zu erwarten einen starken Einfluss auf das Gesamtüberleben und in geringerer Ausprägung auf das krankheitsspezifische Überleben. Des Weiteren wurde, wie in **Tabelle 4** zu sehen, die pTNM-Klassifikation als sehr starker prognostischer Faktor für alle Überlebensparameter mit einer sehr hohen statistischen Signifikanz ersichtlich.⁴ In der Log-Rank Analyse zeigte jede der einzelnen Kategorien der TNM-Klassifikation (pT, pN, pM)

einen sehr starken Einfluss auf alle Überlebensparameter (OS/DSS/DFS) mit einer hochgradigen Signifikanz ($p < 0.001$), wobei höhere lokale Tumorstadien, ein Befall regionärer Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen mit deutlich verkürzten Überlebenszeiten bzw. mit einem schnelleren Auftreten von Krankheitsrezidiven assoziiert waren. Gleiches galt ebenso für die weiteren der TNM-Klassifikation erhobenen Parameter Lymphgefäßinvasion, Perineuralscheideninvasion und Blutgefäßinvasion, die bei Vorhandensein ebenso mit einem deutlich verkürzten Überleben einher gingen⁴. Das sich aus den genannten einzelnen TNM-Parametern abgeleitete UICC-Stadium zeigte folglich eine sehr starke prognostische Demarkation ($p < 0.001$).

Mikrosatelliteninstabile Karzinome wiesen insgesamt etwas längere Überlebenszeiten (OS: 136.1 Monate) als mikrosatellitenstabile (OS: 125.5 Monate) Tumoren auf (OS/DSS $p = 0.02$). Ein Einfluss der Tumorlokalisation auf das Gesamtüberleben konnte nicht belegt werden, es zeigte sich ebenso kein Unterschied zwischen Tumoren des Kolons (DSS: z.B. Colon transversum 110.1 Monate) und des Rektums (DSS: 119.9 Monate).⁴

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte (n = 1004) und ihre prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens angegeben in Monaten. (modifiziert nach ⁴⁾)

		n (%)	Mittleres Gesamtüberleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben (SE)	p-Wert
Alter	Unterhalb des Medians	492 (49%)	146.1 (5.4)	<0.001	163.9 (4.9)	0.01	149.5 (5.1)	0.72
	Oberhalb des Medians	512 (51%)	101.1 (4.8)		133.1 (4.7)		135.6 (4.6)	
Geschlecht	männlich	575 (57%)	125.5 (5.1)	0.39	157.6 (4.7)	0.75	151.9 (4.8)	0.67
	weiblich	429 (43%)	122.1 (5.1)		138.8 (4.9)		133.1 (5.0)	
pT	1	78 (7.8%)	139.1 (8.4)	<0.001	172.4 (4.8)	<0.001	165.2 (6.2)	<0.001
	2	182 (18.1%)	140.5 (6.6)		164.6 (5.9)		161.0 (6.0)	
	3	555 (55.3%)	124.6 (5.3)		156.2 (5.0)		148.5 (5.1)	
	4	189 (18.8%)	87.8 (7.3)		96.4 (7.6)		90.6 (3.7)	
pN	0	552 (55%)	141.0 (4.5)	<0.001	173.9 (4.1)	<0.001	174.3 (4.0)	<0.001
	1	284 (28.3%)	112.2 (5.6)		124.9 (5.6)		115.2 (5.8)	
	2	168 (16.7%)	82.9 (8.7)		91.4 (8.9)		67.07 (8.6)	
pM	0	852 (84.9%)	142.2 (4.3)	<0.001	173.8 (3.8)	<0.001	168.9 (3.8)	<0.001
	1	152 (15.1%)	48.7 (5.0)		53.2 (5.4)		41.5 (5.18)	
UICC-Stadium	1	207 (20.6%)	147.4 (5.9)	<0.001	178.9 (4.5)	<0.001	175.9 (4.7)	<0.001
	2	326 (32.5%)	133.6 (6.0)		164.0 (6.5)		167.8 (5.5)	
	3	319 (31.8%)	129.8 (7.5)		153.3 (6.5)		136.4 (6.6)	
	4	152 (15.1%)	48.3 (5.0)		52.8 (3.6)		41.5 (5.1)	
Resektionsstatus	R0	933 (92.9%)	135.6 (4.1)	<0.001	165.9 (3.7)	<0.001	160.0 (3.7)	<0.001
	R1	41 (4.1%)	50.9 (10.5)		53.6 (11.0)		36.9 (9.5)	
	R2	30 (3%)	26.1 (5.4)		26 (5.4)		21.5 (3.7)	
Lymphatische Invasion	nicht vorhanden	495 (49.3%)	141.2 (4.8)	<0.001	174.9 (4.3)	<0.001	175.8 (4.2)	<0.001
	vorhanden	509 (50.7%)	110.8 (5.7)		128.8 (5.3)		116.0 (5.3)	
Venöse Invasion	nicht vorhanden	871 (86.8%)	136.0 (4.2)	<0.001	166.6 (3.7)	<0.001	162.6 (3.8)	<0.001
	vorhanden	133 (13.2%)	74.9 (9.1)		79.06 (9.6)		63.3 (8.6)	
Perineurale Invasion	nicht vorhanden	937 (93.3%)	132.5 (4.1)	<0.001	161.9 (3.7)	<0.001	157.8 (3.7)	<0.001
	vorhanden	67 (6.7%)	50.4 (6.1)		50.4 (6.1)		35.1 (5.4)	
Mikrosatellitenstatus	MSS	849 (84.5%)	125.5 (4.2)	0.02	151.68 (4.0)	0.02	145.3 (4.0)	0.01
	MSI	155 (15.4%)	136.1 (8.0)		164.6 (7.2)		161.8 (7.2)	
Lokalisation	Coecum	147 (14.6%)	109.2 (6.9)	0.18	130.0 (6.2)	0.38	128.9 (6.8)	0.33
	Kolon ascendens	257 (25.6%)	120.0 (6.3)		142.6 (6.8)		132.4 (6.4)	
	Kolon transversum	82 (8.2%)	89.0 (8.6)		110.1 (9.1)		112.1 (9.4)	
	Kolon descendens	92 (9.2%)	128.1 (11.7)		143.3 (11.9)		143.1 (11.8)	
	Kolon sigmoideum	318 (31.7%)	136.6 (6.7)		162.4 (6.2)		156.2 (6.3)	
	Rektum	108 (10.7%)	103.9 (8.6)		119.9 (9.2)		110.2 (9.4)	

5.2 Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: Morphologische Subtypen des kolorektalen Karzinoms

5.2.1 Häufigkeit und Verteilung morphologischer KRK-Subtypen

Unter den 1004 reklassifizierten KRK machte das klassische Adenokarzinom NOS mit rund zwei Dritteln (n=630, 62.7%) den häufigsten morphologischen KRK Subtyp aus und diente in allen nachfolgenden statistischen Untersuchungen als Referenzgruppe, mit dem alle weiteren KRK Subtypen spezifisch verglichen wurden. Insgesamt ein Drittel aller KRK (n=374, 37%) konnten spezifischen histologischen Subtypen zugeordnet werden. Als häufigsten spezifischen Subtyp diagnostizierten wir den mikropapillären Subtyp (n=122, 12.2%), gefolgt vom Subtyp des serratierten Adenokarzinoms (n=87, 8.7%) und des muzinösen Adenokarzinoms (n=83, 8.2%). Dazu zeigte ein kleiner Teil der Adenokarzinome NOS eine muzinöse Partialdifferenzierung (n=69, 11%), wobei der Anteil der muzinösen Differenzierung hier nicht den geforderten Anteil von 50% des Gesamttumors erreichte und somit eine Einordnung als muzinöses Karzinom verhinderte.⁴

Insgesamt 33 KRK (3.2%) wurden der neu geschaffenen Kategorie der adenom-artigen Adenokarzinome zugeordnet. Als medulläres Karzinom wurden 32 Tumore (3.2%) klassifiziert und neun Neoplasien erfüllten die Kriterien eines Siegelringkarzinoms (0.9%). Sieben Karzinome zeigten das Bild eines groß- oder kleinzelligen neuroendokrinen Karzinoms, partiell untermischt mit Anteilen eines Adenokarzinoms und wurden somit der Gruppe der gemischten adenoneuroendokrinen Karzinome (MANEC) / neuroendokrinen Karzinome (NEC) zugeordnet. Ein singulärer Tumor wurde als undifferenziertes Kolonkarzinom gewertet, da er ein solides Wachstumsmuster ohne rhabdoide oder sarkomatoide Komponenten zeigte und immunhistochemisch lediglich einen Nachweis einer schwachen Expression von Breitspektrumszytokeratinen, bei Negativität für neuroendokrine Marker und alle gängigen intestinalen Transkriptionsfaktoren, aufwies. In unserer Kohorte konnten wir keine Karzinome den adenosquamösen Karzinomen oder den Karzinomen mit sarkomatoiden Komponenten zuordnen, was die bereits in der Literatur beschriebene Annahme ihrer geringen Inzidenz unterstützt.⁴ Die genaue Verteilung der spezifischen Subtypen auf die Gesamtkohorte ist in **Abbildung 9A** aufgeführt.

Nach der initialen Tumortypisierung überprüften wir noch die Robustheit bzw. Anwendbarkeit der histologischen Kriterien, die zur Diagnose der spezifischen Subtypen von der WHO-Klassifikation vorgegeben werden. Hierzu wurde im Rahmen einer explorativen Interobserver-Analyse einem dritten Pathologen, mit dem Schwerpunkt der gastrointestinalen Pathologie, 100 zufällig ausgewählte Fälle zur erneuten Bestimmung des

histologischen Subtyps vorgelegt. Wir konnten hierbei eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Subtyp-Klassifizierung ($p < 0.001$) zwischen den verschiedenen Untersuchern mit einem Kappen-Cohen Korrelationskoeffizienten von 0.84 nachweisen ⁴.

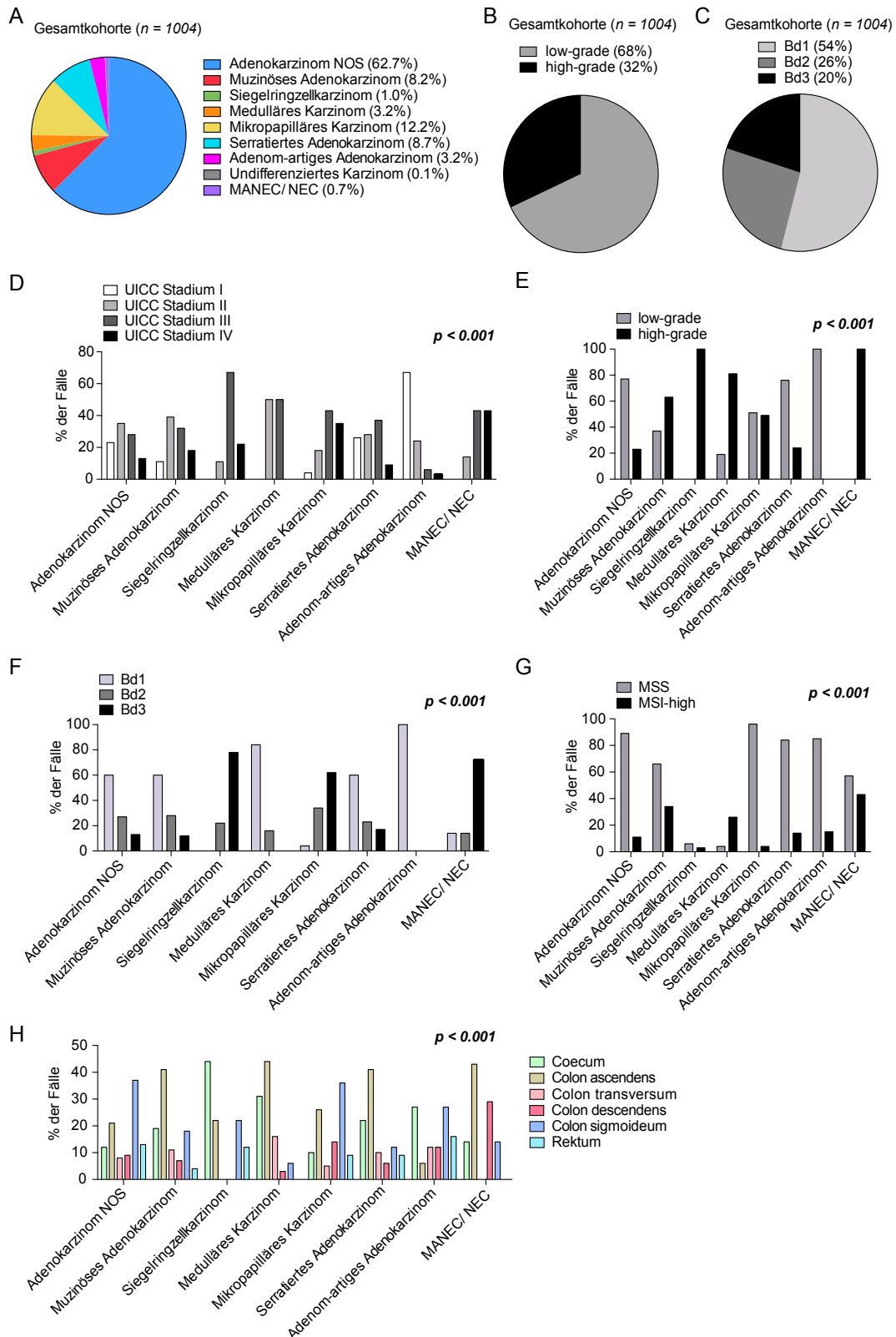


Abbildung 9: Darstellung der Häufigkeit der KRK Subtypen, des WHO-Gradings und des TBs in der Gesamtkohorte, sowie deren Korrelation mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern. Verteilung der KRK Subtypen (A), des WHO-Gradings (B) und des Tumor Buddings (C) in der Gesamtkohorte. Zusammenhang der KRK Subtypen mit den UICC-Stadien (D), dem WHO Grading (E), dem Tumor Budding (F), der MSS/MSI (G) und der Tumorlokalisation (H). Detaillierte Übersicht der Daten sind in den Tabelle 5, 7, 9 und 11 zu finden. (modifiziert nach ⁴)

5.2.2 Assoziation der histomorphologischen KRK Subtypen mit klinisch-pathologischen Parametern

Es zeigte sich eine sehr starke statistische Assoziation zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen und den gängigen klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors und dem Tumorstadium, die je nach spezifischem Subtyp unterschiedlich ausgeprägt waren.

Während medulläre Karzinome statistisch häufiger bei Frauen und älteren Patienten diagnostiziert wurden, wurden adenom-artige Adenokarzinome signifikant häufiger bei Männern und der jüngeren Altersgruppe nachgewiesen⁴. Das serratierte Adenokarzinom zeigte ebenfalls eine Tendenz für Patienten im fortgeschrittenen Alter, während die restlichen Subtypen keine Präferenzen bezüglich Alter und Geschlecht aufwiesen.

Des Weiteren zeigte sich ebenso, wie in **Abbildung 9H** gezeigt, eine deutliche Prädilektion einzelner Subtypen bezogen auf die Tumorlokalisierung innerhalb des kolorektalen Systems. Insgesamt wurden spezifische Subtypen signifikant häufiger im rechten Kolon nachgewiesen, wobei hier insbesondere muzinöse, serratierte und siegelringzellige Adenokarzinome zu nennen sind⁴. Das klassische Adenokarzinom NOS war rechtsseitig im Vergleich zum linken Kolon unterrepräsentiert ($p < 0.001$). Außerdem zeigte sich auch für das medulläre Karzinom eine deutliche Tendenz zum rechten Kolon, während bei den übrigen Subtypen keine Präferenz ersichtlich war.

Gut passend zu der in den nachfolgenden Überlebensanalysen (siehe **Kapitel 5.2.3**) untersuchten biologischen Aggressivität, zeigten sich ebenso hochgradig signifikante Unterschiede in der Distribution der einzelnen Subtypen zum pTNM-Stadium und den UICC-Stadien ($p < 0.001$). Spezifische Subtypen wie Siegelringzellkarzinome, MANEC/NEC und mikropapilläre Adenokarzinome wurden häufiger in den fortgeschrittenen UICC-Stadien III und IV gefunden und waren somit gleichfalls mit dem Vorliegen einer Fern- oder zumindest einer nodalen Metastasierung assoziiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich der adenom-artige Subtyp vor allem in den UICC-Stadien I und II (siehe **Abbildung 9D**). Medulläre Adenokarzinome und muköse Adenokarzinome wiesen häufig fortgeschrittene pT-Stadien auf, konnten konträr dazu aber keine Neigung zu einer nodalen Metastasierung oder Fernmetastasierung zeigen.⁴

Des Weiteren konnten deutliche Unterschiede zwischen den KRK Subtypen, bezogen auf den Mikrosatellitenstatus und somit auch auf die zu Grunde liegende molekularbiologische Genese der Tumoren, gefunden werden ($p < 0.001$). Während medulläre Karzinome nahezu immer und muzinöse Adenokarzinome sehr häufig mikrosatelliteninstabil waren, waren mikropapilläre Adenokarzinome, serratierte Karzinome und adenom-artige Adenokarzinome, wie in **Abbildung 9G** ersichtlich, nur selten mikrosatelliteninstabil⁴. Die detaillierte Verteilung der

histologischen Subtypen bezogen auf die beschriebenen klinisch-pathologischen Parameter ist der **Tabelle 5** zu entnehmen.

5.2.3 Prognostische Relevanz histologischer KRK Subtypen in univariaten Überlebensanalysen

In den durchgeführten orientierenden univariaten Überlebensanalysen in der Gesamtkohorte zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich des Verlaufs zwischen den verschiedenen Subtypen bezogen auf das Gesamt- (OS), das krankheitsspezifische (DSS) und das progressionsfreie Überleben (DFS; jeweils $p < 0.001$, **Tabelle 6, Abbildung 10**).

Wir konnten Subtypen wie das adenom-artige (DSS: 170.6 Monaten) oder das medulläre Karzinom (DSS: 188 Monaten) identifizieren, die insgesamt mit einer sehr guten Prognose assoziiert waren und in unserer Kohorte teilweise ein fast 100% progressionsfreies Überleben aufwiesen. Dem gegenübergestellt identifizierten wir allerdings auch ungünstigere Subtypen wie das mikropapilläre Adenokarzinom (DSS: 88.4 Monaten) oder das siegelringzellige Adenokarzinom (DSS: 65.4 Monaten), welche mit deutlich verkürzten Überlebenszeiten einhergingen.⁴ Einzelne Varianten wie die Gruppe der neuroendokrinen Karzinome (MANEC/NEC) (DSS: 18 Monaten) oder das undifferenzierte Karzinom (DSS: 3.9 Monaten) zeigten einen hochgradig aggressiven Verlauf mit einer mittleren Überlebenszeit von nur wenigen Monaten. Das konventionelle Adenokarzinom NOS (DSS: 164.7 Monaten) zeigte einen, verglichen mit den anderen Subtypen, prognostisch intermediären Verlauf, von dem auch der serratierte (DSS: 141.7 Monaten) und der muzinöse Subtyp (DSS: 118.2 Monaten) keine signifikanten Abweichungen zeigten.

Wie in **Abbildung 10** und in **Tabelle 6** nochmals detaillierter veranschaulicht, konnte diese starke prognostische Demarkation auch in wichtigen klinisch-pathologischen Subgruppen nachgewiesen werden. Der prognostische Impact der verschiedenen Subtypen war über alle Tumorstadien erhalten und identifizierte beispielsweise in niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) klinisch aggressiv verlaufende Karzinome als auch in höheren Tumorstadien (UICC III/IV) prognostisch eher günstig verlaufende Karzinome. In **Abbildung 10B** ist beispielhaft das krankheitsfreie Überleben der Subtypen im UICC-Stadium II gezeigt, wobei sich auch hier das medulläre (DFS: 187.8 Monaten) und das adenom-artige Adenokarzinom (DFS: 156.9 Monaten) im Vergleich zu dem mikropapillären Adenokarzinom (DFS: 82 Monaten) als prognostisch günstiger präsentierten. Ähnlich war dies der Fall bezogen auf den Mikrosatellitenstatus, wo auch bei mikrosatelliteninstabilen Karzinomen (**Abbildung 10F**) ein gleichartig ungünstiger Verlauf für die KRK Subtypen gezeigt werden konnte, die auch in mikrosatellitenstabilen Karzinomen (**Abbildung 10E**) einen aggressiven Verlauf aufwiesen.⁴

	n	Adenokarzinom NOS	Muzinöses Adenokarzinom	Siegelringzellkarzinom	Medulläres Adenokarzinom	Mikropapilläres Adenokarzinom	Serratiertes Adenokarzinom	Adenom-artiges Adenokarzinom	Undifferenziertes Karzinom	MANEC/NEC	p-Wert
Alter	1004 (100%)	630 (62.7%)	83 (8.2%)	9 (1%)	32 (3.2%)	122 (12.2%)	87 (8.7%)	33 (3.2%)	1 (0.1%)	7 (0.7%)	
Unterhalb des Medians	492 (49%)	327 (66.5%)	40 (8.1%)	4 (0.8%)	7 (1.4%)	56 (11.4%)	34 (6.9%)	20 (4.1%)	0	4 (0.8%)	0.018
Oberhalb des Medians	512 (51%)	303 (59.2%)	43 (8.4%)	5 (1%)	25 (4.9%)	66 (12.9%)	53 (10.4%)	13 (2.5%)	1 (0.2%)	3 (0.6%)	
Geschlecht	575 (57.3%)	369 (64.2%)	46 (8%)	5 (0.9%)	8 (1.4%)	74 (12.9%)	45 (7.8%)	25 (4.3%)	0	3	0.004
männlich	429 (42.7%)	261 (60.8%)	37 (8.6%)	4 (0.9%)	24 (5.6%)	48 (11.2%)	42 (9.8%)	8 (1.9%)	1 (0.2%)	4 (0.9%)	
pT	1	56 (71.8%)	2 (2.6%)	0	0	2 (2.6%)	7 (9%)	11 (14.1%)	0	0	<0.001
2	182 (18.1%)	123 (67.6%)	10 (5.5%)	0	2 (1.1%)	12 (6.6%)	23 (12.6%)	11 (6%)	0	1 (0.5%)	
3	555 (55.3%)	351 (63.2%)	45 (8.1%)	6 (1.1%)	22 (4%)	72 (13%)	44 (7.9%)	9 (1.6%)	1 (0.2%)	5 (0.9%)	
4	189 (18.8%)	100 (52.9%)	26 (13.8%)	3 (1.6%)	8 (4.2%)	36 (19%)	13 (6.9%)	2 (1.1%)	0	1 (0.5%)	
pN	0	384 (69.6%)	43 (7.8%)	1 (0.2%)	17 (3.1%)	30 (5.4%)	47 (8.5%)	29 (5.3%)	0	1 (0.2%)	<0.001
1	284 (28.3%)	167 (58.8%)	23 (8.1%)	2 (0.7%)	9 (3.2%)	47 (16.5%)	31 (10.9%)	4 (1.4%)	0	1 (0.4%)	
2	168 (16.7%)	79 (47%)	17 (10.1%)	6 (3.6%)	6 (3.6%)	45 (26.8%)	9 (5.4%)	0	1 (0.6%)	5 (3%)	
pM	0	550 (64.6%)	68 (8%)	7 (0.8%)	32 (3.8%)	79 (9.3%)	79 (3.8%)	32 (3.8%)	1 (0.1%)	4 (0.5%)	<0.001
1	152 (15.1%)	80 (52.6%)	15 (9.9%)	2 (1.3%)	0	43 (28.3%)	8 (5.3%)	1 (0.7%)	0	3 (2%)	
UICC Stadium	1	148 (71.5%)	9 (4.3%)	0	0	5 (2.4%)	23 (11.1%)	22 (10.6%)	0	0	<0.001
2	326 (32.5%)	222 (68.1%)	32 (9.8%)	1 (0.3%)	16 (4.9%)	22 (6.7%)	24 (7.4%)	8 (2.5%)	0	1 (0.9%)	
3	319 (31.8%)	180 (56.4%)	27 (8.5%)	6 (1.9%)	16 (5%)	52 (16.3%)	32 (10%)	2 (0.6%)	1 (0.3%)	3 (0.9%)	
4	152 (15.1%)	80 (52.6%)	15 (9.9%)	2 (1.3%)	0	43 (28.3%)	8 (5.3%)	1 (0.7%)	0	3 (2%)	
Lymphatische Invasion	495 (49.3%)	346 (69.9%)	41 (8.3%)	1 (0.2%)	12 (2.4%)	24 (4.8%)	43 (8.7%)	28 (5.7%)	0	0	<0.001
nicht vorhanden	509 (50.7%)	284 (55.8%)	42 (8.3%)	8 (1.6%)	20 (3.9%)	98 (19.3%)	44 (8.6%)	5 (1%)	1 (0.2%)	7 (1.4%)	
Venöse Invasion	871 (86.8%)	562 (64.5%)	75 (8.6%)	9 (1%)	31 (3.6%)	81 (9.3%)	77 (8.8%)	33 (3.8%)	1 (0.1%)	2 (0.2%)	<0.001
nicht vorhanden	133 (13.2%)	68 (51.1%)	8 (6%)	0	1 (0.8%)	41 (30.8%)	10 (7.5%)	0	0	5 (3.8%)	
Perineurale Invasion	937 (93.3%)	594 (63.4%)	81 (8.6%)	8 (0.9%)	32 (3.4%)	101 (10.8%)	80 (8.5%)	33 (3.5%)	1 (0.1%)	7 (0.7%)	<0.001
nicht vorhanden	67 (6.7%)	36 (53.7%)	2 (3%)	1 (1.5%)	0	21 (31.3%)	7 (10.4%)	0	0	0	
Resektionsstatus	R0	593 (63.6%)	76 (8.1%)	8 (0.9%)	32 (3.4%)	104 (11.1%)	80 (8.6%)	33 (3.5%)	1 (0.1%)	6 (0.6%)	0.024
R1	41 (4.1%)	23 (56.1%)	4 (9.8%)	0	0	8 (19.5%)	6 (14.6%)	0	0	0	
R2	30 (3%)	14 (46.7%)	3 (10%)	1 (3.3%)	0	10 (33.3%)	1 (3.3%)	0	0	1 (3.3%)	
Mikrosatellitenstatus	MSS	562 (66.2%)	55 (6.5%)	6 (0.7%)	4 (0.5%)	117 (13.8%)	73 (8.6%)	28 (3.3%)	0	4 (0.5%)	<0.001
MSI	155 (15.4%)	68 (43.9%)	28 (18.1%)	3 (1.9%)	28 (18.1%)	5 (3.2%)	14 (9%)	5 (3.2%)	1 (0.6%)	3 (1.9%)	
Lokalisation	Coecum	147 (14.6%)	16 (10.9%)	4 (2.7%)	10 (6.8%)	12 (8.2%)	19 (12.9%)	9 (6.1%)	0	1 (0.7%)	<0.001
Ascendens	257 (25.6%)	133 (51.8%)	34 (13.2%)	2 (0.8%)	14 (5.4%)	32 (12.5%)	36 (14%)	2 (0.8%)	1 (0.4%)	3 (1.2%)	
Transversum	82 (8.2%)	49 (59.8%)	9 (11%)	0	5 (6.1%)	6 (7.3%)	9 (11%)	4 (4.9%)	0	0	
Descendens	92 (9.2%)	57 (62%)	6 (6.5%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)	17 (18.5%)	5 (5.4%)	4 (4.3%)	0	2 (2.2%)	
Sigmoid	318 (31.7%)	235 (73.9%)	15 (4.7%)	2 (0.6%)	2 (0.6%)	44 (13.8%)	10 (3.1%)	9 (2.8%)	0	1 (0.3%)	
Rektum	108 (10.8%)	80 (74.1%)	3 (2.8%)	1 (0.9%)	0	11 (10.2%)	8 (7.4%)	5 (4.6%)	0	0	

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung ausgewählter histologischer KRK Subtypen bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation. (modifiziert nach 4)

Tabelle 6: KRK Subtypen der Gesamtkohorte (n = 1004) geordnet nach UICC Stadien (I-IV) und Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten. (modifiziert nach ⁴)

		n (%)	Mittleres Gesamtüberleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben (SE)	p-Wert
Gesamtkohorte	Subtyp			<0.001		<0.001		<0.001
	Adenokarzinom NOS	630 (62.7%)	137.2 (3.9)		164.7 (4.4)		159.7 (4.4)	
	Muzinöses Adenokarzinom	83 (8.2%)	100.4 (9.0)		118.2 (9.4)		109.2 (9.7)	
	Siegelringzellkarzinom	9 (0.9%)	65.5 (28.3)		65.4 (28.3)		40.2 (23.8)	
	Medulläres Adenokarzinom	32 (3.2%)	147.9 (13.5)		188.0 (6.5)		181.5 (8.9)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	122 (12.2%)	79.1 (9.0)		88.4 (9.7)		76.6 (9.5)	
	Serratiertes Adenokarzinom	87 (8.7%)	119.6 (10.4)		141.7 (10.0)		133.7 (5.5)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	33 (3.2%)	132.0 (12.3)		170.6 (7.9)		176.8 (5.5)	
	Undifferenziertes Karzinom	1 (0.1%)	3.9 (0)		3.9 (0)		2.0 (0)	
	MANEC/NEC	7 (0.7%)	18.0 (8.1)		18.0 (8.1)		17.5 (9.3)	
UICC Stadium I	Subtyp			0.539		0.003		0.002
	Adenokarzinom NOS	148 (71.5%)	146.2 (6.5)		174.8 (4.8)		172.7 (5.0)	
	Muzinöses Adenokarzinom	9 (4%)	125.9 (29.7)		158.2 (18.7)		157.3 (19.4)	
	Siegelringzellkarzinom	0						
	Medulläres Adenokarzinom	0						
	Mikropapilläres Adenokarzinom	5 (2.5%)	80.5 (25.7)		80.5 (25.7)		55.7 (25.7)	
	Serratiertes Adenokarzinom	23 (11%)	156.4 (17.0)		190.8 (8.9)		162.4 (20.7)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	22 (11%)	133.2 (14.8)		174.1 (7.8)		173.5 (8.6)	
	Undifferenziertes Karzinom	0						
	MANEC/NEC	0						
UICC Stadium II	Subtyp			0.013		<0.001		<0.001
	Adenokarzinom NOS	222 (68%)	144.3 (7.2)		173.2 (6.8)		178.5 (6.0)	
	Muzinöses Adenokarzinom	32 (10%)	93.9 (12.3)		115.0 (13.3)		116.7 (14.1)	
	Siegelringzellkarzinom	1 (0.5%)	3 (0)		3 (0)		3 (0)	
	Medulläres Adenokarzinom	16 (5%)	141.8 (19.7)		187.8 (4.8)		187.8 (4.8)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	22 (7%)	71.4 (17.0)		76.16 (15.4)		82.0 (16.6)	
	Serratiertes Adenokarzinom	24 (7.5%)	105.9 (17.0)		122.7 (16.9)		105.2 (17.5)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	8 (2.5%)	135.2 (26.5)		156.9 (0)		156.9 (0)	
	Undifferenziertes Karzinom	0						
	MANEC/NEC	1 (0.5%)	56.2 (0)		56.23 (0)		56.2 (0)	
UICC Stadium III	Subtyp			0.002		<0.001		<0.001
	Adenokarzinom NOS	180 (56%)	127.4 (9.4)		149.7 (8.7)		137.3 (8.7)	
	Muzinöses Adenokarzinom	27 (9%)	129.5 (15.7)		150.4 (13.5)		123.2 (16.6)	
	Siegelringzellkarzinom	6 (2%)	18.5 (6.5)		18.5 (6.5)		14.3 (5.6)	
	Medulläres Adenokarzinom	16 (5%)	118.1 (11.4)		132.4 (7.7)		124.6 (10.3)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	52 (16%)	120.2 (16.0)		135.5 (15.9)		101.4 (15.9)	
	Serratiertes Adenokarzinom	32 (10%)	101.2 (12.4)		113.6 (12.5)		110.9 (13.3)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	2 (0.5%)	alle Fälle zensiert		alle Fälle zensiert		alle Fälle zensiert	
	Undifferenziertes Karzinom	1 (0.5%)	2.03 (0)		2.03 (0)		2.03 (0)	
	MANEC/NEC	3 (1%)	15.41 (7.2)		15.4 (7.2)		7.6 (2.7)	
UICC Stadium IV	Subtyp			0.002		0.002		0.39
	Adenokarzinom NOS	80 (53.5%)	56.7 (7.5)		64.1 (8.1)		43.9 (7.2)	
	Muzinöses Adenokarzinom	15 (10%)	53.3 (14.8)		53.3 (14.8)		42.8 (13.8)	
	Siegelringzellkarzinom	2 (1%)	78.1 (49.7)		78.1 (49.7)		78.1 (49.7)	
	Medulläres Adenokarzinom	0						
	Mikropapilläres Adenokarzinom	43 (28%)	26.6 (4.4)		28.2 (4.8)		23.9 (4.4)	
	Serratiertes Adenokarzinom	8 (5%)	31.3 (12.7)		31.3 (12.7)		35.2 (15.1)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	1 (0.5%)	34.6 (0)		34.6 (0)		34.6 (0)	
	Undifferenziertes Karzinom	0						
	MANEC/NEC	3 (2%)	5.0 (3.7)		5.0 (3.7)		5.0 (3.7)	
MSS	Subtyp			<0.001		<0.001		<0.001
	Adenokarzinom NOS	562 (66%)	134.6 (5.2)		162.1 (4.7)		156.1 (4.7)	
	Muzinöses Adenokarzinom	55 (6%)	94.0 (10.9)		111.4 (11.6)		101.1 (11.9)	
	Siegelringzellkarzinom	6 (1%)	15.1 (7.4)		15.1 (7.4)		12.3 (6.2)	
	Medulläres Adenokarzinom	4 (0.5%)	159.6 (0)		159.6 (0)		156.6 (0)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	117 (14%)	79.6 (9.1)		89.13 (9.9)		77.0 (9.7)	
	Serratiertes Adenokarzinom	73 (8.5%)	113.7 (11.3)		137.7 (11.1)		133.8 (11.4)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	28 (3%)	138.3 (13.2)		175.7 (6.5)		168.9 (9.1)	
	Undifferenziertes Karzinom	0						
	MANEC/NEC	4 (0.5%)	9.2 (4.9)		9.2 (4.9)		8.0 (3.2)	
MSI	Subtyp			0.08		<0.001		<0.001
	Adenokarzinom NOS	58 (42.5%)	145.9 (11.8)		169.7 (10.7)		169.2 (10.7)	
	Muzinöses Adenokarzinom	28 (18%)	111.3 (15.4)		128.4 (15.6)		121.9 (15.7)	
	Siegelringzellkarzinom	3 (2%)	82.1 (46.9)		82.1 (46.9)		82.1 (46.9)	
	Medulläres Adenokarzinom	28 (18%)	142.6 (14.8)		187.0 (7.4)		179.1 (10.3)	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	5 (3%)	38.5 (14.6)		38.5 (14.6)		38.5 (14.6)	
	Serratiertes Adenokarzinom	14 (9%)	132.5 (18.5)		140.7 (17.8)		121.2 (19.4)	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	5 (3%)	98.8 (26.6)		139.7 (28.4)		180 (0)	
	Undifferenziertes Karzinom	1 (0.5%)	3.9 (0)		3.9 (0)		3.9 (0)	
	MANEC/NEC	3 (2%)	38.4 (8.0)		38.4 (8.0)		38.4 (8.0)	

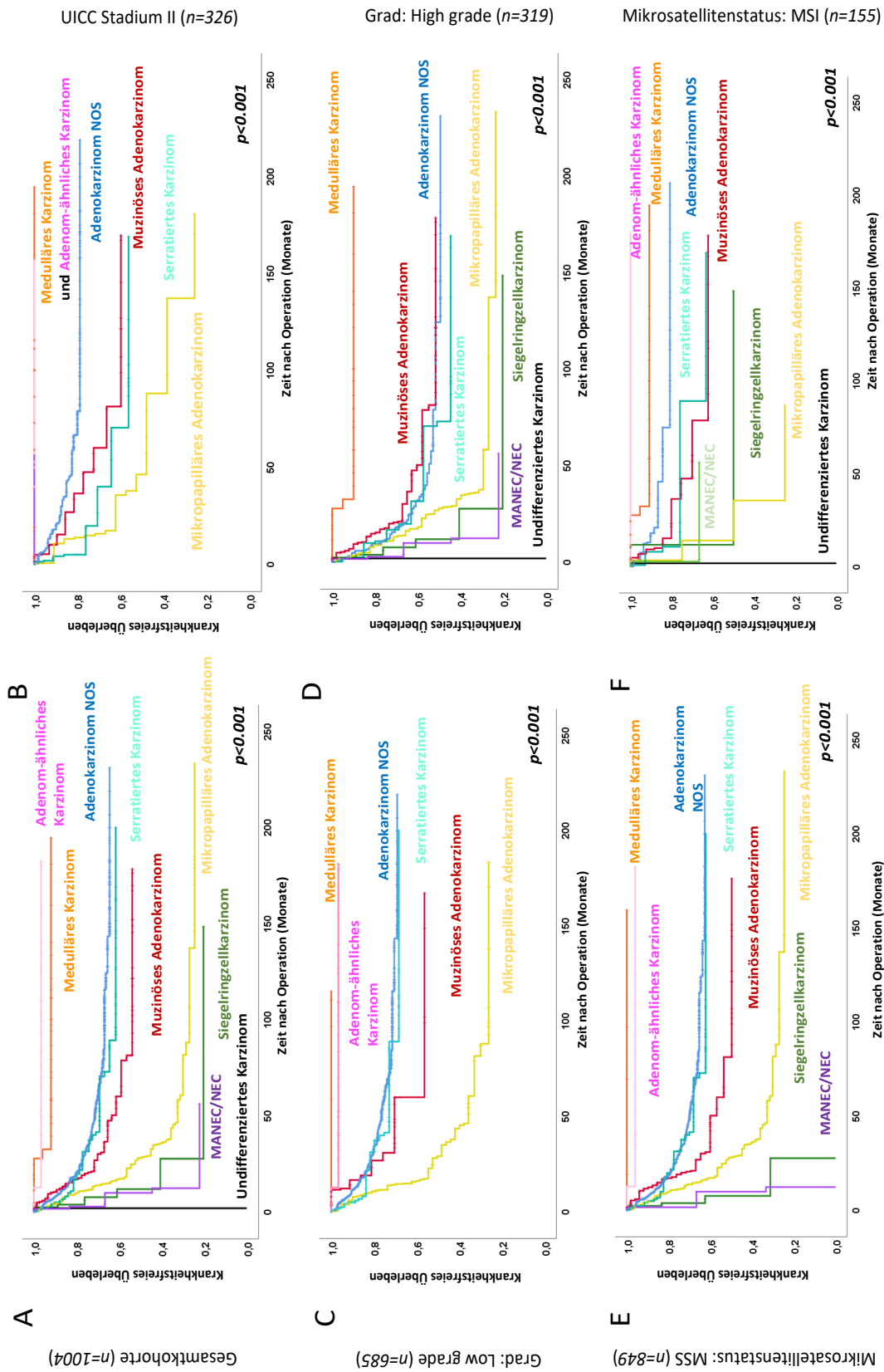


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zum krankheitsfreien Überleben der KRK Subtypen innerhalb der Gesamtkohorte (A), des UICC Stadiums II (B), der WHO low-grade (C) und der high-grade Subkohorte (D) als auch in der MSS (E) und der MSI (F) Gruppe. Details siehe unter anderem Tabelle 6. (modifiziert nach ⁴⁾)

5.3 Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: WHO Grading

5.3.1 Häufigkeit und Verteilung von low- und high-grade Karzinomen

Gemäß der von der WHO-Klassifikation vorgegebenen Kriterien wurden alle 1004 Karzinome neu graduiert und in low-grade (>50% Drüsenausbildung; G1/G2 nach altem Gradingssystem) und high-grade Karzinome unterteilt (<50% Drüsenbildung; G3 nach altem Gradingssystem). Insgesamt konnten wir somit 685 KRK der low-grade Kategorie (68.2%) und 319 KRK (31.8%) der high-grade Gruppe zuordnen (siehe **Abbildung 9B** und **Tabelle 7**).

5.3.2 Assoziation des WHO Gradings mit klinisch-pathologischen Parametern

Das WHO Grading wies, ähnlich wie die KRK Subtypen, eine starke Assoziation mit bestimmten klinisch-pathologischen Parametern auf. Im Vergleich zu low-grade Tumoren zeigten, wie in **Tabelle 7** ersichtlich, high-grade KRK eine signifikante Assoziation zu höheren pT-, pN- und pM-Stadien und ebenso zum daraus kumulativ abgeleiteten UICC-Stadium ($p < 0.001$)⁴. Im UICC-Stadium I gehörten beispielsweise nur 14% der KRK der high-grade Gruppe an, während im UICC-Stadium IV bereits 55.3% der KRK den high-grade Karzinomen zugeordnet werden konnten. Weiterhin zeigte sich mit 46.5% eine signifikante Anreicherung von high-grade Karzinomen in der Gruppe der mikrosatelliteninstabilen Karzinomen im Vergleich zu 29.1% an high-grade KRK in der Gruppe der mikrosatellitenstabilen Karzinomen ($p < 0.001$)⁴. Es wurden keine Assoziation zu Alter, Geschlecht oder Tumorlokalisation gefunden.

5.3.3 Prognostische Relevanz des WHO Gradings in univariaten Überlebensanalysen

In der orientierenden Überlebensanalyse der Gesamtkohorte zeigte sich für das WHO Grading insgesamt eine starke prognostische Demarkation, wie auch in **Abbildung 12B** und **Tabelle 8** dargestellt, für alle drei untersuchten Überlebensparameter (OD/DSS/DFS jeweils $p < 0.001$)⁴. Dies konnte allerdings bei spezifischen Subgruppen-Analysen nicht bestätigt werden. Bei der Untersuchung des WHO Gradings in mikrosatellitenstabilen und mikrosatelliteninstabilen Karzinomen konnten wir nachweisen, wie in **Tabelle 8** ersichtlich, dass die prognostische Demarkation nur in MSS-Karzinomen (OS/DSS/DFS, $p < 0.001$), nicht aber in MSI Karzinomen auffindbar war (OS: $p = 0.09$, DSS: $p = 0.11$, DFS: 0.14). Ebenso zeigte sich keine prognostische Signifikanz des WHO Gradings in früheren UICC-Stadien (DSS UICC I: $p = 0.95$, UICC II: $p = 0.65$), während in höheren UICC-Stadien zumindest eine gute Diskrimination der Prognosegruppen sichtbar war (DSS: UICC III: $p = 0.002$, UICC IV: $p = 0.01$).⁴

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung des WHO Gradings (low-grade/ high-grade) bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation.

	n	WHO Grading low	WHO Grading high	p-Wert
	1004 (100%)	685 (68.2%)	319 (31.8%)	
Alter				< 0.9
unter Median	492 (49.0%)	335 (68.1%)	157 (31.9%)	
über Median	512 (51.0%)	350 (68.4%)	162 (31.6%)	
Geschlecht				< 0.1
männlich	575 (57.3%)	404 (70.3%)	171 (29.7%)	
weiblich	429 (42.7%)	281 (65.5%)	148 (34.5%)	
pT				< 0.001
1	78 (7.8%)	66 (84.6%)	12 (15.4%)	
2	182 (18.1%)	144 (79.1%)	38 (20.9%)	
3	555 (55.3%)	375 (67.6%)	180 (32.4%)	
4	189 (18.8%)	100 (52.9%)	89 (47.1%)	
pN				< 0.001
0	552 (55%)	432 (78.3%)	120 (21.7%)	
1	284 (28.3%)	186 (65.5%)	98 (34.5%)	
2	168 (16.7%)	67 (39.9%)	101 (60.1%)	
pM				< 0.001
0	852 (84.9%)	616 (72.3%)	236 (27.7%)	
1	152 (15.1%)	69 (45.4%)	83 (54.6%)	
UICC-Stadium				< 0.001
I	207 (20.6%)	178 (86.0%)	29 (14.0%)	
II	326 (32.5%)	241 (73.9%)	85 (26.1%)	
III	319 (31.8%)	198 (62.1%)	121 (37.9%)	
IV	152 (15.1%)	68 (44.7%)	84 (55.3%)	
Lymphatische Invasion				< 0.001
nicht anwesend	495 (49.3%)	395 (79.8%)	100 (55.3%)	
anwesend	509 (50.7%)	290 (57.0%)	219 (43.0%)	
Venöse Invasion				< 0.001
nicht anwesend	871 (86.8%)	622 (71.4%)	249 (28.6%)	
anwesend	133 (13.2%)	63 (47.4%)	70 (52.6%)	
Perineurale Invasion				< 0.68
nicht anwesend	937 (93.3%)	641 (68.4%)	296 (31.6%)	
anwesend	67 (6.7%)	44 (65.7%)	23 (34.3%)	
Resektionsabstand				< 0.001
R0	933 (92.9%)	656 (70.3%)	277 (29.7%)	
R1	41 (4.1%)	17 (41.5%)	24 (58.5%)	
R2	30 (3.0%)	12 (40.0%)	18 (60.0%)	
Mikrosatellitenstatus				< 0.001
MSS	849 (84.6%)	602 (70.9%)	247 (29.1%)	
MSI	155 (15.4%)	83 (53.5%)	72 (46.5%)	
Lokalisation				< 0.39
Coecum	147 (14.6%)	93 (63.3%)	54 (36.7%)	
Kolon ascendens	257 (25.6%)	169 (65.8%)	88 (34.2%)	
Kolon transversum	82 (8.2%)	57 (69.5%)	25 (30.5%)	
Kolon descendens	92 (9.2%)	69 (75.0%)	23 (25.0%)	
Kolon sigmoideum	318 (31.7%)	224 (70.4%)	94 (29.6%)	
Rektum	108 (10.8%)	73 (67.6%)	35 (32.4%)	

Tabelle 8: Verteilung des WHO Gradings innerhalb der Gesamtkohorte, der UICC-Stadien (I-IV) und des Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten.

		n (%)	Mittleres Gesamtüberleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben (SE)	p-Wert
Gesamtkohorte	WHO Grading			<0.001		<0.001		<0.001
	low-grade	685 (68.2%)	135.4 (4.3)		162.1 (4.0)		155.2 (4.0)	
	high-grade	319 (31.8%)	104.0 (6.3)		126.5 (6.4)		121.4 (6.6)	
UICC Stadium I	WHO Grading			0.26		0.95		0.39
	low-grade	178 (86.0%)	149.9 (6.4)		178.9 (4.9)		174.0 (5.3)	
	high-grade	29 (14.0%)	127.8 (14.8)		172.2 (10.5)		178.8 (8.7)	
UICC Stadium II	WHO Grading			0.35		0.65		0.34
	low-grade	241 (73.9%)	136.8 (7.1)		164.4 (7.1)		172.1 (6.2)	
	high-grade	85 (26.1%)	115.5 (9.3)		144.3 (9.2)		142.7 (9.5)	
UICC Stadium III	WHO Grading			0.03		0.002		0.01
	low-grade	198 (62.1%)	129 (7.2)		148.0 (6.5)		129.7 (6.9)	
	high-grade	121 (37.9%)	118 (10.1)		130.3 (10.3)		117.1 (10.5)	
UICC Stadium IV	WHO Grading			0.009		0.01		0.11
	low-grade	68 (44.7%)	53.6 (7.0)		59.7 (7.4)		45.9 (7.2)	
	high-grade	84 (55.3%)	38.7 (5.9)		41.5 (6.4)		35.0 (6.4)	
MSS	WHO Grading			<0.001		<0.001		<0.001
	low-grade	602 (70.9%)	132.8 (4.6)		159.9 (4.3)		152.1 (4.3)	
	high-grade	247 (29.1%)	97 (6.7)		113.6 (7.2)		107.7 (7.4)	
MSI	WHO Grading			0.09		0.11		0.14
	low-grade	83 (53.5%)	148.9 (11.1)		171.2 (10.2)		170.3 (9.7)	
	high-grade	72 (46.5%)	118.7 (10.4)		146.8 (9.9)		143.2 (10.2)	

5.4 Analyse der zentralen Parameter der WHO-Klassifikation: Tumor Budding

5.4.1 Häufigkeit und Verteilung der ITBCC-Subgruppen

Gemäß der ITBCC Kriterien³⁰ zeigten 545 der 1004 untersuchten KRK eine geringe Tumor Budding Aktivität. Die Zuordnung erfolgte somit der niedrig-gradigen Bd1-Subgruppe (Bd1: 54%). Zweihundertzweiundsechzig zeigten eine intermediäre Tumor Budding Aktivität mit einem Nachweis von 5-9 Tumor Buds an der Invasionsfront und wurden folgend in die Bd2-Subgruppe eingeordnet (Bd2: 26%). Einhundertsiebenundneunzig KRK zeigten ein stark dissoziatives Wachstumsmuster mit Nachweis von mehr als zehn Tumor Buds an der Invasionsfront und konnten somit der hohen Tumor Budding-Kategorie Bd3 zugeordnet werden (Bd3: 20%) (siehe **Abbildung 9C und Tabelle 9**).

5.4.2 Assoziation des Tumor Buddings gemäß ITBCC mit klinisch-pathologischen Parametern

Das Ausmaß der Tumor Budding Aktivität zeigte eine sehr starke Assoziation mit nahezu allen klinisch-pathologischen Parametern. Während Tumoren aus der Bd1-Gruppe, wie in **Tabelle 9** ersichtlich, akzentuiert in niedrigen pTNM-Stadien bzw. niedrigen UICC-Stadien zu finden waren, zeigten sich Karzinome der Bd2/3-Gruppen zumeist als lokal fortgeschrittene, häufig nodal- oder fernmetastasierte Tumoren, die entsprechend wesentlich häufiger in hohen Tumorstadien zu finden waren ($p < 0.001$)⁴. Ebenso stellten wir einen signifikant höheren Anteil an lymphatischer, venöser und perineuraler Invasion in den Bd2/Bd3-Subgruppen im Vergleich zur Bd1-Gruppe fest, wobei hier insbesondere das Vorkommen einer venösen oder perineuralen Invasion in der Bd3-Gruppe hervorsteht ($p < 0.001$). Ebenso zeigte sich eine starke Anreicherung von Tumoren der Bd2/3 Gruppen bei mikrosatellitenstabilen Tumoren bzw. eine deutliche Überrepräsentation der Bd1 Gruppe bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren⁴. Es wurden keine Assoziationen des Tumor Buddings zu Alter, Geschlecht und Lokalisation der untersuchten KRK gefunden.

5.4.3 Prognostische Relevanz des Tumor Buddings gemäß UICC in univariaten Überlebensanalysen

Die drei separaten Tumor Budding Subgruppen gemäß UICC erwiesen sich als äußerst starke prognostische Faktoren in der orientierenden univariaten Log-Rank Analyse der Gesamtkohorte (siehe **Abbildung 12A**) in allen untersuchten Überlebensparametern (OS/DFS/DSS: $p < 0.001$)⁴. Beispielhaft aufgeführt zeigte sich, wie in **Tabelle 10** detaillierter

dargestellt, ein DSS von 192.3 Monaten in der Bd1 Subgruppe, welches 130.6 Monaten in der Bd2 und 56.2 Monaten in der Bd3 Gruppe gegenüberstand.

In allen weiteren Analysen der Subgruppen erwiesen sich Tumor Budding bzw. die verschiedenen Tumor Budding-Kategorien als sehr starke prognostische Faktoren. Wie in **Tabelle 10** dargestellt zeigte sich in allen UICC-Stadien, gleich ob frühe Stadien oder sogar fernmetastasiert eine gleichartige prognostische Demarkation wie in der Gesamtkohorte (z.B. DSS: $p < 0.001$ für UICC I-IV). Ein ähnliches Bild zeigte sich ebenso bei der separaten Analyse von mikrosatelliteninstabilen und mikrosatellitenstabilen Karzinomen (z.B. DSS $p < 0.001$ für MSS/MSI-H KRK; siehe auch Kaplan-Meier-Kurve in **Abbildung 12E** und **F**).⁴

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung des Tumor Buddings (Bd1/ Bd2/ Bd3) bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation.

	n	Tumor Budding Bd1	Tumor Budding Bd2	Tumor Budding Bd3	p-Wert
	1004 (100%)	545 (54.3%)	262 (26.1%)	197 (19.6%)	
Alter					0.4
unter Median	492 (49.0%)	269 (54.7%)	134 (27.2%)	89 (18.1%)	
über Median	512 (51.0%)	276 (53.9%)	128 (25.0%)	108 (21.1%)	
Geschlecht					0.4
männlich	575 (57.3%)	314 (54.6%)	156 (27.1%)	105 (18.3%)	
weiblich	429 (42.7%)	231 (53.8%)	106 (24.7%)	92 (21.4%)	
pT					< 0.001
1	78 (7.8%)	64 (82.1%)	12 (15.4%)	2 (2.6%)	
2	182 (18.1%)	137 (75.3%)	33 (18.1%)	12 (6.6%)	
3	555 (55.3%)	286 (51.5%)	156 (28.1%)	113 (20.4%)	
4	189 (18.8%)	58 (30.7%)	61 (32.3%)	70 (37.0%)	
pN					< 0.001
0	552 (55%)	394 (71.4%)	105 (19.0%)	53 (9.6%)	
1	284 (28.3%)	119 (41.9%)	99 (34.9%)	66 (23.2%)	
2	168 (16.7%)	32 (19.0%)	58 (34.5%)	78 (46.4%)	
pM					< 0.001
0	852 (84.9%)	520 (61.0%)	209 (24.5%)	123 (14.4%)	
1	152 (15.1%)	25 (16.4%)	53 (24.5%)	74 (48.7%)	
UICC-Stadium					< 0.001
I	207 (20.6%)	173 (83.6%)	24 (11.6%)	10 (4.8%)	
II	326 (32.5%)	212 (65.0%)	76 (23.3%)	38 (11.7%)	
III	319 (31.8%)	135 (42.3%)	109 (34.2%)	75 (23.5%)	
IV	152 (15.1%)	25 (16.4%)	53 (34.9%)	74 (48.7%)	
Lymphatische Invasion					< 0.001
nicht anwesend	495 (49.3%)	358 (72.3%)	91 (18.4%)	46 (9.3%)	
anwesend	509 (50.7%)	187 (36.7%)	171 (33.6%)	151 (29.7%)	
Venöse Invasion					< 0.001
nicht anwesend	871 (86.8%)	519 (59.6%)	219 (25.1%)	133 (15.3%)	
anwesend	133 (13.2%)	26 (19.5%)	43 (32.3%)	64 (48.1%)	
Perineurale Invasion					< 0.001
nicht anwesend	937 (93.3%)	537 (57.3%)	237 (25.3%)	163 (17.4%)	
anwesend	67 (6.7%)	8 (11.9%)	25 (37.3%)	34 (50.7%)	
Resektionsabstand					< 0.001
R0	933 (92.9%)	535 (57.3%)	236 (25.3%)	162 (17.4%)	
R1	41 (4.1%)	7 (17.1%)	17 (41.5%)	17 (41.5%)	
R2	30 (3%)	3 (10.0%)	9 (30.0%)	18 (60.0%)	
Mikrosatellitenstatus					< 0.001
MSS	849 (84.6%)	435 (51.2%)	231 (27.2%)	183 (21.6%)	
MSI	155 (15.4%)	110 (71.0%)	31 (20.0%)	14 (9.0%)	
Lokalisation					0.7
Coecum	147 (14.6%)	80 (54.4%)	34 (23.1%)	33 (22.4%)	
Kolon ascendens	257 (25.6%)	142 (55.3%)	62 (24.1%)	53 (20.6%)	
Kolon transversum	82 (8.2%)	45 (54.9%)	18 (22.0%)	19 (23.2%)	
Kolon descendens	92 (9.2%)	49 (53.3%)	24 (26.1%)	19 (20.7%)	
Kolon sigmoideum	318 (31.7%)	175 (55.0%)	92 (28.9%)	51 (16.0%)	
Rektum	108 (10.8%)	54 (50.0%)	32 (29.6%)	22 (20.4%)	

Tabelle 10: Verteilung des Tumor Buddings innerhalb der Gesamtkohorte, der UICC-Stadien (I-IV) und des Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten.

	n (%)	Mittleres Gesamtüberleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben (SE)	p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben (SE)	p-Wert
Gesamtkohorte			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	545 (54%)	160.9 (4.4)		192.3 (3.4)		190.6 (3.3)	
Bd 2	262 (26%)	108.2 (8.0)		130.6 (7.2)		113.8 (7.2)	
Bd 3	197 (20%)	48.5 (4.6)		56.2 (5.4)		38.0 (5.3)	
UICC Stadium I			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	173 (84%)	155.4 (6.1)		187.7 (3.9)		185.4 (4.2)	
Bd 2	24 (11%)	130.2 (17.5)		150.5 (16.3)		153.1 (15.9)	
Bd 3	10 (5%)	26.6 (8.6)		38.1 (9.7)		25.0 (9.0)	
UICC Stadium II			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	212 (65%)	154.4 (7.3)		189.1 (6.2)		195.9 (5.0)	
Bd 2	76 (23%)	105.4 (10.5)		133.2 (11.1)		132.5 (11.3)	
Bd 3	38 (12%)	69.9 (12.5)		78.9 (13.6)		75.6 (13.7)	
UICC Stadium III			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	135 (42%)	149.9 (6.2)		163.6 (5.3)		155.9 (5.9)	
Bd 2	109 (34%)	115.4 (10.8)		135.2 (11.4)		105.6 (11.2)	
Bd 3	75 (24%)	64.2 (8.2)		77.8 (9.7)		63.4 (9.5)	
UICC Stadium IV			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	25 (16%)	92.0 (14.6)		104.3 (14.7)		94.8 (15.6)	
Bd 2	53 (35%)	54.7 (8.1)		58.8 (8.6)		43.0 (7.8)	
Bd 3	74 (49%)	20.9 (2.4)		21.6 (2.5)		15.6 (1.5)	
MSS			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	435 (51%)	159.0 (5.0)		190.8 (3.9)		190.3 (3.7)	
Bd 2	231 (27%)	108.0 (7.5)		128.7 (7.6)		108.2 (7.6)	
Bd 3	183 (22%)	49.2 (4.8)		57.0 (5.6)		49.4 (5.5)	
MSI			<0.001		<0.001		<0.001
<i>Tumor Budding</i>							
Bd 1	110 (71%)	151.1 (7.7)		177.3 (5.8)		171.8 (6.4)	
Bd 2	31 (20%)	104.6 (16.8)		132.5 (18.3)		142.4 (17.6)	
Bd 3	14 (9%)	36.1 (11.8)		32.7 (10.3)		24.7 (9.5)	

5.6 Interaktionen zwischen den histomorphologischen Subtypen des KRKs, der Tumor Budding Aktivität und dem WHO Grading

Im nächsten Schritt unserer Analyse untersuchten wir, inwieweit die oben beschriebenen histomorphologischen Parameter miteinander zusammenhängen bzw. inwiefern sie sich gegenseitig beeinflussen. Insgesamt zeigte sich eine sehr starke Assoziation zwischen den drei Parametern KRK Subtypen, WHO Grading und Tumor Budding ($p < 0.001$)⁴.

5.6.1 Häufigkeit und Verteilung der KRK Subtypen in Abhängigkeit der Tumor Budding Aktivität

Wir konnten eine sehr starke Korrelation zwischen der Tumor Budding Aktivität und den verschiedenen histologischen KRK Subtypen nachweisen ($p < 0.001$)⁴. Subtypen wie das medulläre Karzinom (Bd1: 84%, Bd2: 26%, Bd3: 0%) oder das adenom-artige Adenokarzinom (Bd1: 100%, Bd2/ Bd3: 0%), die sich in der univariaten Überlebensanalyse als eher benigne Varianten herauskristallisiert hatten, zeigten spiegelbildlich, wie in **Abbildung 9F** illustriert, eine sehr geringe Tumor Budding Aktivität. Während aggressiv verlaufende Varianten wie zum Beispiel das mikropapilläre Karzinom (Bd1: 4%, Bd2: 34%, Bd3: 62%), das Siegelringzellkarzinom (Bd1: 0%, Bd2: 22%, Bd3: 78%) oder die neuroendokrinen Karzinome (Bd1: 14%, Bd2: 14%, Bd3: 72%) von einer hohen Tumor Budding Aktivität geprägt waren.⁴ Die insgesamt häufigste histologische Variante des KRK, das klassische Adenokarzinom NOS (Bd1: 60%, Bd2: 27%, Bd3: 13%), als auch das serratierte Adenokarzinom (Bd1: 60%, Bd2: 23%, Bd3: 17%) und das muzinöse Adenokarzinom (Bd1: 60%, Bd2: 28%, Bd3: 12%) zeigten eine variable Tumor Budding Aktivität mit einer im Vergleich zur gesamten Kohorte fast gleich gearteten Verteilung der drei Tumor Budding Kategorien. Die **Tabelle 11** liefert eine Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der KRK Subtypen bezogen auf die drei Tumor Budding Untergruppen.

5.6.2 Häufigkeit und Verteilung der KRK Subtypen in Abhängigkeit des WHO Gradings

Auch hier zeigte sich generell ein signifikanter Zusammenhang zwischen den diversen histologischen KRK Subtypen⁴ und dem WHO Grading ($p < 0.001$)⁴, wie in **Abbildung 9E**, **Tabelle 11** und in **Abbildung 10 C/D** nochmals im Detail dargestellt. Biologisch eher aggressiv verlaufende Subtypen wie die neuroendokrinen Karzinome (low-grade: 0%, high-grade: 100%) oder Siegelringkarzinome (low-grade: 0%, high-grade: 100%) waren in unserer Studie ausschließlich in der WHO high-grade Kategorie zu finden, während das adenom-artige Adenokarzinom (low-grade: 100%, high-grade: 0%) immer in die low-grade Kategorie fiel. Allerdings mussten aufgrund ihrer soliden Architektur benigne Varianten wie das medulläre

Karzinom (low-grade: 19%, high-grade: 81%) größtenteils als high-grade Karzinome klassifiziert werden, während die aggressiven mikropapillären Karzinome (low-grade: 51%, high-grade: 49%) nahezu gleichmäßig in beide WHO Grading Kategorien fielen. Der Grund im Falle der mikropapillären Adenokarzinome war, dass neben den mikropapillären Arealen, die zur Diagnosestellung lediglich 5% des Gesamttumors ausmachen müssen, der Subtyp häufig auch eine deutliche Drüsenausbildung zeigte, die eine Einstufung als low-grade Karzinom nach sich zog. Das Adenokarzinom NOS (low-grade: 77%, high-grade: 33%) und das serratierte Karzinom (low-grade: 76%, high-grade: 24%) zeigten in unseren Analysen hingegen eine vermehrte Tendenz hin zu einem geringen WHO Grading, währenddessen beim muzinösen Adenokarzinom (low-grade: 37%, high-grade: 63%) die Klassifizierung überwiegend in die Gruppe der high-grade Karzinome erfolgte.

5.6.3 Häufigkeit und Verteilung des Tumor Buddings und des WHO Gradings zueinander

Bei der Untersuchung konnte das Tumor Budding innerhalb der low-grade Karzinome einen hohen Anteil an Karzinomen mit niedriger Tumor Budding Aktivität identifizieren (Bd1: 62%, Bd2: 23%, Bd3: 15%) und einen erhöhten Anteil an KRK mit hoher Tumor Budding Aktivität in der high-grade Kohorte (Bd1: 37%, Bd2: 33%, Bd3: 30%). Hingegen konnten wir bei der Betrachtung des WHO Gradings innerhalb der Tumor Budding Subgruppen häufig Fälle beobachten, in denen Karzinome mit einem gesteigerten Tumor Budding in mehr als der Hälfte der Fälle in eine low-grade Kategorie fielen (Bd3: low-grade = 51%, high-grade = 49%) und einige Karzinome mit einem niedrigen Tumor Budding, im umgekehrten Fall, der high-grade Kategorie (Bd1: low-grade = 78%, high-grade = 22%) zugeordnet worden sind. Für weitere Details siehe **Tabelle 13**.

5.6.4 Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen KRK Subtypen und Tumor Budding

Die drei Tumor Budding Subgruppen konnten sich innerhalb der KRK Subtypen in einer orientierenden univariaten Log-Rank-Analyse der Gesamtkohorte, wie in **Tabelle 12** ersichtlich, als äußerst starke prognostische Faktoren in allen untersuchten Überlebensparametern beweisen⁴. Hierbei kristallisierten sich durch die Einteilung anhand des Tumor Buddings insbesondere ein prognostischer Unterschied innerhalb des häufigsten KRK Subtyps, dem Adenokarzinoms NOS (siehe **Abbildung 11A**), sowie innerhalb der muzinösen und der serratierten Karzinome (siehe **Abbildung 11 B und E**) heraus (OS/DSS/DFS: $p < 0.001$). Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Kurve in den **Abbildungen 11 B, C, D** und **F** ist das krankheitsfreie Überleben, der bereits im **Kapitel 3.6.3** als aggressiv beschriebenen KRK Subtypen, wie dem Siegeringzellkarzinom (OS/DSS: $p = 0.27$; DFS:

$p=0.095$), dem muzinösen, dem mikropapillären Adenokarzinom (OS: $p=0.023$; DSS: $p=0.05$; DFS: $p=0.02$) und dem neuroendokrinen Karzinom (OS/DSS: $p=0.22$; DFS= 0.26) in Abhängigkeit des Tumor Buddings, grafisch dargestellt. Es wird hiermit noch einmal deutlich ersichtlich, dass selbst innerhalb der aggressiveren KRK Varianten, das Tumor Budding dazu beitragen kann, eine noch präzisere prognostische Aussage zu treffen. Bei den adenomartigen Adenokarzinomen konnten wir die untersuchten Präparate nur der Tumor Budding Gruppe Bd1 zuordnen und für das undifferenzierte Adenokarzinom lag nur ein Fall vor, sodass uns hier keine weiteren prognostischen Analysen des Tumor Budding Einflusses möglich waren.

5.6.5 Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen KRK Subtypen und WHO Grading

Das WHO Grading konnte in univariante Log-Rank-Analysen der Gesamtkohorte, wie in **Tabelle 12** übersichtlich dargestellt, nur bei dem KRK Subtyp Adenokarzinom NOS statistische Signifikanz in allen untersuchten Überlebensparametern (OS/ DSS/ DFS: $p<0.001$) zeigen. Bei den übrigen KRK Subtypen wie dem muzinösen, medullären, mikropapillären, serratierten und dem siegelringzellartigen Adenokarzinomen konnte keine statistische Signifikanz des WHO Gradings bezüglich des Patientenüberlebens nachgewiesen werden.

5.6.6 Prognostische Relevanz der Interaktion zwischen Tumor Budding und WHO Grading

In einer finalen Subgruppenanalyse haben wir die prognostische Relevanz der Tumor Budding Aktivität separat in low- und high-grade Karzinomen des WHO Gradings und umgekehrt die prognostische Signifikanz des WHO Gradings in den einzelnen ITBCC Subgruppen analysiert. Für alle untersuchten Überlebensparameter konnte, wie in **Tabelle 13** und in den **Abbildungen 12 C** und **D** genauer dargestellt, nur das Tumor Budding innerhalb des WHO Gradings eine statistisch signifikante Aussage treffen (OS/ DSS/ DFS: $p<0.001$)⁴. Das WHO Grading zeigte währenddessen in allen drei Tumor Budding Gruppen, vor allem in der Bd1 Subkohorte, kaum eine Unterscheidung bezüglich des mittleren Gesamtüberlebens, des mittleren krankheitsspezifischen und des krankheitsfreien Überlebens.

	n (%)	Adenokarzinom NOS	Muzinöses Adenokarzinom	Siegelringzellkarzinom	Medulläres Adenokarzinom	Mikropapilläres Adenokarzinom	Serratiertes Adenokarzinom	Adenom-artiges Adenokarzinom	Undifferenziertes Karzinom	MANEC/NEC	p-Wert
	1004 (100%)	630 (62.7%)	83 (8.3%)	9 (0.9%)	32 (3.2%)	122 (12.2%)	87 (8.7%)	33 (3.3%)	1 (0.1%)	7 (0.7%)	
WHO Grading											
low-grade	686 (68.3%)	487 (71.0%)	31 (4.5%)	0	6 (0.9%)	62 (9.0%)	66 (9.6%)	33 (4.8%)	0	0	
high-grade	318 (31.7%)	143 (45.0%)	52 (16.4%)	9 (2.8%)	26 (8.2%)	60 (18.9%)	21 (6.6%)	0	1 (0.3%)	7 (2.2%)	<0.001
Tumor Budding											
Bd1	545 (54.3%)	377 (69.2%)	50 (9.2%)	0	27 (5.0%)	5 (0.9%)	52 (9.5%)	33 (6.1%)	0	1 (0.2%)	
Bd2	262 (26.1%)	169 (64.5%)	23 (8.8%)	2 (0.8%)	5 (1.9%)	41 (15.6%)	20 (7.6%)	0	1 (0.4%)	1 (0.4%)	
Bd3	197 (19.6%)	84 (42.6%)	10 (5.1%)	7 (3.6%)	0	76 (38.6%)	15 (7.6%)	0	0	5 (2.5%)	<0.001

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der KRK Subtypen in der Gesamtkohorte bezogen auf das WHO Grading (low-/ high-grade) und das Tumor Budding (Bd1/ Bd2/ Bd3). (modifiziert nach ⁴)

WHO Grading	n	Mittleres Gesamtüberleben p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben p-Wert
	(low-grade/ high-grade)			
Adenokarzinom NOS	487 / 143	<0.001	<0.001	<0.001
Muzinöses Adenokarzinom	31 / 52	0.64	0.41	0.49
Siegelringzellkarzinom	0 / 9	nur high-grade	nur high-grade	nur high-grade
Medulläres Adenokarzinom	6 / 26	0.64	0.47	0.61
Mikropapilläres Adenokarzinom	62 / 60	0.071	0.60	0.08
Serratiertes Adenokarzinom	66 / 21	0.39	0.07	0.17
Adenom-artiges Adenokarzinom	33 / 0	nur low-grade	nur low-grade	nur low-grade
Undifferenziertes Karzinom	0 / 1	nur ein Fall	nur ein Fall	nur ein Fall
MANEC/NEC	0 / 7	nur high-grade	nur high-grade	nur high-grade
Tumor Budding	(Bd1/ Bd2/ Bd3)			
Adenokarzinom NOS	377 / 169 / 84	<0.001	<0.001	<0.001
Muzinöses Adenokarzinom	59 / 23 / 10	<0.001	<0.001	<0.001
Siegelringzellkarzinom	0 / 2 / 7	0.17	0.17	0.095
Medulläres Adenokarzinom	27 / 5 / 0	0.28	0.66	0.53
Mikropapilläres Adenokarzinom	5 / 41 / 76	0.023	0.05	0.02
Serratiertes Adenokarzinom	52 / 20 / 15	<0.001	<0.001	<0.001
Adenom-artiges Adenokarzinom	33 / 0 / 0	nur Bd1	nur Bd1	nur Bd1
Undifferenziertes Karzinom	0 / 1 / 0	nur ein Fall	nur ein Fall	nur ein Fall
MANEC/NEC	1 / 1 / 5	0.22	0.22	0.26

Tabelle 12: Verteilung der KRK Subtypen innerhalb des WHO Gratings und des Tumor Buddings und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens (OS), des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) und des krankheitsfreien Überlebens. (modifiziert nach ⁴⁾)

Tabelle 13: Verteilung der Tumor Budding Gruppen (Bd1/Bd2/Bd3) innerhalb der beiden WHO Grading Kategorien (low-/ high-grade), sowie Verteilung der beiden WHO Grading Gruppen innerhalb der drei Tumor Budding Subkohorten und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens (OS), des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) und des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Monaten.

		n (%)	Mittleres Gesamtüberleben (SE) p-Wert	Mittleres krankheitsspezifisches Überleben (SE) p-Wert	Mittleres krankheitsfreies Überleben (SE) p-Wert
WHO Grading: low-grade Subkohorte			<0.001	<0.001	<0.001
	Bd1	428 (62%)	160.0 (5.2)	192.7 (4.1)	191.8 (3.8)
	Bd2	158 (23%)	110.5 (7.6)	128.2 (8.0)	109.4 (8.1)
	Bd3	99 (15%)	59.3 (7.4)	74.0 (8.5)	61.4 (8.2)
WHO Grading: high-grade Subkohorte			<0.001	<0.001	<0.001
	Bd1	118 (37%)	143.8 (7.2)	168.9 (5.9)	166.3 (6.2)
	Bd2	104 (33%)	95.1 (10.2)	114.7 (11.0)	102.3 (11.3)
	Bd3	96 (30%)	36.9 (5.3)	41.2 (6.4)	35.9 (6.4)
Tumor Budding: Bd1 Subkohorte			0.57	0.53	0.49
	low-grade	427 (78%)	161.3 (5.2)	192.7 (4.1)	191.8 (3.8)
	high-grade	117 (22%)	142.8 (7.2)	168.9 (5.9)	166.6 (6.2)
Tumor Budding: Bd2 Subkohorte			0.04	0.04	0.10
	low-grade	158 (60%)	110.5 (7.6)	128.2 (8.0)	109.4 (8.1)
	high-grade	104 (40%)	95.1 (10.2)	114.7 (11.0)	102.3 (11.3)
Tumor Budding: Bd3 Subkohorte			0.01	0.01	0.04
	low-grade	99 (51%)	58.2 (7.4)	72.6 (8.5)	60.2 (8.2)
	high-grade	98 (49%)	37.4 (5.3)	41.9 (6.2)	36.6 (6.4)

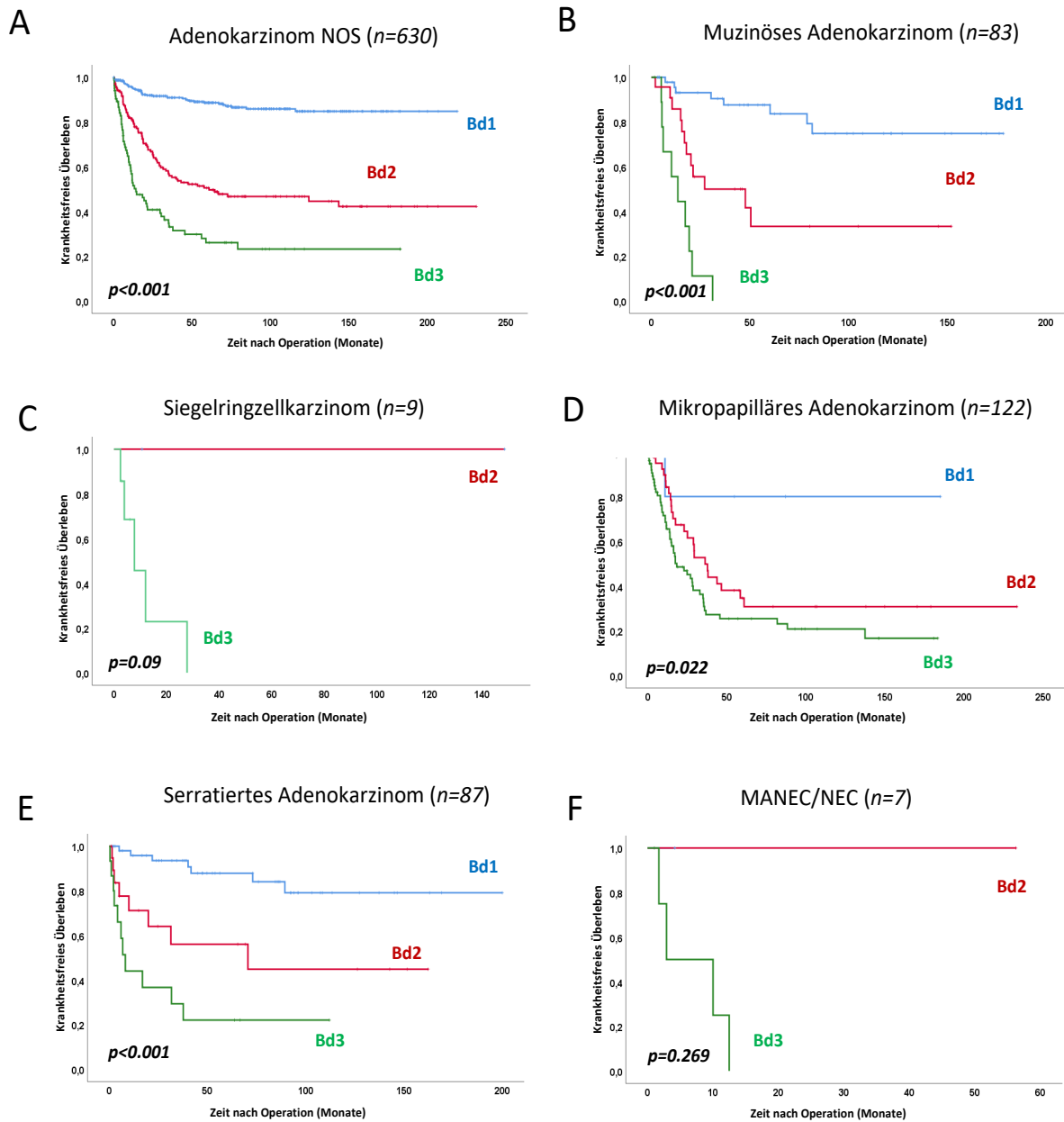


Abbildung 11: Einfluss des Tumor Buddings auf das DFS in verschiedenen KRK Subtypen: Adenokarzinom NOS (A), muzinöses Adenokarzinom (B), Siegelringzellkarzinom (C), mikropapilläres Adenokarzinom (D), serratiertes Adenokarzinom (E) und MANEC/NEC (F). (modifiziert nach ⁴)

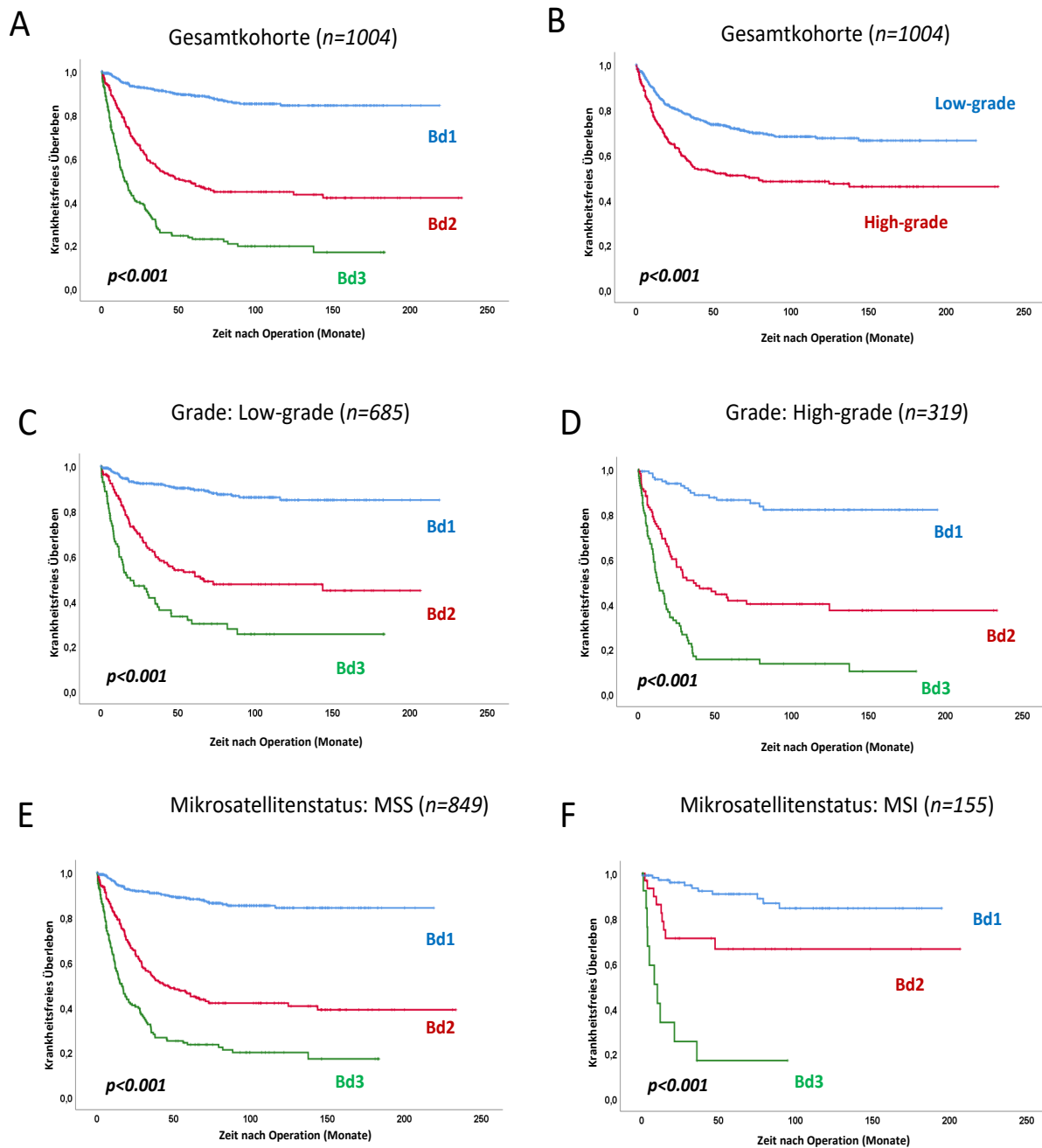


Abbildung 12: Überlebensdaten im Zusammenhang zum Tumor Budding und zum WHO Grading. DFS in der Gesamtkohorte in Abhängigkeit zur Tumor Budding Aktivität (A) und zum WHO Grading (B). Einfluss der Tumor Budding Aktivität auf das DFS innerhalb der WHO low-grade (C) und high-grade (D) Gruppe als auch in der MSS (E) und der MSI (F) Gruppe. (modifiziert nach ⁴)

5.7 Multivariate Analyse aller morphologischen Parameter

Als Abschluss unserer Untersuchungen führten wir mit Hilfe des Cox-proportional Hazard-Modells eine multivariate Überlebensanalyse für alle Überlebensparameter (OS/DSS/DFS), unter Einbeziehung aller univariaten prognostischen Faktoren, durch. Die eingeschlossenen Parameter umfassten das Patientenalter (unterhalb/oberhalb des Medians), das Geschlecht, das UICC-Stadium (I-IV), den Resektionsstatus (R0, R1, R2), das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit einer Lymph- (L0/L1) oder Blutgefäßinvasion (V0/V1), den Mikrosatellitenstatus, das WHO Grading (low-grade/high-grade), sowie die einzelnen Tumor Budding Subgruppen nach ITBCC (Bd1-Bd3) und die diversen KRK Subtypen.

In unseren multivariaten Analysen kristallisierten sich das Tumor Budding, die KRK Subtypen und das UICC-Stadium als unabhängige Prognosefaktoren heraus ⁴.

Im Vergleich aller prognostischer Parameter zeigten die Tumor Budding Subgruppen die mit weitem Abstand stärkste prognostische Aussagekraft (OS/DSS/DFS: $p < 0.001$; Hazard Ratio: OS (Bd2: 2.19, Bd3: 4.39), DSS (Bd2: 1.41, Bd3: 3.35), DFS (Bd2: 3.60, Bd3: 6.72)), welches sogar die prognostische Demarkation der verschiedenen UICC Subgruppen übertraf. Die KRK Subtypen waren ebenso in der multivariaten Analyse hochgradig prognostisch (OS: $p=0.008$; DSS: $p<0.001$; DFS: $p=0.002$) und zeigten verglichen mit dem Referenzsubtyp Adenokarzinom NOS entweder eine deutlich niedrigere (medulläres Karzinom Hazard Ratio OS: 0.70; DSS: 0.77; DFS: 0.07) oder deutlich höhere Hazard Ratio (MANEC/NEC Hazard Ratio OS: 2.24; DSS: 7.99; DFS: 1.55). Das WHO Grading zeigte in der multiparametrischen Analyse für keinen der erhobenen Verlaufparameter eine statistische Signifikanz bezogen auf das krankheitsspezifische und das krankheitsfreie Überleben (p -Wert DSS: $p=0.33$, DFS: $p=0.25$; Hazard Ratio high-grade DSS: 1.15, DFS: 1.15).

Die detaillierten Ergebnisse der multivariaten Analyse für das Gesamt-, das krankheitsspezifische und das krankheitsfreie Überleben sind den **Tabellen 14, 15 und 16** zu entnehmen.

Tabelle 14: Multivariate Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben (OS) unter Einbeziehung der univariaten prognostischen Faktoren wie WHO KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading, UICC-Stadium, lymphatische und venöse Invasion, Resektionsabstand, Geschlecht, Alter und Mikrosatellitenstatus. (modifiziert nach ⁴)

		HR (OS)	unteres KI (95%)	oberes KI (95%)	p-Wert
WHO Subtypen	Adenokarzinom NOS	1.00			0.008
	Muzinöses Adenokarzinom	1.10	0.75	1.60	
	Siegelringzellkarzinom	0.87	0.31	2.45	
	Medulläres Adenokarzinom	0.70	0.32	1.53	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	0.81	0.60	1.09	
	Serratiertes Adenokarzinom	1.04	0.72	1.50	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	1.37	0.71	2.66	
	Undifferenziertes Karzinom	15.12	2.00	114.18	
	MANEC/NEC	2.24	0.86	5.85	
Tumor Budding	<i>Bd1</i>	1.00			<0.001
	<i>Bd2</i>	2.19	1.68	2.86	
	<i>Bd3</i>	4.39	3.25	5.94	
WHO Grading	<i>Low-grade</i>	1.00			0.03
	<i>High-grade</i>	1.27	1.01	1.59	
UICC-Stadium	<i>I</i>	1.00			<0.001
	<i>II</i>	1.15	0.82	1.62	
	<i>III</i>	1.02	0.63	1.65	
	<i>IV</i>	2.23	1.39	3.58	
Lymphatische Invasion	L0	1.00			0.76
	L1	1.05	0.69	1.79	
Venöse Invasion	L0	1.00			0.85
	L1	1.08	0.71	1.63	
Resektionsabstand	R0	1.00			0.002
	R1	1.81	1.21	2.70	
	R2	1.79	1.13	2.83	
Geschlecht	männlich	1.00			0.06
	weiblich	1.22	0.99	1.50	
Altersgruppe	unter Median	1.00			<0.001
	Median oder über Median	1.71	1.39	2.10	
Mikrosatellitenstatus	<i>MSI</i>	1.0			0.79
	<i>MSS</i>	1.02	0.61	1.54	

Tabelle 15: Multivariate Überlebensanalyse für das krankheitsspezifische Überleben (DSS) unter Einbeziehung der univariaten prognostischen Faktoren wie WHO KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading, UICC-Stadium, lymphatische und venöse Invasion, Resektionsabstand, Geschlecht, Alter und Mikrosatellitenstatus. (modifiziert nach ⁴)

		HR (DSS)	unteres KI (95%)	oberes KI (95%)	p-Wert
WHO Subtypen					<0.001
	Adenokarzinom NOS	1.00			
	Muzinöses Adenokarzinom	1.01	0.60	1.65	
	Siegelringzellkarzinom	1.15	0.28	4.73	
	Medulläres Adenokarzinom	0.77	0.28	2.08	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	0.98	0.67	1.42	
	Serratiertes Adenokarzinom	1.01	0.63	1.64	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	1.01	0.41	2.49	
	Undifferenziertes Karzinom	>100	>100	>500	
	MANEC/NEC	7.99	3.47	18.36	
Tumor Budding					<0.001
	<i>Bd1</i>	1.00			
	<i>Bd2</i>	1.41	0.99	2.00	
	<i>Bd3</i>	3.35	2.28	4.92	
WHO Grading					0.33
	<i>Low-grade</i>	1.00			
	<i>High-grade</i>	1.15	0.86	1.54	
UICC-Stadium					<0.001
	<i>I</i>	1.00			
	<i>II</i>	1.06	0.69	1.64	
	<i>III</i>	0.97	0.53	1.77	
	<i>IV</i>	2.22	1.23	4.00	
Lymphatische Invasion					0.64
	L0	1.00			
	L1	1.11	0.69	1.79	
Venöse Invasion					0.12
	V0	1.00			
	V1	1.08	0.71	1.63	
Resektionsabstand					<0.001
	R0	1.00			
	R1	2.46	1.50	4.02	
	R2	3.13	1.91	5.13	
Geschlecht					0.92
	männlich	1.00			
	weiblich	1.06	0.82	1.38	
Altersgruppe					0.61
	unter Median	1.00			
	Median oder über Median	1.18	0.91	1.54	
Mikrosatellitenstatus					0.90
	<i>MSI</i>	1.0			
	<i>MSS</i>	1.02	0.61	1.54	

Tabelle 16: Multivariate Überlebensanalyse für das krankheitsfreie Überleben (DFS) unter Einbeziehung der univariaten prognostischen Faktoren wie WHO KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading, UICC-Stadium, lymphatische und venöse Invasion, Resektionsabstand, Geschlecht, Alter und Mikrosatellitenstatus. (modifiziert nach ⁴)

		HR (DFS)	unteres KI (95%)	oberes KI (95%)	p-Wert
WHO Subtypen	Adenokarzinom NOS	1.00			0.002
	Muzinöses Adenokarzinom	1.06	0.69	1.62	
	Siegelringzellkarzinom	1.21	0.47	3.12	
	Medulläres Adenokarzinom	0.07	0.06	1.14	
	Mikropapilläres Adenokarzinom	0.83	0.61	1.13	
	Serratiertes Adenokarzinom	1.16	0.76	1.78	
	Adenom-artiges Adenokarzinom	0.31	0.04	2.28	
	Undifferenziertes Karzinom	26.17	3.37	203.25	
	MANEC/NEC	1.55	0.53	4.49	
Tumor Budding	<i>Bd1</i>	1.00			<0.001
	<i>Bd2</i>	3.60	2.59	5.01	
	<i>Bd3</i>	6.72	4.68	9.65	
WHO Grading	<i>Low-grade</i>	1.00			0.25
	<i>High-grade</i>	1.15	0.89	1.49	
UICC-Stadium	<i>I</i>	1.00			<0.001
	<i>II</i>	1.36	0.83	2.21	
	<i>III</i>	1.69	0.93	3.08	
	<i>IV</i>	2.92	1.61	5.29	
Lymphatische Invasion	L0	1.00			0.37
	L1	1.22	0.78	1.91	
Venöse Invasion	V0	1.00			0.12
	V1	1.29	0.93	1.80	
Resektionsabstand	R0	1.00			<0.001
	R1	1.07	0.66	1.73	
	R2	1.79	1.19	2.69	
Geschlecht	männlich	1.00			0.92
	weiblich	0.97	0.77	1.27	
Altersgruppe	unter Median	1.00			0.61
	Median oder über Median	1.06	0.84	1.33	
Mikrosatellitenstatus	<i>MSI</i>	1.0			0.88
	<i>MSS</i>	1.03	0.66	1.59	

6 Diskussion

Die WHO-Klassifikation von Tumoren ist ein internationales Standardwerk für die Tumordiagnostik. Das Ziel der WHO ist es eine einheitliche pathologische, klinisch relevante Klassifikation von Tumoren zu erstellen, die in erster Linie auf einer histologischen Analyse, aber zunehmend auch durch molekulare Faktoren definiert wird. Die bereits etablierten Klassifikationen werden fortlaufend von Experten weltweit angewendet und währenddessen regelmäßig überarbeitet und an neu gewonnene Erkenntnisse aus der Wissenschaft angepasst. Da diese Kriterien die Rahmenbedingungen für die histopathologische Diagnostik weltweit darstellen, ist es von großer Wichtigkeit, dass alle eingebrachten Änderungen fortlaufend in ihrer klinischen Relevanz und Umsetzbarkeit überprüft werden.

In der fünften Auflage der WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungssystems aus dem Jahr 2019 richten sich die Veränderungen auf die histopathologischen Kriterien und im Vergleich zur vierten Auflage aus dem Jahr 2010 wurden die KRK Subtypen, sowie das Tumor Budding als auch das klassische WHO Grading modifiziert. Zum einen wurden die histologischen KRK Subtypen um neue Subtypen (Adenom-artige Adenokarzinome) erweitert, frühere Subtypen wurden nicht mehr aufgeführt (Spindelzellartiges Karzinom, Kribriiformes Karzinom) und bereits etablierte Subtypen wurden erheblich revidiert. Des Weiteren wurde das vorherige dreistufige WHO Grading auf einen zweistufigen Algorithmus reduziert und das Tumor Budding als ein neuer histologischer Parameter mit einem dreistufigen Unterscheidungskriterium etabliert. ^{5,33}

Diese Dissertationsschrift setzt sich anhand einer groß angelegten Kohorte von 1004 KRK aus zwei Jahrzehnten, kritisch mit den oben genannten, aktuellen, im Jahr 2019 veröffentlichten, histopathologischen Leitlinien der WHO auseinander. Zum Zeitpunkt unserer Datenerhebung war uns keine ähnliche Studie in diesem Umfang bekannt. Es gab bereits Studien die sich mit einzelnen Parametern wie zum Beispiel dem Tumor Budding anhand kleinerer Kohorten auseinandergesetzt haben ^{65,66}. Diese Studien beschränkten sich jedoch nur jeweils auf einen histopathologischen Parameter, ohne die weiteren histopathologischen Parameter und die jeweiligen Interaktionen untereinander ausführlicher zu analysieren. Der Fokus dieser Dissertationsschrift liegt darin, die drei histomorphologischen Parameter KRK Subtypen, WHO Grading und das Tumor Budding jeweils eingehend einzeln zu analysieren, mit den klinisch-pathologischen Parametern zu vergleichen als auch die Interaktionen miteinander zu untersuchen, wodurch eine Publikation zu dieser Thematik resultierte ⁴. Die Diskussion dieser Promotionsarbeit soll die folgenden zentralen Fragen beantworten:

- (1) Wie hoch ist der Anteil an KRK Subtypen gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation in einem KRK-Kollektiv? Ist eine prognostische Demarkation zwischen den einzelnen Varianten möglich und gibt es Assoziationen zu weiteren klinisch-pathologischen Parametern?
- (2) Wie häufig sind jeweils die verschiedenen WHO-Grading-Subgruppen zu finden und kann eine Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern gefunden werden? Zeigt das WHO Grading eine prognostische Relevanz?
- (3) Wie hoch ist die Frequenz der verschiedenen Tumor Budding-Subgruppen? Gibt es eine Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern und inwieweit kann dadurch eine prognostische Aussage getroffen werden?
- (4) Wie hängen die drei histomorphologischen Parameter KRK Subtypisierung, Tumor Budding und WHO Grading zusammen? Gibt es eine gegenseitige Beeinflussung dieser drei Parameter? Welcher Parameter hat die größte prognostische Aussagekraft und sollte in zukünftigen histopathologischen Berichten eine besondere Erwähnung finden?

Um die erste Frage zu beantworten, haben wir die einzelnen KRK jeweils einem KRK Subtyp zugeordnet, wobei bei gewissenhafter Klassifizierung eine Zuordnung zu einem spezifischen histologischen Subtyp neben den sonst klassischen Adenokarzinomen NOS in mehr als ein Drittel aller Fälle (n=374, 37%) möglich war und somit weitaus häufiger als wir vor der Durchführung unserer Studie erwartet haben. Hierbei war der mikropapilläre Subtyp in unserer Studie mit einem Anteil von 12% an allen KRK der häufigste KRK Subtyp und der serratierte KRK Subtyp mit einem Anteil von 8.7% der zweithäufigste.⁴ Dies deckt sich auch mit anderen Studien⁶⁷⁻⁶⁹. Neben den zwei bereits erwähnten KRK Subtypen zeigte unsere Studie insgesamt eine annähernde Übereinstimmung der Häufigkeiten der einzelnen Subtypen mit anderweitigen Studien, die sich jeweils mit einzelnen KRK Subtypen auseinandergesetzt haben^{24,42,50,52,67-72}.

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die Einteilung von KRK in Subtypen für die klinische Praxis relevant ist. Die histopathologischen Subtypen haben einen Einfluss auf die Überlebensparameter, unabhängig von anderen Faktoren wie zum Beispiel dem Stadium der Erkrankung. Außerdem weisen die Subtypen je nach Alter, Geschlecht, Tumorlokalisierung und Mikrosatellitenstatus signifikante Unterschiede in der Verteilung auf.⁴

In unserer Studie konnten wir zum Beispiel bei dem medullären Adenokarzinom eine Tendenz für das weibliche Geschlecht und ein höheres Alter finden⁴, was mit anderen Studien wie beispielsweise von Knox et al. korreliert^{52,70}. Das adenom-artige Adenokarzinom zeigte hingegen bei uns eine Tendenz für das männliche Geschlecht und für ein jüngeres Alter⁴, wobei eine Studie von Gonzalez et al. keinen signifikanten statistischen Zusammenhang bezüglich des Alters oder des Geschlechtes zwischen den Patienten mit adenom-artigen Adenokarzinomen und der Kontrollgruppen finden konnte⁵⁰.

Bezogen auf die Tumorlokalisierung konnten wir spezifische Subtypen wie das serratierte Adenokarzinom signifikant häufiger im rechten Kolon feststellen als das klassische Adenokarzinom NOS⁴, was auch in anderen Studien wie zum Beispiel von Garcia-Solano et al. festgehalten worden ist. Zusätzlich wurde in dieser Studie noch festgestellt, dass das serratierte Adenokarzinom vor allem bei dem männlichen Geschlecht die Tendenz zum rechten Kolon hatte.⁷³ Das medulläre, siegelringzellige als auch das muzinöse Adenokarzinom zeigten ebenfalls eine Tendenz zum rechten Kolon⁴, was auch mit anderen Studien wie zum Beispiel einer Studie von Hyngstrom et al. korreliert^{48,52,70,74}. Das klassische Adenokarzinom zeigte hingegen bei uns⁴ als auch in vielen anderen Studien vermehrt eine Präferenz für das linke Kolon^{71,74}. Eine andere Studie konnte hingegen sogar eine widersprechende Aussage mit einer häufigeren rechtsseitigen Lokalisation des klassischen Adenokarzinoms treffen⁶⁹. Die jeweiligen Präferenzen eines KRK Subtyps für einen bestimmten Kolonabschnitt könnten in weiterführenden Studien Hinweise auf eine

seitenspezifische Variation innerhalb der gastrointestinalen Flora, der intraluminalen Nährstoffversorgung und der Zusammensetzung dieser liefern⁵².

Übereinstimmend mit anderen Studien konnten wir des Weiteren bestätigen, dass bestimmte KRK Subtypen wie das siegelringzellige^{48,74}, das neuroendokrine²⁴ als auch das mikropapilläre⁴² Adenokarzinom gehäuft in fortgeschrittenen pTNM und UICC-Stadien gefunden werden⁴. Das adenom-artige Adenokarzinom zeigte sich bei uns vor allem in den UICC-Stadien I und II⁴, was auch durch Gonzalez et al. festgestellt worden ist, wobei das adenom-artige Adenokarzinom zwar häufig in den pT-Stadien III und IV zu finden war, aber nur in 20% eine nodale Metastasierung aufwies und somit niedrigen UICC-Stadien zugeordnet werden konnte⁵⁰. Hingegen konnten medulläre und muzinöse Adenokarzinome bei uns trotz häufig fortgeschrittenen pT-Stadien keine erhöhte Neigung zur nodalen Metastasierung zeigen⁴. Ähnliche Ergebnisse zeigte beispielsweise die Studie von Thirunavukarasu et al., wobei hier noch zusätzlich postuliert worden ist, dass tendenziell mehr Männer medulläre Adenokarzinome in den UICC-Stadien III und IV aufweisen^{48,52,70}.

Einen weiteren klinisch-pathologischen Parameter, den wir innerhalb der KRK Subtypen untersucht haben, war der Mikrosatellitenstatus. Die Mikrosatelliteninstabilität, beziehungsweise die zugrunde liegende Mismatch-Reperaturgen-Defizienz, gilt, gestützt durch eine Vielzahl an Literatur^{13,63,75}, als ein prognostisch günstiger Faktor im Vergleich zu mikrosatellitenstabilen Karzinomen und als wegweisender Biomarker zur Vorhersage des Therapieerfolgs einer checkpointgerichteten Immuntherapie, wobei das Indikationsspektrum insbesondere fortgeschrittene KRK, Karzinome des Magens und des Endometriums betrifft⁷⁶. Hierbei konnten wir übereinstimmend mit anderen Studien gerade bei prognostisch günstigen KRK Subtypen wie dem medullären sowie bei dem adenom-artigen Adenokarzinomen nahezu immer eine Mikrosatelliteninstabilität und im Gegensatz dazu in den meisten Fällen der prognostisch ungünstigen mikropapillären Adenokarzinome eine Mikrosatellitenstabilität nachweisen^{4,70,77}.

In unserer Studie zeigte sich außerdem eine prognostische Relevanz der KRK Subtypisierung bezogen auf alle drei geprüften Überlebensparameter und identifizierte KRK Subtypen mit einem günstigen Verlauf wie das adenom-artige oder auch das medulläre Adenokarzinom sowie ungünstige KRK-Varianten wie zum Beispiel das mikropapilläre oder auch das siegelringzellige Adenokarzinom. Selbst in klinisch-pathologischen Subgruppen wie den UICC-Stadien oder dem bereits erwähnten MSS/MSI-Status konnte eine Subtypisierung der KRK eine prognostische Unterteilung liefern.⁴ Hyngstrom et al. prüften in ihrer Studie die klinischen Merkmale und die Überlebensparameter von Patienten mit einem siegelringzelligen und einem muzinösen Adenokarzinom und fanden übereinstimmend mit unserer Studie heraus, dass die beiden KRK Subtypen viele klinisch-pathologischen Gemeinsamkeiten,

einschließlich eines jüngeren Alters bei der Präsentation und einer häufigeren proximalen Lokalisation im Kolon aufweisen, aber während das siegelringzellige Adenokarzinom insgesamt eine schlechtere Überlebensprognose zeigte, konnte beim muzinösen Adenokarzinom diesbezüglich wie auch in unserer Studie keine signifikante Tendenz gefunden werden⁴. Jedoch konnten Hyngstrom und seine Kollegen bei einer weiteren Unterteilung der muzinösen Adenokarzinome anhand der Lokalisation eine ungünstigere Prognose des muzinösen KRK Subtyps bei einem Auftreten im rektalen Abschnitt feststellen.⁴⁸

Als zweiten Schritt untersuchten wir in unserer Studie den histomorphologischen Parameter WHO Grading, wobei wir 68% der KRK von 1004 KRK gemäß der neuen WHO-Klassifikation der low-grade Kategorie zuordnen konnten und 32% der KRK der high-grade Gruppe⁴. Die Verteilung in unserer Studie zeigt einen deutlich höheren Anteil an high-grade Karzinomen innerhalb der Kohorte im Vergleich zu anderen Studien wie zum Beispiel von Zlobec et al.²⁰. Insgesamt fiel in unserer Kohorte ein hoher Prozentsatz der Fälle in die WHO-high-grade-Kategorie, vor allem wenn man diese Beobachtung nicht nur mit anderen Studien vergleicht, sondern auch mit dem wahrgenommenen geringeren Prozentsatz an high-grade-Fällen bei der täglichen diagnostischen Arbeit eines Pathologen. Dies ist wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass wir das WHO Grading einheitlich auf alle Subtypen angewandt haben, einschließlich der Subtypen wie zum Beispiel dem medullären Adenokarzinom, die normalerweise nicht eingestuft werden, aber bei der Anwendung des WHO-Grades fast immer hochgradig sind. Darüber hinaus hat unsere Kohorte einen hohen Anteil an KRK im fortgeschrittenen Stadium, bei dem Karzinome mit hohem WHO Grading ebenfalls überrepräsentiert sein dürften. Diese starke Assoziation des WHO Gratings zu den pTNM-Stadien in unserer Studie und den daraus kumulativ abgeleiteten UICC-Stadien konnte in anderen Forschungsarbeiten widergespiegelt werden. Übereinstimmend konnten wir des Weiteren auch einen Zusammenhang zwischen MSI-Karzinomen und high-grade Karzinomen postulieren, wobei wir in Gegensatz zu Zlobec et al. keine eindeutige Assoziation zur lymphatischen und perineuralen Invasion bei high-grade Karzinomen in unserer Studie finden konnten.^{4,20,78}

In anschließenden univariaten Überlebensanalysen zeigte sich das WHO Grading bei uns nur eingeschränkt auf bestimmte Subgruppen als prognostisch relevant, während beispielsweise keine prognostische Demarkation innerhalb von MSI-Karzinomen (OS: $p=0.09$, DSS: $p=0.11$, DFS: 0.14) oder Karzinomen in frühen UICC-Stadien (DSS UICC I: $p=0.95$, UICC II: $p=0.65$) möglich war⁴. Zlobec et al. fanden in ihrer Studie überdies keinen Zusammenhang zwischen dem WHO Grading und dem Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben²⁰, was bei unserer Studie hingegen eine starke Korrelation (OD/DFS jeweils $p<0.001$) aufwies⁴. Kraemer et al.⁷⁹

postulierten ähnlich zu Zlobec et al.²⁰, dass das WHO Grading zwar bei Kolonkarzinomen keine prognostische Aussagekraft habe, aber bei rektalen Karzinomen hingegen mit einer höheren Rezidivrate vergesellschaftet sei und somit bei der Analyse der histomorphologischen Parameter eines Rektumkarzinoms von hoher Bedeutung ist.

Um die dritte Frage zu beantworten, untersuchten wir das Tumor Budding, wobei wir 54% der 1004 KRK der Bd1-Subgruppe, 26% der KRK der Bd2-Subgruppe und 20% der KRK der Bd3-Subgruppe zuordnen konnten⁴. Wir verwendeten bei der Erhebung des Tumor Buddings innerhalb unserer Studie die Kriterien von der Internationalen Tumor Budding Konferenz aus dem Jahre 2016³⁰. Hierbei kamen wir bei der Verteilung des Tumor Buddings im Vergleich zu der Studie von Zlobec et al., die diese Kriterien auch auf eine ähnlich große Kohorte mit 771 Patienten verwendet haben, auf einen höheren Anteil an KRK mit Bd1 und einen kleineren Anteil an KRK der Bd3-Subgruppe^{4,20}. Vor der Einführung der Kriterien für das Tumor Budding durch die Internationale Tumor Budding Konferenz haben Studien, die sich mit dem Tumor Budding beschäftigt haben, unterschiedliche anderweitige Kriterien zur Unterteilung des Tumor Buddings festgelegt, aber auch hier zeigte sich in einigen Studien ein größerer Anteil an KRK mit höherem Tumor Budding in der Gesamtkohorte^{65,80}. Einen ähnlichen niedrigen Anteil von 20% an der Bd3-Subgruppe konnte hingegen die Studie von Lee et al. liefern, wobei hier wichtig zu erwähnen ist, dass nur KRK im UICC-Stadium II untersucht worden sind⁸¹. Der etwas höhere Anteil der KRK an der Bd1-Subgruppe innerhalb unserer Studie ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass wir einen leicht größeren Anteil an klassischen Adenokarzinomen NOS im Vergleich zu anderen Studien aufweisen und diese in den meisten Fällen ein niedrigeres UICC-Stadium und auch weniger häufig ein höheres Tumor Budding besitzen.

Als weiterer Punkt konnte der dreistufige Algorithmus in unsere Studie deckend mit anderweitigen vergleichbaren Studien^{20,60,81} für den Parameter Tumor Budding eine hohe prognostische Relevanz bezogen auf alle drei Überlebensparameter (OS/DFS/DSS: $p < 0.001$) liefern und überdies seine prognostische Bedeutung in nahezu allen klinisch-pathologischen Parametern wie dem pTNM- und UICC-Stadien, den KRK Subgruppen einschließlich KRK im Frühstadium beibehalten, sowie innerhalb von KRK mit einer Fernmetastasierung^{4,66}. Schlussendlich kann das Tumor Budding einen erheblichen Einfluss auf das klinische Management eines KRKs besitzen, indem zum Beispiel die Einordnung eines KRKs im UICC-Stadium II in eine höhere Tumor Budding Kategorie, für eine reduzierte Überlebenserwartung sprechen würde und darauf aufbauend in diesen Fällen eine postoperative adjuvante Therapie diskutiert werden kann^{21,81}.

Zur Beantwortung der vierten Frage untersuchten wir in unserer Analyse, wie sich die drei histomorphologischen WHO-Kriterien (KRK Subtypisierung, Tumor Budding und WHO Grading) gegenseitig beeinflussen. Wir konnten hierbei feststellen, dass eine sehr starke Assoziation zwischen den drei Parametern ($p < 0.001$) vorliegt, jedoch die Stärke als auch die Art und Weise je nach Kombination unterschiedlich waren.⁴

Bei einer Analyse des Zusammenhangs der KRK Subtypen und des Tumor Buddings konnten wir zum Beispiel eine sehr starke Korrelation zwischen den Tumor Budding Stadien und den histologischen KRK Subtypen finden. Hierbei konnten bei aggressiv klassifizierten KRK Subtypen wie dem mikropapillären oder auch dem siegelringzelligen Karzinom eine hohe Tumor Budding Aktivität im Vergleich zu weniger aggressiven Adenokarzinomen wie dem adenom-artigen oder dem medullären Karzinom festgestellt werden. Eine derartige Analyse haben wir auch bezogen auf den Zusammenhang der KRK Subtypen mit dem WHO Grading unternommen, wobei das WHO Grading innerhalb der KRK Subtypen im Gegensatz teilweise fehlerhafte prognostische Aussagen lieferte. Zum Beispiel zeigte das mit einer günstigen Prognose vergesellschaftete medulläre Adenokarzinom überwiegend eine Einordnung in die high-grade Kategorie und das allgemein als aggressiv klassifizierte mikropapilläre Adenokarzinom in mehr als der Hälfte der Fälle eine Zuteilung in die low-grade Subgruppe. Somit haben wir als Schlussfolgerung gezogen, dass die klassische Einteilung der KRK anhand des WHO Gradings, das das Ausmaß der Drüsenbildung als Grundlage für eine Klassifikation innehält und darauf aufbauend eine prognostische Aussage tätigt, wohl nicht der geeignetste Parameter für jeden KRK Subtyp ist und schlussendlich auch im klinischen Setting dem Behandler ein fehlerbehaftetes Bild von der möglichen Benignität oder Aggressivität eines KRKs suggeriert.⁴

Als weiteren Schritt unserer Analyse des Zusammenhangs der histomorphologischen Kriterien untersuchten wir die Assoziation des WHO Gradings und des Tumor Buddings miteinander. Wir konnten hierbei feststellen, dass innerhalb der low-grade Karzinome ein hoher Anteil mit niedriger Tumor Budding Aktivität und in der high-grade Kategorie ein gesteigerter Anteil an hoher Tumor Budding Aktivität vorlag. Somit zeigte sich das Tumor Budding in den beiden WHO Grading Subgruppen stark prognostisch ($p < 0.001$). Das WHO Grading hingegen konnte keine zusätzliche Unterteilung innerhalb der verschiedenen Tumor Budding Subgruppen vornehmen.⁴ Die Studie von Zlobec et al.²⁰ konnte ein ähnliches Ergebnis postulieren, indem sie zeigten, dass Bd3 in low-grade Karzinomen selten vorkam während in niedrigen Tumor Budding Subgruppen nach der alten Einteilung des WHO Gradings ein erhöhter Anteil an G2 und G3 vorlag²⁰. Des Weiteren konnte unsere Studie bezogen auf das mittlere Gesamtüberleben, das mittlere krankheitsspezifische und das krankheitsfreie Überleben zeigen, dass nur das Tumor Budding innerhalb des WHO Gradings eine statistische

Signifikanz (OS/ DSS/ DFS: $p < 0.001$) aufweist, währenddessen umgekehrt dies nur eingeschränkt möglich ist. Insgesamt können wir somit die Aussage treffen, dass zwar das Tumor Budding innerhalb des WHO Gradings aber nicht das WHO Grading innerhalb des Tumor Buddings eine weitere prognostische Unterteilung tätigen kann.⁴

Aufgrund dieser Ergebnisse der Studien könnte man nun diskutieren, dass das WHO Grading zur histopathologischen Klassifizierung der KRK nicht uneingeschränkt auf alle Subtypen angewendet werden kann. Stattdessen wäre es eventuell sinnvoller einen größeren Wert auf anderweitige Prognoseparameter wie zum Beispiel die KRK Subtypisierung oder auch das Tumor Budding zu legen.⁴ Besonders mit Hinblick auf die hohe Unstimmigkeit bei der Klassifizierung des WHO Gradings zwischen unterschiedlichen Pathologen⁸² und der hingegen großen Einigkeit in der Tumor-Budding-Klassifizierung⁸³, unterliegt das WHO Grading insgesamt einer subjektiven Einschätzung und wird häufig im Zusammenhang mit anderen Faktoren wie zum Beispiel den Stroma-Merkmalen betrachtet. Konträr kann man hingegen jedoch argumentieren, dass der WHO Grading und das Tumor Budding als histologische Merkmale mit Hinweisen auf unterschiedliche biologische Prozesse innerhalb des Tumors fungieren²⁰. Hier wäre es interessant in weiterführenden Studien diesen Aspekt tiefer zu beleuchten.

Die größte Limitation, die unsere Studie aufwies, war das retrospektive Design der Studie und der nicht-interventionelle Ansatz. Ein erkenntnistheoretischer Nachteil in diesem Zusammenhang ist die unvollständige sowie uneinheitliche Dokumentation des Therapieregimes für einen kleinen Anteil der Patienten unserer Kohorte. Wir gehen jedoch davon aus, dass die jeweiligen Behandlungen Stadien-adaptiert gemäß den jeweils vorherrschenden deutschen S3-Leitlinien für KRK erfolgten. Dies stellt jedoch bis zu einem gewissen Grad nur eine Annahme dar.

Als weitere Limitation ist die Darstellung des jeweiligen Tumors mittels TMA als Ausschnitt der gesamten Tumormasse zu nennen. Hier ist jedoch essenziell zu erwähnen, dass vor Anfertigung der TMAs zum Teil sogar bis zu 10 verschiedene Ausschnitte desselben Tumors unter dem Lichtmikroskop begutachtet worden sind, um jeweils TMA-Cores zu wählen, die den Tumor möglichst repräsentativ darstellen. Als weitere Kontrolle haben wir als zusätzlichen Schritt korrespondierende Whole-Tumor-Slides angefertigt und diese mit den dazugehörigen TMAs verglichen, wobei in anknüpfenden Untersuchungen zu dieser Studie eine hohe Übereinstimmung des Expressionsverhaltens von Biomarkern zwischen TMA und Whole-Tumor-Slide gezeigt werden konnte. Dies bestätigte die Repräsentativität der TMAs für den Gesamttumor.^{38,39}

Zudem ist noch zu nennen, dass der statistische Vergleich zwischen größeren und kleineren Untersuchungsgruppen, wie beispielsweise bei MSS- und MSI-KRK, eine sorgfältige Berücksichtigung erforderte. Die Wahl geeigneter statistischer Verfahren wie zum Beispiel den Exakten Test nach Fisher für die Ermittlung der p-Werte bei kleinen Stichprobengrößen, die Beachtung der Effektstärke sowie die kritische Reflexion der Repräsentativität und Generalisierbarkeit zwischen den Gruppen sind entscheidend für die fundierte Interpretation und Diskussion der Ergebnisse.

Zusammenfassend ergab unsere Analyse der klinischen Bedeutung der histomorphologischen Faktoren (KRK Subtypisierung, Tumor Budding und WHO Grading) gemäß der WHO-Klassifikation 2019, dass alle drei Parameter klinisch relevant sind und in chirurgisch-pathologischen Reports eine Verwendung finden sollten. Primär sehen wir die Einteilung der KRK anhand der histomorphologischen Subtypen von zentraler Wichtigkeit, da die Subtypen in ihrer Aggressivität und ihrem klinischen Verlauf zum Teil große Unterschiede untereinander aufweisen.⁴ Das Tumor Budding als neuer histomorphologischer Parameter, gemäß den internationalen Konsensus-Leitlinien³⁰, liefert zusätzliche signifikante prognostische Informationen und kann in nahezu allen KRK Subtypen, einschließlich KRK im Frühstadium und MSS/MSI-Karzinomen, zu einer weiteren Unterteilung bezüglich der Aggressivität eines KRKs beitragen. Das WHO Grading ist zwar in der Tumordiagnostik ein etablierter histomorphologischer Parameter, aber zeigte sich insgesamt im Vergleich zum Tumor Budding und der KRK Subtypisierung als weniger aussagekräftig, sodass ein Beibehalten des WHO Gradings in zukünftigen, auf Morphologie basierten Klassifikationen des KRK hinterfragt werden sollte.⁴ Hierbei muss man dennoch berücksichtigen, dass das WHO Grading als auch das Tumor Budding womöglich auf unterschiedliche biologische Prozesse innerhalb des Tumors hinweisen und hier noch weitere Forschungsarbeit notwendig ist, um detaillierte Aussagen bezüglich der jeweiligen Prognosekraft treffen zu können²⁰.

Um die Zusammenhänge zwischen KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading und der Wirksamkeit auf bereits etablierten und zukünftigen Therapieschemata tiefergehender zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Ergebnisse unserer Studie bereits aufgegriffen und nicht nur von Studien mit einem Schwerpunkt auf KRK zitiert worden sind, sondern auch bei anderen Organsystemen Erwähnung fanden⁸⁴⁻⁸⁶. Schlussendlich empfehlen wir nachdrücklich alle drei Parameter im Rahmen von klinischen Studien zum kolorektalen Karzinom zu erfassen. Diese Informationen können in Zukunft als Grundlage dazu dienen, Patienten für die Entwicklung neuer klinischer Studien auszuwählen und Behandlungsstrategien zur Verbesserung der Überlebensdaten zu erforschen.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Lokalisationen an allen Karzinomneuerkrankungen in Deutschland 2016 aufgeteilt nach Frauen und Männern.³ 12
- Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahmen zweier verschiedener Resektaten von Adenokarzinomen des kolorektalen Systems in HE-Färbung mit jeweils unterschiedlich starker Ausprägung der Drüsendifferenzierung nach der neuen WHO Grading-Klassifikation: WHO-Grading low-grade (A) und high-grade (B).. 21
- Abbildung 3: Die Abbildungen A, C und E zeigen Übersichtsvergrößerungen von Schnittpräparaten in HE-Färbung von KRK Adenokarzinomen, wobei die Abbildungen B, D und F jeweils vergrößerte Ausschnitte von Bereichen, wo man die meisten Tumor Buds vermutet, präsentieren. In den Abbildungen D und F zeigen die grünen Pfeile auf einzelne Tumor Buds. Durch die Auswertung der Anzahl der Tumor Buds in den jeweiligen Schnittpräparaten kann man hier eine Unterteilung des Tumor Buddings vornehmen: A und B) Bd1, C und D) Bd2 und E und F) Bd3..... 24
- Abbildung 4: Histomorphologie des kolorektalen Karzinoms **A)** Adenokarzinom NOS (Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), 10x); **B)** Mikropapilläres Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **C)** Serratiertes Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **D)** Muzinöses Adenokarzinom (HE-Färbung, 10x); **E)** Adenomartiges Adenokarzinom, als auch ein Beispiel für ein WHO low-grade KRK (HE-Färbung, 10x); **F)** Medulläres Karzinom (HE-Färbung, 20x); **G)** Siegelringzellkarzinom (großes Bild in HE-Färbung, 20x & kleines Bild in PAS-Färbung, 40x); **H)** Gemischtes adeno-neuroendokrines Karzinom, als auch ein Beispiel für ein WHO high-grade KRK (HE-Färbung, 20x), kleines Bild (Synaptophysin positiv, 40x); **I)** Undifferenziertes Karzinom (HE-Färbung, 10x); **J)** Karzinom mit sarkomatoiden Komponenten (HE-Färbung, 10x). 33
- Abbildung 5: Das Flussdiagramm stellt eine Übersicht der Therapiestruktur des Kolonkarzinoms in Abhängigkeit von dem klinischen Stadium dar. Im Stadium I-III ist die radikale chirurgische Resektion des Kolonkarzinoms der erste Schritt woraufhin je nach Stadium der Entscheid für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie getroffen wird. Im Stadium IV ist die Therapie von der Resektabilität der Metastasen abhängig. RF- Risikofaktoren (modifiziert nach¹) 36

Abbildung 6: Das Flussdiagramm stellt eine Übersicht der Therapiestruktur des Rektumkarzinoms in Abhängigkeit von dem klinischen Stadium dar. Rektumkarzinome mit einem niedrigen Risiko für eine Metastasierung erhalten eine lokale Exzision. Hingegen werden Rektumkarzinome mit einem höheren Risiko neben einer neoadjuvante Therapie gegebenenfalls zusätzlich mit einer adjuvanten Therapie behandelt. cCR – klinische Komplettremission; PME – Partielle Mesorektumexzision; TME – Totale Mesorektumexzision; W&W – Watch and wait; TNT – totale neoadjuvante Therapie (modifiziert nach ²)..... 37

Abbildung 7: Beispiel für ein Schnittpräparat eines KRKs in HE-Färbung für die Lichtmikroskopie mit 4 zentral markierten Arealen (blau) und 4 an der Invasionsfront markierten Arealen (rot). 42

Abbildung 8: Exemplarische Darstellung des immunhistochemischen Expressionsverhaltens der Mikrosatellitenmarker MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 anhand zweier KRKs, einmal eines KRKs mitsamt erhaltenem Expressionsverhalten (A-D) und eines KRKs ohne vollständig erhaltenem Expressionsverhalten (E-H). Man beachte bei dem zweiten KRK den Expressionsverlust der Heterodimere MLH1 (E) und PMS2 (G) bei simultan erhaltener Expression der Marker MSH2 (F) und MSH6 (H). Durch den Expressionsverlust des Mikrosatellitenmarker MLH1 mitsamt des MMR-Bindungspartner PMS2 kann somit das zweite KRK als MSI klassifiziert werden. 47

Abbildung 9: Darstellung der Häufigkeit der KRK Subtypen, des WHO-Gradings und des TBs in der Gesamtkohorte, sowie deren Korrelation mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern. Verteilung der KRK Subtypen (A), des WHO-Gradings (B) und des Tumor Buddings (C) in der Gesamtkohorte. Zusammenhang der KRK Subtypen mit den UICC-Stadien (D), dem WHO Grading (E), dem Tumor Budding (F), der MSS/MSI (G) und der Tumorlokalisation (H). Detaillierte Übersicht der Daten sind in den Tabelle 5, 7, 9 und 11 zu finden. (modifiziert nach ⁴) 54

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zum krankheitsfreien Überleben der KRK Subtypen innerhalb der Gesamtkohorte (A), des UICC Stadiums II (B), der WHO low-grade (C) und der high-grade Subkohorte (D) als auch in der MSS (E) und der MSI (F) Gruppe. Details siehe unter anderem Tabelle 6. (modifiziert nach ⁴) 59

Abbildung 11: Einfluss des Tumor Buddings auf das DFS in verschiedenen KRK Subtypen: Adenokarzinom NOS (A), muzinöses Adenokarzinom (B), Siegelringzellkarzinom (C), mikropapilläres Adenokarzinom (D), serratiertes Adenokarzinom (E) und MANE/NEC (F). (modifiziert nach ⁴) 73

Abbildung 12: Überlebensdaten im Zusammenhang zum Tumor Budding und zum WHO Grading. DFS in der Gesamtkohorte in Abhängigkeit zur Tumor Budding Aktivität (A) und zum WHO Grading (B). Einfluss der Tumor Budding Aktivität auf das DFS innerhalb der WHO low-grade (C) und high-grade (D) Gruppe als auch in der MSS (E) und der MSI (F) Gruppe. (modifiziert nach ⁴) 74

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Klassifikation der Tumorstadien der Kolonkarzinome erfolgt anhand der TNM-Kriterien von denen sich die UICC-Stadien ableiten lassen; LK – Lymphknoten. (modifiziert nach ¹⁷).....	18
Tabelle 2: Einteilung der Tumor Budding Kategorien nach der Anzahl der gefundenen Tumor Buds in einem Mikroskopierfeld mit 20-facher Vergrößerung und einer Größe von 0.785mm ² . (modifiziert nach ³⁰)	23
Tabelle 3: Ablaufschema für die Zuordnung eines kolorektalen Karzinoms zu einer Tumor Budding Kategorie im klinisch-pathologischen Alltag. (modifiziert nach ^{30,60}).....	45
Tabelle 4: Klinisch-pathologische Charakteristika der Gesamtkohorte (n = 1004) und ihre prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens angegeben in Monaten. (modifiziert nach ⁴)	51
Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung ausgewählter histologischer KRK Subtypen bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation. (modifiziert nach ⁴).....	57
Tabelle 6: KRK Subtypen der Gesamtkohorte (n = 1004) geordnet nach UICC Stadien (I-IV) und Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten. (modifiziert nach ⁴)	58
Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung des WHO Gradings (low-grade/ high-grade) bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation.....	61
Tabelle 8: Verteilung des WHO Gradings innerhalb der Gesamtkohorte, der UICC-Stadien (I-IV) und des Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten.	62

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung des Tumor Buddings (Bd1/ Bd2/ Bd3) bezogen auf die klinisch-pathologischen Parameter Alter, Geschlecht, pTNM-Status, UICC-Stadium, lymphatische Invasion, venöse Invasion, perineurale Invasion, Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und Lokalisation.....	65
Tabelle 10: Verteilung des Tumor Buddings innerhalb der Gesamtkohorte, der UICC-Stadien (I-IV) und des Mikrosatellitenstatus (MSS/MSI) und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens, des krankheitsspezifischen Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens in Monaten.	66
Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der KRK Subtypen in der Gesamtkohorte bezogen auf das WHO Grading (low-/ high-grade) und das Tumor Budding (Bd1/ Bd2/ Bd3). (modifiziert nach ⁴).....	70
Tabelle 12: Verteilung der KRK Subtypen innerhalb des WHO Gratings und des Tumor Buddings und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens (OS), des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) und des krankheitsfreien Überlebens. (modifiziert nach ⁴).....	71
Tabelle 13: Verteilung der Tumor Budding Gruppen (Bd1/ Bd2/ Bd3) innerhalb der beiden WHO Grading Kategorien (low-/ high-grade), sowie Verteilung der beiden WHO Grading Gruppen innerhalb der drei Tumor Budding Subkohorten und ihre jeweilige prognostische Aussagekraft bezüglich des Gesamtüberlebens (OS), des krankheitsspezifischen Überlebens (DSS) und des krankheitsfreien Überlebens (DFS) in Monaten.	72
Tabelle 14: Multivariate Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben (OS) unter Einbeziehung der univariaten prognostischen Faktoren wie WHO KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading, UICC-Stadium, lymphatische und venöse Invasion, Resektionsabstand, Geschlecht, Alter und Mikrosatellitenstatus. (modifiziert nach ⁴).....	76
Tabelle 15: Multivariate Überlebensanalyse für das krankheitsspezifische Überleben (DSS) unter Einbeziehung der univariaten prognostischen Faktoren wie WHO KRK Subtypen, Tumor Budding, WHO Grading, UICC-Stadium, lymphatische und venöse Invasion, Resektionsabstand, Geschlecht, Alter und Mikrosatellitenstatus. (modifiziert nach ⁴).....	77

9 Literaturverzeichnis

1. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Kolonkarzinom - Leitlinie. (2018).
2. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie. Rektumkarzinom - Leitlinie. (2022).
3. Barnes, B., *et al.* Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 28-31 (Robert Koch-Institut, 2016).
4. Jesinghaus, M., *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. *American Journal of Surgical Pathology* **45**, 969-978 (2021).
5. WHO Editorial Board. Tumours of the colon and rectum. in *WHO classification of tumours: digestive system tumours*, Vol. 5 (eds. ID, N., MJ, A., RD, O. & AK, L.) 157-191 (World Health Organization, 2019).
6. Nagtegaal, I.D., *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* **76**, 182-188 (2020).
7. Zentrum für Krebsregisterdaten & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2015/2016. Vol. 12, 38 - 41 (Robert Koch-Institut, 2019).
8. Kato, I., Startup, J. & Ram, J.L. Fecal Biomarkers for Research on Dietary and Lifestyle Risk Factors in Colorectal Cancer Etiology. *Current Colorectal Cancer Reports* **10**, 114-131 (2014).
9. Russo, A.G., *et al.* Increased incidence of colon cancer among individuals younger than 50 years: A 17 years analysis from the cancer registry of the municipality of Milan, Italy. *Cancer Epidemiology* **60**, 134-140 (2019).
10. De Palma, F., *et al.* The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. *Cancers* **11**, 1017 (2019).
11. Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R. & Steele, R.J.C. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery* **89**, 845-860 (2002).
12. Satorres, C., García-Campos, M. & Bustamante-Balén, M. Molecular Features of the Serrated Pathway to Colorectal Cancer: Current Knowledge and Future Directions. (Gut and Liver, 2020).
13. Kim, J.H. & Kang, G.H. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 4230-4243 (2014).
14. Hold, G.L. Western lifestyle: a 'master' manipulator of the intestinal microbiota? *Gut* **63**, 5-6 (2014).
15. Piper, W. *Innere Medizin*, (Springer, 2013).

16. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. ed. AWMF **Langversion 2.1** (2019).
17. Wittekind, C. *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*, (Wiley-VCH, Weinheim, 2017).
18. Shida, D., Kanemitsu, Y., Hamaguchi, T. & Shimada, Y. Introducing the eighth edition of the tumor-node-metastasis classification as relevant to colorectal cancer, anal cancer and appendiceal cancer: a comparison study with the seventh edition of the tumor-node-metastasis and the Japanese Classification of Co. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **49**, 321-328 (2019).
19. Taieb, J., *et al.* Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies. *Annals of Oncology* **30**, 1466-1471 (2019).
20. Zlobec, I., *et al.* Are tumour grade and tumor budding equivalent in colorectal cancer? A retrospective analysis of 771 patients. *European Journal of Cancer* **130**, 139-145 (2020).
21. Zlobec, I. & Lugli, A. Tumour budding in colorectal cancer: molecular rationale for clinical translation. *Nature Reviews Cancer* **18**, 203-204 (2018).
22. Jesinghaus, M., *et al.* Pre-operative cellular dissociation grading in biopsies is highly predictive of post-operative tumour stage and patient outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* **122**, 835-846 (2020).
23. Boxberg, M., *et al.* Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology* **70**, 1125-1137 (2017).
24. Jesinghaus, M., *et al.* Colorectal mixed adenoneuroendocrine carcinomas and neuroendocrine carcinomas are genetically closely related to colorectal adenocarcinomas. *Modern Pathology* **30**, 610-619 (2017).
25. Weichert, W., *et al.* Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *European Respiratory Journal* **47**, 938-946 (2016).
26. Kadota, K., *et al.* Comprehensive Pathological Analyses in Lung Squamous Cell Carcinoma: Single Cell Invasion, Nuclear Diameter, and Tumor Budding Are Independent Prognostic Factors for Worse Outcomes. *Journal of Thoracic Oncology* **9**, 1126-1139 (2014).
27. Zlobec, I., Berger, M.D. & Lugli, A. Tumour budding and its clinical implications in gastrointestinal cancers. *British Journal of Cancer* **123**, 700-708 (2020).
28. Grigore, A., Jolly, M., Jia, D., Farach-Carson, M. & Levine, H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine* **5**, 1-23 (2016).
29. Gabbert, H.E., Meier, S., Gerharz, C.D. & Hommel, G. Tumor-cell dissociation at the invasion front: A new prognostic parameter in gastric cancer patients. *International Journal of Cancer* **50**, 202-207 (1992).

30. Lugli, A., *et al.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology* **30**, 1299-1311 (2017).
31. Dawson, H. & Lugli, A. Molecular and Pathogenetic Aspects of Tumor Budding in Colorectal Cancer. **2** (2015).
32. Rogers, A.C., *et al.* Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *British Journal of Cancer* **115** 831-840 (2016).
33. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H. & Theise, N.D. *WHO classification of tumours of the digestive system*, (World Health Organization, 2010).
34. Gonzalez, R.S., *et al.* Adenoma-like adenocarcinoma: a subtype of colorectal carcinoma with good prognosis, deceptive appearance on biopsy and frequent KRAS mutation. *Histopathology* **68**, 183-190 (2016).
35. Aramendi, T., Fernandez-Acenero, M.J. & Villanueva, M.C. Carcinosarcoma of the colon: report of a rare tumor. *Pathol Res Pract* **199**, 345-348 (2003).
36. Chirieac, L.R., Shen, L., Catalano, P.J., Issa, J.P. & Hamilton, S.R. Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *Am J Surg Pathol* **29**, 429-436 (2005).
37. Odze, R. & Goldblum, J. *Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract, and Pancreas*, (Elsevier, Philadelphia, 2023).
38. Konukiewitz, B., *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. *British Journal of Cancer* **125**, 1632-1646 (2021).
39. Schmitt, M., *et al.* Loss of SATB2 Occurs More Frequently Than CDX2 Loss in Colorectal Carcinoma and Identifies Particularly Aggressive Cancers in High-Risk Subgroups. *Cancers* **13** (2021).
40. Guzińska-Ustymowicz, K. Invasive micropapillary carcinoma: A distinct type of adenocarcinomas in the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology* **20**, 4597-4606 (2014).
41. Verdú, M., *et al.* Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. *Modern Pathology* **24**, 729-738 (2011).
42. Gonzalez, R.S., *et al.* Micropapillary colorectal carcinoma: clinical, pathological and molecular properties, including evidence of epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology* **70**, 223-231 (2017).
43. Remo, A., *et al.* Morphology and Molecular Features of Rare Colorectal Carcinoma Histotypes. *Cancers* **11** (2019).
44. Albuquerque-González, B., *et al.* Biology and Therapeutic Targets of Colorectal Serrated Adenocarcinoma; Clues for a Histologically Based Treatment against an Aggressive Tumor. *International Journal of Molecular Sciences* **21** (2020).

45. García-Solano, J., Conesa-Zamora, P., Trujillo-Santos, J., Mäkinen, M.J. & Pérez-Guillermo, M. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology* **59**, 1046-1056 (2011).
46. Byrd, J.C. & Bresalier, R.S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **23**, 77-99 (2004).
47. Verhulst, J., Ferdinande, L., Demetter, P. & Ceelen, W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology* **65**, 381-388 (2012).
48. Hynstrom, J.R., *et al.* Clinicopathology and Outcomes for Mucinous and Signet Ring Colorectal Adenocarcinoma: Analysis from the National Cancer Data Base. *Annals of Surgical Oncology* **19**, 2814-2821 (2012).
49. Hogan, J., *et al.* Overall survival is improved in mucinous adenocarcinoma of the colon. *International Journal of Colorectal Disease* **29**, 563-569 (2014).
50. Gonzalez, R.S., *et al.* Adenoma-like adenocarcinoma: a subtype of colorectal carcinoma with good prognosis, deceptive appearance on biopsy and frequent KRAS mutation. *Histopathology* **68**, 183-190 (2016).
51. Gonzalez, I. Adenoma-like adenocarcinoma: clinicopathologic characterization of a newly recognized subtype of colorectal carcinoma. *Human Pathology* **107**, 9 -19 (2020).
52. Thirunavukarasu, P., Sathaiah, M., Singla, S. & al., e. Medullary carcinoma of the large intestine: A population based analysis. *International Journal of Oncology* **37**, 901-907 (2010).
53. Scott, N., West, N., Cairns, A. & Rotimi, O. Is medullary carcinoma of the colon underdiagnosed ? An audit of poorly differentiated colorectal carcinomas in a large national health service teaching hospital. *Histopathology* **78**, 963-969 (2021).
54. Bademci, R., Bollo, J., M, Maria & Eduardo. Colorectal Cancer Prognosis: The Impact of Signet Ring Cell. *Gastrointestinal Tumors* **6**, 57-63 (2019).
55. Konukiewitz, B., *et al.* Neuroendocrine Differentiation in Conventional Colorectal Adenocarcinomas: Incidental Finding or Prognostic Biomarker? *Cancers* **13**, 5111 (2021).
56. Choi, Y.Y., Jeon, Y.M. & Kim, Y.J. Sarcomatoid carcinoma of colon: extremely poor prognosis. *Journal of the Korean Surgical Society* **80**, 26-30 (2011).
57. Lan, Y.-T., *et al.* A Nation-Wide Cancer Registry-Based Study of Adenosquamous Carcinoma in Taiwan. *PLOS ONE* **10** (2015).
58. Toumi, O., Hamida, B., Njima, M. & al., e. Adenosquamous carcinoma of the right colon: A case report and review of the literature. *International Journal of Surgery Case Report* **50**, 119-121 (2018).
59. Jesinghaus, M., *et al.* Appendiceal goblet cell carcinoids and adenocarcinomas ex-goblet cell carcinoid are genetically distinct from primary colorectal-type adenocarcinoma of the appendix. *Modern Pathology* **31**, 829-839 (2018).

60. Müller, F., Lugli, A. & Dawson, H. Tumor Budding beim kolorektalen Karzinom – Informationen zur klinischen Anwendung und Anleitung zur praktischen Bestimmung. *Der Pathologe* **43**, 45-50 (2022).
61. Hall, G., *et al.* Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology* **42**, 409-413 (2010).
62. Jesinghaus, M. A novel grading system based on tumor budding and cell nest size is a strong predictor of patient outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **41**, 1112-1120 (2017).
63. Boland, C., *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 Research* **58**, 5248-5257 (1998).
64. Landis, J. & Koch, G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33**, 159-174 (1977).
65. Graham, R.P., *et al.* Tumor Budding in Colorectal Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **39**, 1340-1346 (2015).
66. Wang, L.M., *et al.* Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *American Journal of Clinical Pathology* **33**, 134-141 (2009).
67. Lee, H.J., *et al.* Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. *Modern Pathology* **26**, 1123-1131 (2013).
68. Haupt, B., Ro, J.Y., Schwartz, M.R. & Shen, S.S. Colorectal adenocarcinoma with micropapillary pattern and its association with lymph node metastasis. *Modern Pathology* **20**, 729-733 (2007).
69. García-Solano, J., *et al.* Colorectal serrated adenocarcinoma shows a different profile of oncogene mutations, MSI status and DNA repair protein expression compared to conventional and sporadic MSI-H carcinomas. *International Journal of Cancer* **131**, 1790-1799 (2012).
70. Knox, R.D., *et al.* Medullary colorectal carcinoma revisited: A clinical and pathological study of 102 cases. *Annals of Surgical Oncology* **22**, 2988-2996 (2015).
71. Hugen, N., Van De Velde, C.J.H., De Wilt, J.H.W. & Nagtegaal, I.D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Annals of Oncology* **25**, 651-657 (2014).
72. Bray, F., *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**, 394-424 (2018).
73. Garcia-Solano, J., *et al.* Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Human Pathology* **41**, 1359-1368 (2010).

74. Hugen, N., *et al.* Colorectal signet-ring cell carcinoma: benefit from adjuvant chemotherapy but a poor prognostic factor. *International Journal of Cancer* **136**, 333-339 (2014).
75. Boland, C.R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073-2087 (2010).
76. Dietmaier, W., Büttner, R. & Rüschoff, J. Mikrosatelliteninstabilität. *Der Pathologe* **40**, 313-327 (2019).
77. Friedman, K., *et al.* Medullary carcinoma of the colon: a distinct morphology reveals a distinctive immunoregulatory microenvironment. *Modern Pathology* **29**, 528-541 (2016).
78. Bläker, H. Grading der Tumoren des tubulären Verdauungssystems. *Der Pathologe* **37**, 293-298 (2016).
79. Kraemer, M., *et al.* Stratifying risk factors for follow-up: a comparison of recurrent and nonrecurrent colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum* **44 (6)**, 815-821 (2001).
80. Koelzer, V.H., Zlobec, I. & Lugli, A. Tumor budding in colorectal cancer - ready for diagnostic practice? *Human Pathology* **47**, 4-19 (2016).
81. Lee, V.W.K. & Chan, K.F. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. *Elsevier* **214**, 402-407 (2018).
82. Chandler, I. & Houlston, R.S. Interobserver agreement in grading of colorectal cancers—findings from a nationwide web-based survey of histopathologists. *Histopathology* **52**, 494-499 (2008).
83. Koelzer, V.H., *et al.* Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Archiv* **466**, 485-493 (2015).
84. Pour Farid, P., *et al.* Novel Criteria for Intratumoral Budding with Prognostic Relevance for Colon Cancer and Its Histological Subtypes. *International Journal of Molecular Sciences* **22** (2021).
85. Shi, H., Ye, L., Lu, W. & Lu, B. Grading of endocervical adenocarcinoma: a novel prognostic system based on tumor budding and cell cluster size. *Modern Pathology* **35**, 524-532 (2022).
86. Quaas, A. Prognostic histological markers in colorectal cancer. *Pathologie (Heidelberg)* **44**, 287-293 (2023).

11 Veröffentlichungen

- 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. 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*. 2021 Jul 1;45(7):969-978. doi: 10.1097/PAS.0000000000001692. PMID: 34105518.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

- 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. 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*. 2021 Dec;125(12):1632-1646. doi: 10.1038/s41416-021-01553-0. Epub 2021 Oct 6. PMID: 34616012; PMCID: PMC8651779.
- Konukiewitz B, Kasajima A, Schmitt M, Schwamborn K, Groll T, Schicktanz F, Delbridge C, Schütze LM, Wilhelm D, Lang C, Lange S, Foersch S, Jank P, Steiger K, Werder AV, Denkert C, Weichert W, Klöppel G, Jesinghaus M. Neuroendocrine Differentiation in Conventional Colorectal Adenocarcinomas: Incidental Finding or Prognostic Biomarker? *Cancers (Basel)*. 2021 Oct 12;13(20):5111. doi: 10.3390/cancers13205111. PMID: 34680258; PMCID: PMC8533893.
- 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. Loss of SATB2 Occurs More Frequently Than CDX2 Loss in Colorectal Carcinoma and Identifies Particularly Aggressive Cancers in High-Risk Subgroups. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 7;13(24):6177. doi: 10.3390/cancers13246177. PMID: 34944797; PMCID: PMC8699173.

Weitere Veröffentlichungen:

- 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. Cellular dissociation grading on biopsies of pulmonary squamous cell carcinoma provides prognostic information across all stages and is congruent with resection specimen grading. *J Pathol Clin Res.* 2022 Nov;8(6):567-578. doi: 10.1002/cjp2.295. Epub 2022 Sep 16. PMID: 36111649; PMCID: PMC9535098.

12 Danksagung

Meinen herzlichsten Dank möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Moritz Jesinghaus aussprechen. Er hat mich während meiner gesamten Dissertationszeit mit großem Engagement und fachlicher Kompetenz betreut. Seine wertvollen Anregungen und Korrekturen waren für mich von unschätzbarem Wert. Herr Prof. Dr. med. Moritz Jesinghaus hat sich stets Zeit genommen, um meine Fragen zu beantworten, meine Gedanken zu diskutieren und mir darüber hinaus wertvolle Einblicke in das Fach Pathologie gegeben. Auch wenn ich mich schlussendlich nicht für eine Laufbahn in der Pathologie entschieden habe, hat seine Unterstützung meine persönliche als auch berufliche Entwicklung maßgeblich geprägt.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Mentor Markus Tschurtschenthaler PhD für die Mitbetreuung dieser Arbeit und seine Unterstützung.

Ich möchte mich auch bei meinen Gutachtern für ihre kritische und konstruktive Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ein weiterer Dank geht auch an Herrn Professor Dr. med. Wilko Weichert unter dessen Leitung am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München die Erstellung der Promotionsarbeit erst möglich gemacht worden ist.

Mein Dank gilt außerdem meinem Studienkollegen und Co-Doktoranden Herrn Maxime Schmitt der stets für Fragen offen war und hilfreiche Korrekturvorschläge anbrachte. Vielen Dank für die kontinuierlichen motivierenden und aufbauenden Gespräche während der Erstellung der Promotionsarbeit.

Insgesamt möchte ich mich auch bei allen Angestellten des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München bedanken, die bei der Erstellung der Kohorte, dem Zusammensuchen der erforderlichen Präparate und der Anfertigung der Untersuchungsobjekte tatkräftig mitgewirkt haben.

Ein Dank geht auch an meine Freunde, die sich immer als unterstützend und verständnisvoll gezeigt hatten. Der gegenseitige Erfahrungsaustausch war sehr wertvoll für mich.

Schlussendlich widme ich meine Promotionsarbeit meinen Eltern Elena Lang und Reinhold Lang. Hierbei geht mein außerordentlicher Dank an meine Mutter Elena Lang, an die wichtigste Frau in meinem Leben, die nicht nur kontinuierlich motivierende Worte für mich fand, sondern

auch immer ein umsorgtes, verständnisvolles Umfeld schaffte, sodass die Anfertigung der Arbeit erst möglich war.