

# **MMP-13: ein Marker der kolorektalen Karzinogenese**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Anna-Katharina Wernicke**

aus Frankfurt am Main

Gießen 2017

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik II  
Schwerpunkt Gastroenterologie  
*Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb MA*  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Roeb

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Rummel

Tag der Disputation: 16.07.2018

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 26.06.2017

## VERÖFFENTLICHUNGEN:

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

## ABSTRACT:

**Wernicke, A.-K.**; Burchert, D.; Roderfeld, M.; Roeb, E.: MMP-13 ist ein potentieller Marker der kolorektalen Karzinogenese, *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53 (08), 2015. 10.1055/s-0035-1559058

## ORIGINALARBEITEN:

**Wernicke, A.-K.**; Churin, Y.; Sheridan, D.; Windhorst, A.; Tschuschner, A.; Gattenlohner, S. ; Roderfeld, M.; Roeb, E.: Matrix metalloproteinase-13 refines pathological staging of precancerous colorectal lesions, *Oncotarget*, 2016. 10.18632/oncotarget.12429

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Zielsetzung .....	2
3	Theoretische Grundlagen.....	3
3.1	Das kolorektale Karzinom.....	3
3.1.1	Epidemiologie .....	3
3.1.2	Ätiologie .....	3
3.1.3	Klinik.....	4
3.1.4	Diagnostik.....	4
3.1.5	Therapie .....	5
3.1.6	Stadieneinteilung und Prognose .....	7
3.1.7	Metastasierungswege.....	8
3.2	Kolorektale Adenome .....	9
3.2.1	Grundlagen.....	9
3.2.2	Adenom-Karzinom-Sequenz.....	13
3.2.3	Therapie und Nachsorge .....	16
3.3	Extrazelluläre Matrix und Matrix Metalloproteinasen.....	17
3.3.1	Extrazelluläre Matrix .....	17
3.3.2	Matrix Metalloproteinasen.....	18
3.3.3	Regulation der MMP-Aktivität .....	21
3.3.4	Synthetische Inhibitoren der MMP .....	22
3.3.5	MMP und das kolorektale Karzinom .....	24
3.4	MMP-13 .....	26
3.4.1	Struktur und Charakterisierung .....	26
3.4.2	Rolle von MMP-13 in der kolorektalen Karzinogenese und Metastasierung.....	28
4	Material und Methoden .....	30
4.1	Geräte und Materialien .....	30
4.1.1	Geräte .....	30
4.1.2	Verbrauchsgegenstände.....	31
4.1.3	Chemikalien.....	31
4.1.4	Kommerzielle Kits.....	33
4.1.5	Verwendete Antikörper .....	33
4.2	Patientenkollektiv .....	34
4.3	Immunhistochemische Färbung.....	34
4.3.1	Prinzip .....	34

## Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Durchführung.....	35
4.3.3	Doppelfärbungen.....	36
4.3.4	Auswertung der Immunhistochemischen Färbung.....	37
4.4	Proteinextraktion.....	39
4.5	Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz.....	40
4.6	Western Blot.....	41
4.6.1	Prinzip.....	41
4.6.2	Proteinseparation durch SDS-PAGE.....	42
4.6.3	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran.....	44
4.6.4	Proteindetektion.....	45
4.6.5	Stripping.....	46
4.7	Statistische Auswertung.....	47
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Patientenkohorte.....	48
5.2	MMP-13-Expression in Abhängigkeit des pathologischen Stadiums..	49
5.3	Diskriminierung von präkanzerösen kolorektalen Läsionen durch IRS52	
5.4	Zellulärer Ursprung von MMP-13 in KRK.....	54
5.5	Evaluierung des IRS mittels Western Blot.....	56
6	Diskussion.....	57
6.1	Ergebnisdiskussion.....	58
6.1.1	Repräsentative demographische und klinische Merkmale der Patientenkohorte.....	58
6.1.2	MMP-13-Expression in der Adenom-Karzinom-Sequenz.....	61
6.1.3	Diskriminierung der präkanzerösen kolorektalen Läsionen mittels IRS	62
6.1.4	Der zelluläre Ursprung von MMP-13 im KRK.....	64
6.1.5	Bestätigung des IRS-Scoring durch Western Blot-Analyse.....	67
6.2	Limitation der Studie.....	69
6.3	Ausblick.....	70
7	Zusammenfassung.....	72
8	Summary.....	73
9	Literaturverzeichnis.....	74
10	Abbildungsverzeichnis.....	84
11	Tabellenverzeichnis.....	85
12	Abkürzungsverzeichnis.....	86
13	Danksagung.....	89

## 1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist die dritthäufigste Krebsdiagnose weltweit (Robert-Koch-Institut 2016). Ein wichtiger Punkt, um die Überlebensrate zu verbessern, ist die richtige Diagnose sowie die korrekte Einschätzung des Gefährdungsgrades. Für die Verbesserung der Überlebensrate ist die Diagnose und Behandlung in einem frühen Stadium wichtig. Die überwiegende Anzahl von KRK entsteht in einem mehrstufigen Prozess genetischer Mutationen aus zunächst gutartigen Adenomen (Vogelstein et al. 1988). Die maligne Transformation erfolgt sukzessive über Mutationen von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen. Dieses Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz wurde erstmals durch Fearon und Vogelstein beschrieben. In einer Zeitdauer von 10-15 Jahren entstehen in diesem Modell KRK auf dem Boden eines Adenoms mit zunächst niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien (low-grade), welche sich im Verlauf von Jahren zu hochgradigen intraepithelialen Neoplasien (high-grade) weiterentwickeln. Nach Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen kommt es zur Ausbildung eines Karzinoms mit infiltrativem und metastasierendem Wachstum.

Die meisten Fälle der kolorektalen Karzinome sind gekennzeichnet durch eine verstärkte Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMP)-3, -7, und -13 (Rath et al. 2010). MMP-7 und MMP-13, werden primär auf der Oberfläche der Tumorzelle exprimiert und sind bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht. Studien zeigen, dass die Expression von MMP-13 mit der Entwicklung und Progression des KRK korreliert. 91% der KRK zeigen einen immunhistochemischen Nachweis von MMP-13 (Leeman et al. 2002a). Ein Vergleich der MMP-13 Genexpression mit klinisch pathologischen Faktoren erbrachte eine hohe Korrelation mit der hepatischen Metastasierung, einer schlechten Prognose und einer frühen Rezidivrate der KRK (Yamada et al. 2010). Auch bei präkanzerösen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und adenomatösen Polypen konnten erhöhte MMP-13 Spiegel beobachtet werden, wenn auch deutlich niedriger als in kolorektalen Karzinomen (Rath et al. 2006). In Adenomen könnte MMP-13 demnach als früher Indikator für die kolorektale Karzinogenese dienen. Systematische Studien zur Klärung dieser These fehlten bislang.

## **2 Zielsetzung**

Ziel dieser Studie war die semiquantitative Erfassung von MMP-13 in adenomatösen kolorektalen Polypen in Assoziation zur Neoplasieentwicklung. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob MMP-13 das Neoplasiepotential von Adenomen vorhersagen kann. Die Biopsate von Patienten wurden im Rahmen einer retrospektiven monozentrischen Studie nach routinemäßig durchgeführten Koloskopien mit Polypektomie oder Operationen an KRK rekrutiert. Das Biopsiematerial wurde in Bezug auf hyperplastische Anteile sowie low-grade und high-grade Dysplasien konventionell histopathologisch untersucht. In parallelen Schnitten wurde MMP-13 immunhistochemisch semiquantitativ analysiert.

Das Hauptziel der Analyse war die Evaluation von MMP-13 als potentiell Biomarker für das Risiko der Entwicklung eines KRK.

## **3 Theoretische Grundlagen**

### **3.1 Das kolorektale Karzinom**

#### **3.1.1 Epidemiologie**

Jede siebte Krebserkrankung in Deutschland betrifft das Kolon (Robert-Koch-Institut 2016). Im Jahr 2013 erkrankten 34.000 Männer und 29.000 Frauen am kolorektalen Karzinom (KRK). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit KRK liegt bei 64%. Darmkrebs ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern (nach dem Lungenkarzinom) und bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) (Robert-Koch-Institut 2016). Das Erkrankungsrisiko steigt mit fortschreitendem Alter an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 71. und 75. Lebensjahr, nur etwa 10% der Betroffenen erkranken vor dem 55. Lebensjahr (Robert-Koch-Institut 2016), also vor der angebotenen Darmspiegelung zur Vorsorge. Das Lebenszeitrisiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland 4-6%, an ihm zu sterben 2-3% (Robert-Koch-Institut 2016). Weltweit gesehen gibt es große Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit. Das kolorektale Karzinom ist vor allem eine Erkrankung der westlichen Industriestaaten, hier ist die Inzidenz bis zu zehn Mal höher als in Entwicklungsländern (Haggar et al. 2009).

Seit der Einführung der Darmkrebsfrüherkennungsmaßnahme sank die Mortalität stetig (Brenner et al. 2010a).

#### **3.1.2 Ätiologie**

Die häufigste Form des kolorektalen Karzinoms ist das sporadische Karzinom, welches 90% der KRK ausmacht, die restlichen 10% sind auf genetische Faktoren zurück zu führen. Hierbei sind für 5-10% das hereditäre nichtpolypöse Karzinom Syndrom (HNPCC) verantwortlich, für 1% die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) (Haggar et al. 2009).

Bei der Entstehung des sporadischen Kolonkarzinoms werden Risikoerkrankungen, Risikofaktoren und Ernährungsfaktoren als Ursachen verantwortlich gemacht. Zu den Erkrankungen, die mit einer höheren Inzidenz an KRK einhergehen, gehören chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und seltener Morbus Crohn (Rath et al. 2006). Risikofaktoren die mit einem erhöhten Vorkommen einhergehen sind zunehmendes Alter,

langjähriges Zigarettenrauchen und hoher Alkoholkonsum (Haggard et al. 2009). Als weitere mögliche beeinflussende Faktoren werden ballaststoffarme, fettreiche und fleischreiche Ernährung diskutiert (Santarelli et al. 2008; Fu et al. 2011).

### **3.1.3 Klinik**

Die Symptome beim KRK sind oft unspezifisch, und es gibt keine zuverlässigen Frühsymptome. Folgende Symptome können beim KRK auftreten:

- Blutbeimischung zum Stuhl
- Eine Änderung der Stuhlgewohnheiten wie Flatus mit Stuhlabgang aufgrund eines schlaffen Sphinktertonus
- Leistungsminderung und Müdigkeit
- Ileus
- Chronische Blutungsanämie
- Schmerzen

### **3.1.4 Diagnostik**

Als Screeningverfahren des KRK zur Früherkennung dienen die rektal-digitale Untersuchung, der guajakbasierte Stuhlbluttest und die Koloskopie, das Verfahren, mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (Leitlinie KRK Onkologie, 2015). Mit der digital-rektalen Untersuchung können 10% aller KRK getastet werden. Der guajakbasierte Stuhlbluttest dient dem Nachweis von okkultem Blut (Gregor 1971). Dabei werden Stuhlproben von drei aufeinanderfolgenden Stuhlgängen auf Filterpapier gestrichen und mit Wasserstoffperoxid betropft. Bei Anwesenheit von Blut im Stuhl färbt das Wasserstoffperoxid den Teststreifen blau. Der guajakbasierte Stuhlbluttest liefert falsch-positive Ergebnisse bei Verzehr von rohem Fleisch oder bei Blutungen aus anderen Gründen, wie zum Beispiel Hämorrhoiden. Falsch-negative Ergebnisse liefert der Test bei dem Verzehr von Antioxidantien (Konrad und Katz 2012).

Die Sensitivität des Testes für KRK beträgt nur etwa 20 bis 40% (Allison et al. 1996). Da viele Karzinome intermittierend bluten, führt die wiederholte Testung zu einer zuverlässigeren Erkennung von KRK, die Sterblichkeitsrate lässt sich so um etwa 20% senken (McLoughlin et al. 2006).

Zur prätherapeutischen Ausbreitungsdiagnostik dienen eine Computertomographie des Abdomens, eine Oberbauchsonographie, eine

Thoraxröntgenaufnahme und je nach Verdacht auf Infiltration zusätzliche gynäkologische oder urologische Diagnostik (Leitlinie Onkologie KRK, 2015).

In Abhängigkeit vom Tumorstadium findet sich bei einem Teil der Patienten ein erhöhter Serumspiegel an CEA (Carcino-embryonales-Antigen) (Duffy et al. 2001). CEA ist nicht tumorspezifisch. So ist es auch bei Tumoren des Pankreas, der Mamma oder Adenokarzinomen der Lunge erhöht. CEA hat vor allem eine Bedeutung in der Nachsorge des KRK, präoperativ erhöhte CEA-Werte normalisieren sich bei kompletter Tumorentfernung und steigen bei einem Rezidiv wieder an (Duffy et al. 2001).

### **3.1.5 Therapie**

Die Therapie des KRK richtet sich nach dem Tumorstadium und der Tumorlokalisation. Hiervon abhängig sind verschiedene therapeutische Verfahren möglich. In der Regel ist es das Ziel, den Tumor und das zugehörige Lymphabflussgebiet chirurgisch zu entfernen. Die Diagnostik und Therapie des KRK sind im Detail in der S3 Leitlinie geregelt ([www.dgvs.de](http://www.dgvs.de)).

Folgende Therapieverfahren stehen zur Verfügung:

**Chirurgie:**

Eine vollständige chirurgische Entfernung des KRK wird in frühen Stadien angestrebt, aber auch in späteren Stadien ist eine Operation indiziert, um Komplikationen wie einen Ileus oder eine signifikante Blutung zu vermeiden. Die Operation erfolgt in der Regel offen. Die meisten Tumore werden durch eine Hemikolektomie oder Entnahme von Darmsegmenten reseziert. Bei Tumoren des mittleren und unteren Rektums ist eine totale mesorektale Exzision indiziert, wobei neben dem Rektum auch der umgebenden Fett- und Bindegewebskörper mit den darin enthaltenen Lymphknoten entfernt wird (Bokey et al. 1999).

**Chemotherapie:**

In fortgeschrittenen Stadien wird zusätzlich zur Operation eine Chemotherapie eingesetzt. Hierzu dienen verschieden Substanzen, die kombiniert und je nach Tumorstadium zeitlich eingesetzt werden. Dabei ist zwischen drei verschiedenen Therapieschemen zu unterscheiden.

Bei der neoadjuvanten Therapie wird eine präoperative Chemotherapie eingesetzt, um eine bessere Operabilität zu erreichen. Diese Therapie ist bei fortgeschrittenem Rektumkarzinom im Stadium UICC II und III (*Union internationale contre le cancer*) empfohlen.

Bei der adjuvanten Therapie wird eine Chemotherapie nach der Operation gegeben, um eventuell noch vorhandene Tumorzellen zu zerstören. Diese Therapie ist beim Kolonkarzinom im Stadium UICC III empfohlen, in früheren Stadien (UICC IIa) kann bei Risikokonstellationen wie Tumorperforation oder Notfalloperation eine Chemotherapie gegeben werden. Als Chemotherapeutika werden hier vor allem 5-Fluorouracil mit Folinsäure und Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) oder anstelle von Oxaliplatin Irinotecan eingesetzt (FOLFIRI-Schema) (Leitlinien KRK Onkologie 2015).

Bei fortgeschrittenen Stadien, in denen keine Heilung mehr erreicht werden kann, wie z.B. inoperablen Metastasen, kommt eine palliative Chemotherapie zum Einsatz, die zum Ziel hat, Schmerzen zu lindern und Lebensqualität zu erhalten.

Strahlentherapie:

Eine Bestrahlung kann als neoadjuvante Therapie in Kombination mit Chemotherapie beim Rektumkarzinom ab dem Stadium UICC II eingesetzt werden. Hierzu dienen als Chemotherapie vor allem 5-Fluorouracil, Zieldosis der neoadjuvanten Strahlentherapie sind 50 Gray (Sauer 2003).

Antikörpertherapie:

Vor allem bei bereits metastasiertem Kolonkarzinom können monoklonale Antikörper therapeutisch eingesetzt werden. Diese richten sich entweder gegen den VEGF- oder den EGF-Rezeptor (Tol et al. 2010). Der Antikörper Bevacicumab blockiert den VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und hemmt damit die Angiogenese (Saltz et al. 2008). Alternativ ist eine Kombination der Chemotherapie mit dem Antikörper Cetuximab möglich. Er richtet sich gegen den EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor) (van Cutsem et al. 2008).

Der Antikörper hemmt den EGF-Rezeptor, was zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums führt. Ein Einsatz ist allerdings nur bei K-ras mutiertem Tumorgewebe möglich (van Cutsem et al. 2008).

### 3.1.6 Stadieneinteilung und Prognose

Die Prognose des KRK hängt entscheidend vom dem Tumorstadium und dem Erfolg der Operation ab (Petersen et al. 2002). Zur Stadieneinteilung wurden zahlreiche Klassifikationen erstellt, derzeit die angesehenste ist die Klassifikation der UICC. Dieser liegt die TNM-Klassifikation zugrunde.

TNM-Klassifikation:

<i>Primärtumor</i>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<i>Regionäre Lymphknoten</i>	
NX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionalen Lymphknoten
<i>Fernmetastasen</i>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

**Tabelle 1: TNM- Klassifikation**

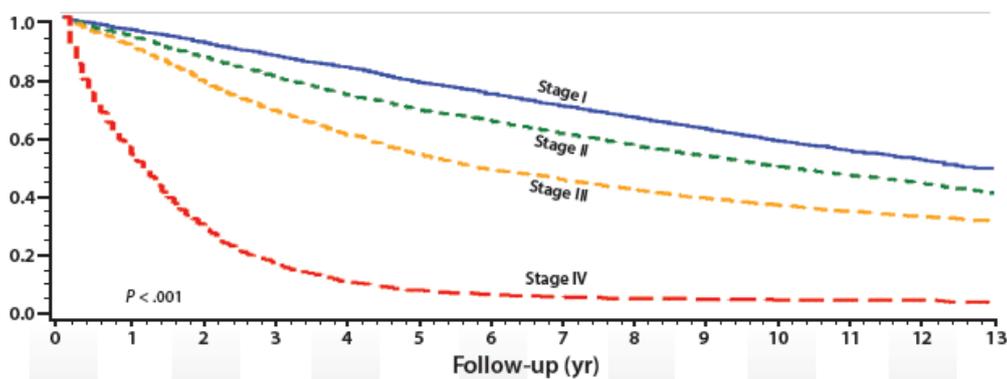
Stadieneinteilung der UICC:

<i>Stadium</i>	<i>Tumor</i>	<i>Lymphknoten</i>	<i>Metastasen</i>
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0

IIb	T4	N0	M0
IIIa	Jedes T	N1	M0
IIIb	Jedes T	N2	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

**Tabelle 2: UICC Stadien**

Die Prognose ist abhängig vom Stadium bei Entdeckung des KRK. In frühen Stadien (UICC I, II) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 80-95% (Aizer et al. 2013), in späteren Stadien (UICC III) bei 55%, bei Vorliegen von Fernmetastasen im Stadium UICC IV liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch bei 5%.



**Abbildung 1: Überlebensrate KRK in Abhängigkeit des Stadiums**

Modifiziert nach Aizer et al. 2013.

### 3.1.7 Metastasierungswege

Das KRK kann auf verschiedene und Weise metastasieren. Dies bedeutet, dass Tumorzellen ihre Bindung zu ihrem Ursprungsgewebe verlieren, in Nachbargewebe infiltrieren, in Blutgefäße und Lymphspalten eindringen und mit dem Blutstrom in andere Gewebe verschleppt werden. Dort können die Tumorzellen sich weiter teilen und das Gewebe destruieren.

Per continuitatem:

Ausgehend vom Primärtumor infiltriert dieser die umgebenden Strukturen, wie das pericoliche Fettgewebe, sodass es zu einer übergangslosen Ausbreitung kommt.

### Lymphogene Metastasierung:

Das KRK kann in seinem Wachstum in Lymphkapillaren einbrechen und so über die Lymphbahn metastasieren. Der Ort der Metastasierung ist abhängig vom Tumorsitz und dem jeweiligen Lymphabflussgebiet. Dies kann in drei Etagen eingeteilt werden:

### Proximale kolorektale Karzinome:

Proximale Karzinome befinden sich ab 12 cm proximal der Anokutanlinie und metastasieren hauptsächlich über die paraaortalen Lymphknoten.

### Karzinome der mittleren Etage:

Diese befinden sich zwischen 6-12 cm ab Anokutanlinie und metastasieren zusätzlich nach lateral in die Beckenlymphknoten.

### Karzinome der unteren Etage:

Distale Rektumkarzinome befinden sich zwischen 0-6 cm ab Anokutanlinie. Diese haben die schlechteste Prognose, da sie zusätzlich zu den beiden oben beschriebenen Metastasenwegen noch in die inguinalen Lymphknoten metastasieren können.

### Hämatogene Metastasierung:

Kolorektale Karzinome metastasieren hämatogen über die Vena portae in die Leber und daraufhin in die Lunge. Bei 25% der Patienten finden sich bei Diagnosestellung bereits Lebermetastasen, über 50% der Patienten entwickeln diese im Verlauf (van der Geest et al. 2015). Aufgrund des anderen venösen Abflusses metastasieren tiefe Rektumkarzinome primär über die Vena cava inferior in die Lunge.

## **3.2 Kolorektale Adenome**

### **3.2.1 Grundlagen**

Die durchschnittliche Prävalenz kolorektaler Adenome in westlichen Industrienationen liegt bei 25% (Baretton et al. 2011). Der Begriff „Polyp“ beschreibt eine Schleimhautvorwölbung in das Darmlumen. Polypen können sowohl bösartig als auch gutartig sein. Kolorektale Polypen können bei 41-69%

der über 55-Jährigen nachgewiesen werden (Baretton et al. 2011), in der Regel verursachen diese keine Symptome und werden zufällig bei Abklärung eines positiven Guajak-Tests oder einer chronischen Anämie entdeckt (Strul et al. 2006).

Die Pathogenese und Prognose der Polypen richtet sich nach ihrer Histologie. Hier werden folgende Ursachen unterschieden:

- **Entzündlicher Polyp** → entsteht nach Operationen oder bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen
- **Neoplastischer Polyp** → epithelialer oder mesenchymaler Tumor; am häufigsten sind Adenome, die vom Kolonepithel ausgehen
- **Hamartom** → angeborene tumorartige Läsion, die gehäuft bei genetischen Syndromen auftritt

Kolorektale Adenome entwickeln sich ausgehend vom Kolonepithel. Hierbei werden klassische Adenome von serratierten und gemischten Adenomen unterschieden. Histologisch können die klassischen Adenome noch in ihrem Aufbau und dem Grad der Dysplasie unterschieden werden. Im Aufbau werden folgende Formen unterschieden:

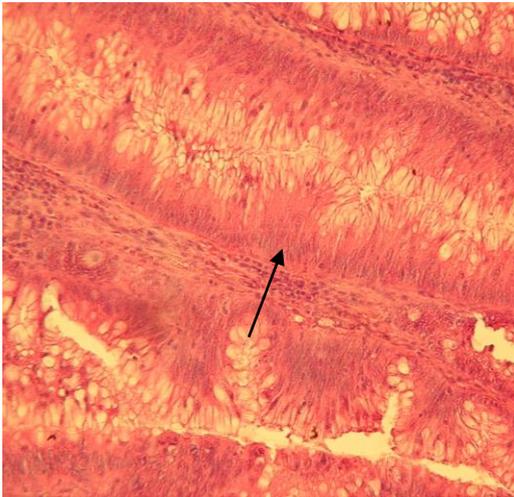
- **Tubulär** → aus verzweigten Tubuli aufgebaut, die in die Lamina propria eingebettet sind
- **Villös** → vorwiegend aus zottenartigen neoplastischen Ausstülpungen der Lamina propria mit neoplastischem Oberflächenepithel aufgebaut. Das villöse Adenom des Kolorektums ist ein flaches Adenom, selten kann es auch gestielt auftreten.
- **Tubulovillös** → gemischte Form, ist aufgebaut sowohl aus tubulären, als auch aus villösen Strukturen (Kolorektales Adenom, Spezielle Pathologie 2015)

Neben der Einteilung der Form wird der Dysplasiegrad angegeben. Hier unterscheidet die WHO low-grade von high-grade Dysplasien. Diese sind folgendermaßen zu unterscheiden:

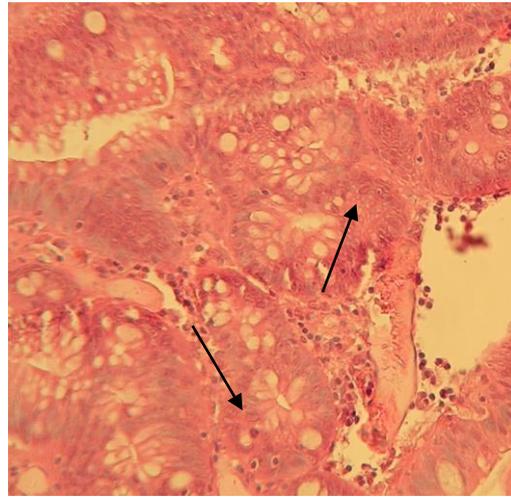
- **Low-grade Dyplasie:** vergrößerte, ovaläre oder spindelförmige, gering hyperchromatische, relativ gleichförmige Zellkerne. Die Kernstratifizierung

bleibt in aller Regel auf das untere Drittel der Epithelhöhe beschränkt. Die Anzahl der Becherzellen ist vermindert. Die Kern-Plasma-Relation ist gering zugunsten der Zellkerne verschoben.

- **High-grade Dysplasie:** erhöhte Kernpleomorphie mit prominenten Nukleolen, erhebliche Hyperchromasie, den vollständigen Verlust der Zellpolarität und das Auftreten von intraglandulären Verzweigungen (Baretton et al. 2011).



Low-grade



High-grade

**Abbildung 2: Darstellung HE-Färbung eines low-grade und high-grade Adenoms**

*Low-grade Adenom in 200-facher Vergrößerung. Darstellung der nukleären Hyperchromasie, sowie Vergrößerung und Verlängerung der Zellkerne und hypereosinophiles Zytoplasma. High-grade Adenome in 200-facher Vergrößerung: Darstellung der nukleären Stratifikation, Verlust der Zellpolarität, und nukleärer Pleomorphismus.*

Neben den klassischen Adenomen werden die serratierten Adenome unterschieden. Wie auch die klassischen Adenome entwickeln sich die serratierten Adenome zu KRK (Munding und Tannapfel 2013). Die aus serratierten Adenomen entstehenden KRK unterscheiden sich in ihrem biologischen Verhalten, der Lokalisation und ihrem molekularen Profil. Eine Übersicht der Unterschiede zwischen den klassischen Adenomen und den serratierten Adenomen zeigt die folgende Tabelle:

	<b>Klassisches Adenom</b>	<b>Hyperplastischer Polyp</b>	<b>Sessiles serratiertes Adenom</b>	<b>Traditionelles serratiertes Adenom</b>
Lokalisation	Distal > proximal	Distal > proximal	Distal < proximal	Distal > proximal
Makroskopie	Polypös, vorgewölbt, teilweise gestielt	Flach, klein, im Rektum häufig multipel	Sessil, flach; endoskopisch gelblich mit Schleimkappe	Vorgewölbt, gestielt
Mikroskopie	Tubuläre, tubulovillöse oder villöse Histologie und Verlust der Becherzellen	Mikrovesikulärer Subtyp  Becherzellreicher Subtyp	Serration mit Verzweigung an der Basis	Fingerförmige Serration mit ovalen Kernen, eosinophiles Zytoplasma
Molekulare Marker	APC-Mutation, CIMP-, MSS	Muzinarmer Subtyp Je nach Subtyp <i>K-ras</i> - oder <i>BRAF</i> -Mutationen	<i>BRAF</i> -Mutation  CIMP+, MSI oder MSS	<i>K-ras</i> -Mutation  CIMP-L, MSS
Patientencharakteristika	Keine Geschlechtsprädisposition, Häufigkeitszunahme mit dem Alter	Keine Geschlechtsprädisposition, Häufigkeitszunahme mit dem Alter  10 Jahre früher als klassische Adenome	Frauen häufiger betroffen	Männer häufiger betroffen

**Tabelle 3: Unterschiede zwischen klassischen und serratierten Adenomen**

*Modifiziert nach Munding und Tannapfel 2013.*

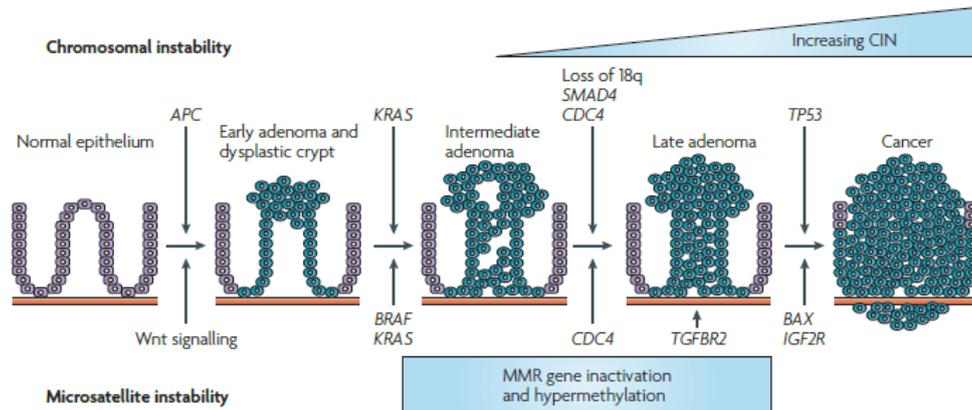
Histomorphologisch werden serratierte Läsionen in verschiedene Subtypen unterteilt. Die WHO unterscheidet hier Läsionen mit und ohne Dysplasien.

Diese werden unterteilt in hyperplastische, sessil serratierte und traditionell serratierte Adenome. Charakteristisch für die serratierten Adenome ist die sägezahnartige Epithelauffaltung. Histologisch gekennzeichnet sind sie durch eine Serration mit basalen Architekturstörungen mit L-förmiger Kryptenkonfiguration und teilweise einer Pseudoinvasion (Tannapfel et al. 2010b). Bei den serratierten Adenomen und hyperplastischen Polypen liegt die Pathologie im Kryptenboden. Bei hyperplastischen Polypen ist im Wesentlichen

die Apoptose herunterreguliert, sodass die nach oben wandernden Zellen eine längere Lebenszeit aufweisen. Das Kryptenepithel staut sich auf, es entsteht eine so genannte Serratierung. Molekularbiologisch zeigt sich in diesen Zellen eine Herabregulation des Apoptose-Rezeptors Fas (Holinski-Feder E, Morak M, 2015). Häufig findet man bei serratierten Adenomen eine vermehrte Muzinbildung (Holinski-Feder E, Morak M, 2015). Außerdem liegt ein erhöhtes Entartungsrisiko bei serratierten Adenomen mit einer erhöhten Zellproliferation in der Krypte vor. Molekularbiologisch steht eine BRAF-Mutation im Vordergrund der Adenominitiation. BRAF als Protoonkogen stellt einen wesentlichen Apoptoseinhibitor dar und eine aktivierende Mutation dieses Gens bildet den zentralen Mechanismus der Entwicklung serratierter Läsionen (Tannapfel et al. 2010b). Weitere Beispiele für Karzinome, die mit einer BRAF Mutation assoziiert sind, sind neben dem KRK maligne Melanome und Schilddrüsenkarzinome (Tannapfel et al. 2010a).

### **3.2.2 Adenom-Karzinom-Sequenz**

Bis zu 90% der kolorektalen Karzinome entstehen infolge von genetischen Veränderungen, die dazu führen, dass eine Transformation des normalen Kolonepithels über eine Zwischenstufe der adenomatösen Polypen zum Karzinom durchlaufen wird. Fearon und Vogelstein haben 1988 ein Modell entwickelt, welches die genetische Basis des kolorektalen Karzinoms als einen mehrstufigen Prozess erklärt (Adenom-Karzinom-Sequenz). Die Neoplasie entsteht nicht aus einer einzelnen genetischen Veränderung, sondern durch Häufung verschiedener genetischer Mutationen von Tumorsuppressoren bzw. Onkogenen (Vogelstein et al. 1988).



**Abbildung 3: Adenom-Karzinom-Sequenz**

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist Folge einer Reihe molekulargenetischer Veränderungen. Die Inaktivierung des APC-Gens wird dabei als initialer Schritt betrachtet. Nachfolgende Onkogenmutationen, wie die des K-ras-Gens, stoßen das Wachstum der APC-mutierten Zelle an und führen zu deren klonaler Expansion. Die Mutation des p53 induziert den Übergang in das maligne Wachstum. Darstellung nach Walther et al. 2009.

Dieses Modell der chromosomalen Instabilität gilt aus heutiger Sicht für ca. 60% der sporadischen KRK und der familiären adenomatösen Polyposis (Tannapfel et al. 2010a). Charakteristisch ist der Zugewinn oder Verlust von genetischem Material. 15% der KRK weisen keine chromosomale Instabilität auf, sondern eine Mikrosatelliteninstabilität (Tannapfel et al. 2010). Hierbei ist die Tumorprogression beschleunigt und Tumore treten bei schon vorhandener Keimbahnmutation nach nur einer weiteren somatischen Inaktivierung auf. In einer Zeitdauer von 10-15 Jahren entstehen in dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz KRK auf dem Boden eines Adenoms mit zunächst niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien, welche sich im Verlauf von Jahren zu hochgradigen intraepithelialen Neoplasien weiterentwickeln.

Nach Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen kommt es zur Ausbildung eines Karzinoms mit infiltrativem und metastasierendem Wachstum. Die Mutationen, die im Rahmen der von Vogelstein beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz auftreten, betreffen in einer charakteristischen Abfolge APC (Adenomtaous-polyposis-coli-Gen), K-ras (Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog), DCC (deleted in colorectal carcinomas) und p53 (Munding und Tannapfel 2009). Mutationen des APC-Gens, treten früh im Zuge der Adenomentstehung auf. Mit zunehmender Entwicklung höhergradiger IEN werden danach aktivierende Mutationen von K-ras und nachfolgend von p53

nachweisbar. Veränderungen von p53 gehen häufig mit nachweisbarer Malignität einher (Munding und Tannapfel 2009).

Folgende Mutationen sind an der Entwicklung des KRK beteiligt:

- **APC-Geninaktivierung:** Dieser Defekt wird bei der FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) autosomal dominant vererbt, bei dem sporadischen KRK erfolgt dies durch zwei erworbene somatische Mutationen. Die APC-Geninaktivierung führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Dies führt zu einer vermehrten Transkription von Zielgenen, die Zellproliferation, Zellzykluskontrolle und Apoptose-Inhibition beeinflussen (Walther et al. 2009). Neben der Regulation von Zell-Zell-Adhäsionen ist  $\beta$ -Catenin an der Expression von Onkogenen wie myc und der Metalloproteinase Matrylisin (MMP-7) beteiligt (Yang et al. 2008).
- **Aktivierung von K-ras Onkogen und Alterationen auf dem langen Arm des Chromosom 18:** Das K-ras-Gen kodiert für GTP-bindende Proteine, die eine Rolle in der Transduktion proliferationsstimulierender Signale einnehmen. Mutationen führen zu einer konsekutiven Aktivierung, mit der Folge einer persistierenden mitotischen Stimulation (Walther et al. 2009).
- Neben der Aktivierung von K-ras tritt ein Verlust des langen Arms des Chromosoms 18 auf. Hier sind vor allem die Gene für SMAD-4, SMAD-2 und DCC von Bedeutung, die Tumorsuppressorgene codieren und somit in die Wachstums- und Differenzierungskontrolle eingreifen (Walther et al. 2009). Hierbei konnte für das SMAD-4 Gen gezeigt werden, dass es für ein Protein codiert, das an der intrazellulären Signaltransduktion von TGF- $\beta$  beteiligt ist. TGF- $\beta$  wirkt auf Grund seiner antiproliferativen, pro-apoptotischen und anti-angiogenetischen Wirkung als Tumorsuppressor. Im Rahmen von Mutationen reagieren die Tumorzellen allerdings auf TGF- $\beta$  nicht mehr und es kommt zu einer Tumorprogression (Zhou et al. 1998).
- **Mutation des Tumorsuppressorgens p53:** Der Übergang zum high-grade Adenom oder Karzinom ist durch den Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 17 gekennzeichnet; hier ist das Tumorsuppressorgen p53 lokalisiert. Die Funktion von p53 ist eine Aktivierung des DNA-Reparatursystems, Anhalten des Zellzyklus oder Initiierung der Apoptose. Bei einer Mutation sind die Zellen nicht mehr in der Lage, in die Apoptose einzutreten, sodass es zu einem ungehemmten Wachstum kommt (Bullock und Fersht 2001).

### 3.2.3 Therapie und Nachsorge

Aufgrund der Rolle kolorektaler Adenome als Vorstufe des KRK ergibt sich die Indikation der endoskopischen Ektomie als Therapie. Ziel hierbei ist die komplette Entfernung des Adenoms. Um histologisch sichere Aussagen zu erhalten, ist bei Polypen > 5 mm eine vollständige Schlingenektomie, bei Polypen ≤5 mm die Zangenabtragung indiziert (Leitlinie KRK Onkologie 2015). Die anschließende histologische Untersuchung ist obligat und erfolgt nach den WHO-Kriterien. Neuere Studien beschäftigen sich aufgrund der steigenden Kosten der histologischen Untersuchung mit der so genannten „resect and discard“-Methode (Polypen entfernen und wegwerfen). So wird vor allem in der USA diskutiert, winzige (<5 mm) oder kleine (<1 cm im Durchmesser) Polypen zwar zu entfernen, nicht jedoch histopathologisch aufzuarbeiten (Tannapfel et al. 2015). Voraussetzung der „resect and discard“-Methode ist die Möglichkeit, mit neuen, hoch auflösenden Verfahren eine Charakterisierung der Polypen bereits endoskopisch zu erreichen (Tannapfel et al. 2015). Konventionelle Weißlicht-Endoskopie besitzt hierfür eine zu geringe Sensitivität und Spezifität (Sensitivität bis max. 76 %, Spezifität bis max. 97 %), zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen Polypen zu differenzieren (Yoshida et al. 2012). Demgegenüber erreichen modernere Verfahren der Chromoendoskopie aktuell in Studien Sensitivitäten bis 97 % und Spezifitäten bis zu 100 % (Rath et al. 2015). Die „resect and discard“-Methode ist derzeit noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Kritische Aspekte an diesem Verfahren sind unter anderem, dass die Erfahrung des Untersuchers einen Einfluss auf das Ergebnis hat und es derzeit noch an einer flächendeckenden technisch-endoskopischen Voraussetzung fehle. Auch sei in den bisherigen Studien ein ungleiches Vorgehen vorausgesetzt worden, sowie sessil serratierte Adenome nicht mit eingeschlossen worden (Tannapfel et al. 2015).

In der S3 Leitlinie des KRK bestimmt die histopathologische Diagnose die individuelle Nachsorge. So besteht nach Abtragung kleiner, einzelner, nicht neoplastischer Polypen keine Notwendigkeit einer endoskopischen Nachsorge. Die Sondergruppe von Patienten mit einer Abtragung flacher oder sessiler Adenome in Piecemeal-Technik sollte wegen der erhöhten Lokalrezidivrate in kürzeren Abständen eine Kontroll-Koloskopie erhalten (2-6 Monaten). Patienten mit multiplen Adenomen besitzen ein Risiko, fortgeschrittene Läsionen oder ein KRK zu entwickeln, sodass sich die Empfehlung einer Kontroll-Koloskopie nach Anzahl und Größe der Polypen richtet.

<b>Charakterisierung des/der Polypen Histologie, Zusatzkriterien</b>	<b>Koloskopie- intervall</b>	<b>Evidenzstärke</b>
Tubuläres Adenom - 1-2 Polypen < 1 cm groß und ohne höhergradige intraepitheliale Neoplasie	5 Jahre	2b
Tubuläres Adenom - 2-10 Polypen oder - 1 Polyp > 1cm oder - 1 Polyp mit villöser Histologie	3 Jahre	1b
Tubuläres Adenom - mit hochgradiger intraepithelialer Neoplasie und mit histologische bestätigter vollständiger Abtragung	3 Jahre	1b
Tubuläres Adenom - mit hochgradiger intraepithelialer Neoplasie, nicht histologisch vollständig abgetragen	2-6 Monate	3b
Große flache oder sessile Adenome, in Piecemeal-Technik abgetragen	2-6 Monate	3b
Mehr als 10 Adenome	< 3 Jahre	3b

**Tabelle 4: Empfehlungen zur Nachsorge nach koloskopischer Polypektomie**

*Modifiziert nach Lubbers et al. 2010.*

### **3.3 Extrazelluläre Matrix und Matrix Metalloproteinasen**

#### **3.3.1 Extrazelluläre Matrix**

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist die Substanz, die den Zwischenraum zwischen den Zellen ausfüllt. Sie wird von den umliegenden Zellen gebildet und in den extrazellulären Raum sekretiert (Frantz et al. 2010). Der größte Teil der EZM wird von Fibroblasten gebildet. Sie synthetisieren fast alle Komponenten des Bindegewebes. Epithel- und Endothelzellen bilden die Basallamina. Die glatten Muskelzellen bilden Matrixmoleküle, die Gefäßen Reiß- und Zugfestigkeit verleihen. Die EZM setzt sich im Wesentlichen aus Kollagenen, Proteoglykanen, nichtkollagenen Glykoproteinen und Elastin zusammen. Kollagen macht fast 90% der EZM aus und verleiht dem Gewebe Zugfestigkeit (Frantz et al. 2010). Die größte Gruppe innerhalb der Kollagene sind die fibrillaren Kollagene (Typ-I, -II, -III, -V, und -XI). Kollagen Typ-IV ist der Hauptbestandteil der Basalmembran, welche die EZM von darüberliegenden Epithelen trennt und somit eine wichtige Barriere bei der Ausbreitung von Tumorzellen darstellt (Mouw et al. 2014).

Die EZM des Erwachsenen besitzt einen recht geringen Stoffumsatz, in bestimmten Situationen sind jedoch ein schneller Abbau bzw. Umbau erforderlich, wie z.B. bei der Wundheilung. Die Homöostase des EZM-Umbaus ist bei pathologischen Veränderungen, zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis oder der Metastasierung von Krebszellen, gestört (Wernicke et al. 2002).

Der Abbau der EZM-Moleküle wird durch spezifische Proteasen vermittelt. Einige sind Serinproteasen, die meisten gehören jedoch zu der Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMP). MMPs werden in ihrer Aktivität durch spezifische physiologische Inhibitoren reguliert, die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) (Arpino et al. 2015).

Normalerweise herrscht ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs. Störungen des Gleichgewichts führen zu einem erhöhten Kollagenabbau (z.B. bei Metastasierungen) oder zu erniedrigtem Kollagenabbau (z.B. bei Fibrose) (Löffler/Petrides, 2014).

### **3.3.2 Matrix Metalloproteinasen**

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) wurden erstmals im Jahre 1962 von Gross und Lapière (Gross und Lapiere 1962) beschrieben. MMPs stellen eine Familie von über 24 Zink-abhängigen Proteasen dar, die entweder sezerniert oder an die Membran gebunden sind (Illman et al. 2008). Sie katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen. Aufgrund ihrer Struktur und der Substratspezifität werden sie in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Hierbei sind folgende Klassen zu nennen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene MMPs sowie andere MMPs.

Enzym	Alternativer Name	Typische Substrate
<b>Kollagenasen</b>		
MMP-1	Kollagenase-1, Fibroblasten-Kollagenase	Kollagen I, II, III, IV, X, Pro- MMP-2 und -9
MMP-8	Kollagenase-2, Neutrophilen-Kollagenase	Kollagen I,II,III, Aggrecan
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen I,II,III, Aggrecan
<b>Gelatinasen</b>		
MMP-2	Gelatinase A	Gelatine, Kollagen I, IV,V,X, Elastin, Aggrecan, Link-Protein
MMP-9	Gelatinase B	Gelatine, Kollagen IV,V,XI, Elastin, Aggrecan, Link-Protein
<b>Stromelysine</b>		
MMP-3	Stromelysin-1, Proteoglykanase	Kollagen und nichtkollagen ECM- Proteine, Pro- MMP- 1,-8,-9,-13, E- Cadherin, L-Selektin, Inaktivierung von Protease-Inhibitoren
MMP-10	Stromelysin-2	Ähnlich wie MMP-3, schwächer aktiv
<b>Membran- MMPs</b>		
MMP-14	MT1-MMP	Kollagen I, II, III, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane
MMP-16	MT3-MMP	Pro-MMP-2
<b>Sonstige</b>		
MMP-7	Matrilysin, PUMP-1	ECM- Proteine, Pro- MMP-1, -2, und -9
MMP-12	Metalloelastase	Elastin und weitere ECM- Moleküle
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin

**Tabelle 5: Matrix-Metalloproteinasen, Übersicht, Nomenklatur und typische Substrate**

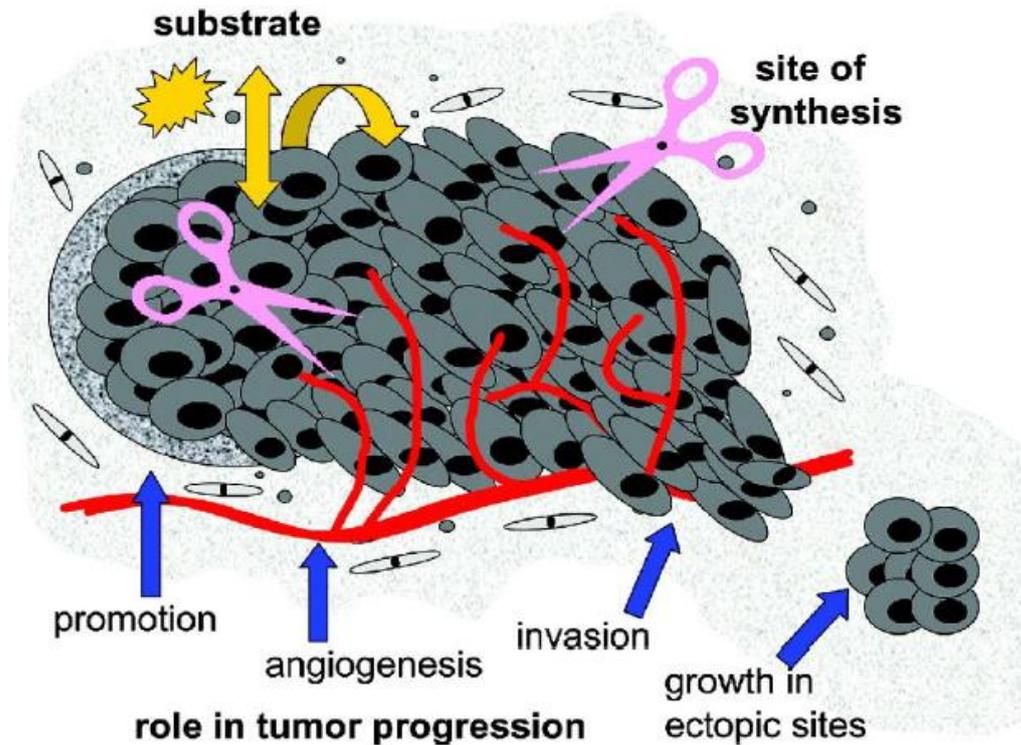
*Modifiziert nach Löffler und Petrides 2014.*

Allen MMP gemeinsam ist ein ähnlicher Aufbau aus drei Bausteinen: das Pro-Peptid, die katalytische Domäne und die Hämpexin-ähnliche C-terminale Domäne.

MMPs werden zunächst in einem enzymatisch inaktiven Zustand sezerniert, nach proteolytischer Abspaltung der Prodomäne sind diese aktiv.

Unter physiologischen Bedingungen sind MMPs am regulären Gewebeumbau beteiligt. Durch Hydrolyse spalten sie vor allem Kollagen, aber auch andere extrazelluläre Matrixmoleküle wie Laminin und Fibronectin (Visse und Nagase 2003). Außerdem spalten MMPs die nicht-extrazellulären Matrix-Moleküle, wie Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle, und sind zudem an der Aktivierung von Rezeptoren der Wachstumsfaktoren und Zytokine beteiligt (Stamenkovic et al. 2003), sodass hier auch eine Beteiligung an Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose zu sehen ist (Cawston et al. 2009; Bigg et al. 2001).

Ein kontrollierter Umbau der EZM findet z.B. im Rahmen der Wundheilung oder der Angiogenese statt (Hannas et al. 2007; Zhang et al. 2009). Jedoch lassen sich MMP auch bei pathologischen Prozessen nachweisen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (Wernicke et al. 2002) und der Arteriosklerose (Watanabe und Ikeda 2004). Im Rahmen der Karzinogenese werden MMPs als Modulatoren und Regulatoren des umgebenen Gewebes „microenvironment“ gesehen (Kessenbrock et al. 2010). Zusätzlich zu ihrer Rolle im Umsatz der EZM und der Krebszellmigration, regulieren MMP Signalwege, die das Zellwachstum, Entzündung oder Angiogenese kontrollieren (Kessenbrock et al. 2010). Bei verschiedenen Tumoren konnten MMPs vermehrt nachgewiesen werden, unter anderem auch beim KRK (Roeb und Matern 2003). Bei diesen pathologischen Prozessen korrelieren hohe MMP-Spiegel oft mit einer schlechten Prognose (Kessenbrock et al. 2010, Xue et al. 2017).



**Abbildung 4: Rolle von MMP im Tumorgewebe**

*Rolle von MMP im Tumorgewebe. Neben der Invasion sind MMP an der Tumorprogression, der Tumorzellmigration, der Angiogenese und Metastasierung beteiligt. MMP werden nicht nur von Tumorzellen selbst gebildet, sondern auch von den umgebenden Stromazellen, wie Fibroblasten. Darstellung nach Coussens et al. 2002.*

### 3.3.3 Regulation der MMP-Aktivität

Entsprechend ihrer katalytischen Aktivität sind MMPs auf mehreren Ebenen reguliert: auf der Ebene der Genexpression, der proteolytischen Proenzymaktivierung und über Wechselwirkungen mit spezifischen Inhibitoren (Visse und Nagase 2003).

Auf Transkriptionsebene wird die MMP-Expression von induzierenden und inhibierenden Faktoren reguliert. Als induzierend gelten: Wachstumsfaktoren aus Epithelzellen (EGF), Fibroblasten ( $\beta$ -FGF), Thrombozyten (PDGF) sowie Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL-1) und IL-6. Inhibierend wirken: Heparine, Retinoide und Kortikosteroide (Yan und Boyd 2007).

Ein Schlüsselpunkt in der Regulation der MMP-Aktivität ist die Konversion des Zymogens in ein aktives proteolytisches Enzym (Kessenbrock et al. 2010).

Die Aktivierung des MMP erfolgt hierbei durch verschiedene Proteinasen, wie z.B. Plasmin, Furin und andere aktivierte MMPs (Kessenbrock et al. 2010).

Spezifische Inhibitoren der MMP sind die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs). MMPs und TIMPs stehen im gesunden Gewebe in einem ständigen Gleichgewicht. Wird dieses gestört, kommt es durch ein Übermaß an MMPs zur verstärkten Degradation von EZM. Eine Dominanz der TIMPs ist hingegen mit einem Übermaß an EZM assoziiert, wie z.B. der Fibrose (Giannandrea und Parks 2014).

Derzeit sind vier verschiedene TIMPs bekannt: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 und TIMP-4. Gebildet werden sie von unterschiedlichen Zellarten, wie Osteoblasten, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen, die Regulation der TIMP-Expression erfolgt über Zytokine, Onkogene und Hormone (Vincenti 2001; Brew und Nagase 2010).

Die vier bekannten Vertreter der TIMPs können durch ihre ähnlichen strukturellen Eigenschaften unspezifisch an allen MMPs binden, zeigen jedoch zu bestimmten Reaktionspartnern eine höhere Affinität (Brew und Nagase 2010).

### **3.3.4 Synthetische Inhibitoren der MMP**

Da MMP bei einer Reihe von Erkrankungen wie Karzinomen und entzündlichen Prozessen wie Rheumatoider Arthritis oder Colitis ulcerosa überexprimiert werden (Rath et al. 2006), ist es naheliegend, MMP-Inhibitoren therapeutisch zu nutzen.

Seit der Entdeckung der MMP wurden mehr als 50 Inhibitoren entwickelt (Vandenbroucke und Libert 2014). Ziel der Inhibierung der MMP-Aktivität war das katalytische, aktive Zinkion der MMPs. Chemische Klassen, die über eine funktionelle Gruppe in der Lage sind, das Zinkion zu binden und damit zu inaktivieren, sind unter anderem Hydroxamate, Carboxylate, Thiole und Tetrazykline (Vandenbroucke und Libert 2014). Erste MMP-Inhibitoren, die im Rahmen klinischer Studien getestet wurden, waren Batimastat und Marimastat; sie gehören zur Gruppe der Hydroxamate. Im Tiermodell konnten vielversprechende Ergebnisse gezeigt werden. In klinischen Studien bestätigte sich diese jedoch nicht. So zeigten zum Beispiel Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom in der Phase II-Studie zu Marimastat keine Verlängerung des Gesamtüberlebens (Coussens et al. 2002). Die entwickelten MMP-Inhibitoren zeigten eine Reihe von Nebenwirkungen wie Arthralgien und Inflammation (Vandenbroucke und Libert 2014), sodass die Dosis reduziert wurde. Die reduzierte Dosis zeigte dann keinen adäquaten Effekt mehr auf die

Tumorbiologie (Vandenbroucke und Libert 2014). Die bisherigen Studien an MMP-Inhibitoren haben keine effektive Therapie hervorgebracht (Coussens et al. 2002, Overall und Lopez-Otin 2002; Gialeli et al. 2011).

Im Nachhinein wurde eine Reihe von Kritikpunkten an den durchgeführten Studien laut. Diese richten sich unter anderem gegen das Design sowie gegen den unzureichend definierten Endpunkt der Studie. Die getesteten MMP-Inhibitoren seien nicht ideal gewählt worden. So zeigten sie unter anderem eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und Dosis-limitierende Nebenwirkungen. Auch eine unzureichende Kenntnis über die komplexe Funktion von MMP habe zu den Ergebnissen der Studien geführt (Vandenbroucke und Libert 2014).

Durch neue Studien wurde in den letzten Jahren mehr über die Funktion von MMPs im Rahmen von pathologischen, aber auch physiologischen Prozessen in Erfahrung gebracht, sodass innovative Möglichkeiten für den Einsatz von MMP-Inhibitoren entstanden sind (Vandenbroucke und Libert 2014).

<b>Inhibitor</b>	<b>Klasse</b>	<b>Selektivität</b>	<b>Indikation</b>	<b>Studienphase</b>
Batimastat	Peptid-mimetika	Weites Spektrum	Maligner Aszites, Pleuraerguss	Abgebrochen in Studienphase III
Marimastat	Peptid-mimetika	Weites Spektrum	Mamma Ca, SCLC, NSCLC	Abgebrochen in Studienphase III
CGS 27023 A	Nieder-molekulare Verbindung (small molecule)	Weites Spektrum	Fortgeschrittene Solide Tumore	Abgebrochen in Studienphase I
Prinomastat	Nieder-molekulare Verbindung (small molecule)	Weites Spektrum	NSCLC, Glioblastoma multiforme, Prostata-carcinom	Abgebrochen in Studienphase III

Tanomastat	Nieder-molekulare Verbindung (small molecule)	MMP-2, MMP-3, MMP-9	Ovarialkarzinom, Adenokarzinom des Pankreas, NSCLC, Rheumatoide Arthritis, Organabstoßung nach Transplantation	Abgebrochen in Studienphase III
Doxyzyklin	Tetrazyklin-derivat	Weites Spektrum	Multiple Sklerose, Typ II Diabetes, Aortenaneurysma, KHK, Polyzystische Ovarien	

**Tabelle 6: Übersicht über klinisch getestete MMP-Inhibitoren**

*Modifiziert nach Cathcart et al. 2015.*

### 3.3.5 MMP und das kolorektale Karzinom

Wie bei vielen anderen Tumorarten spielen MMPs und TIMPs auch bei der Kolonkarzinominvasion und -metastasierung eine entscheidende Rolle. Invasion und Metastasierung beinhalten das Attachment von Tumorzellen an die Basalmembran, die Degradation des Bindegewebes sowie die Migration durch das Stroma. Diese Vorgänge werden durch MMPs mediiert (Egeblad und Werb 2002, Roeb und Matern 2003). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem MMP-1,-2,-7,-9 und -13 im KRK überexprimiert werden (Said et al. 2014).

MMP/TIMP	Funktion	Rolle im KRK
MMP-1	Kollagenase-1	Expression korreliert mit Invasion und Metastasierung
MMP-2	Gelatinase A	Expression korreliert mit Invasion
MMP-7	Matrilysin	Expression korreliert mit Zellproliferation, Invasion und Metastasierung
MMP-9	Gelatinase B	Expression korreliert mit Metastasierung
MMP-12	Metalloelastase	Expression korreliert mit eingeschränktem Wachstum und höherer Überlebensrate

MMP-13	Kollagenase-3	Expression korreliert mit Metastasierung und sinkender Überlebenschancen
TIMP-1	Inhibitiert die meisten MMPs	Expression korreliert mit rechtsseitigem KRK und geringerem Überleben
TIMP-2	Inhibitiert MMP-2 und MMP-9	Verringerte Expression korreliert mit Invasion und schlechter Prognose
TIMP-3	Inhibitiert MMPs und ADAMs	Verringerte Expression korreliert mit gesteigerter Invasion
TIMP-4	Inhibitiert MMP-2	Expression im Rektumkarzinom korreliert mit verlängerter Überlebenszeit

**Tabelle 7: Rolle von MMP und TIMP im KRK**

*Modifiziert nach Said et al. 2014.*

MMP-1 (interstitielle Kollagenase):

Kollagenasen degradieren interstitielles Stroma. MMP-1 ist das Hauptenzym zur Spaltung von fibrillärem Kollagen (Typ-I, -II, -III, -VII und -X) (Roeb und Matern 2003). MMP-1 konnte in Stromazellen und Karzinomzellen von KRK nachgewiesen werden (Shiozawa et al. 2000). Der immunhistochemische Nachweis von MMP-1 ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Murray et al. 1996). Des Weiteren ist die Expression von MMP-1 im KRK mit einer höheren Rate von hämatogener Metastasierung und einer schlechter Prognose assoziiert (Sunami et al. 2000; Langenskiold et al. 2013).

MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B):

MMP-2 und MMP-9 vermögen Kollagen Typ IV und Gelatine zu zerlegen (Creemers et al. 1998). Im KRK konnte eine erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 gezeigt werden. Eine erhöhte MMP-9 mRNA konnte mit einer geringeren Überlebensrate korreliert werden (Roeb et al. 2001). Die Expression von MMP-9 und MMP-2 zeigte sich beim metastasierten KRK erhöht (Matsuyama et al. 2002). MMP-2 und MMP-9 konnte in Seren von KRK-Patienten erhöht nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-2 mit einem geringeren Gesamt- und Progressionsfreien Überleben korreliert (Shi et al. 2013). Außerdem ist die verstärkte Expression von MMP-9 mit einem verkürzten krankheitsfreien Intervall und einer hohen Tendenz zur frühen Lebermetastasierung assoziiert (Li et al. 2013, Said et al. 2014) Hierbei wird deutlich, dass prognosebestimmende Faktoren wie Metastasierung und das tumorfreie Überleben mit der Expression von MMP-2- und -9 korrelieren .

### MMP-7 (Matrilysin)

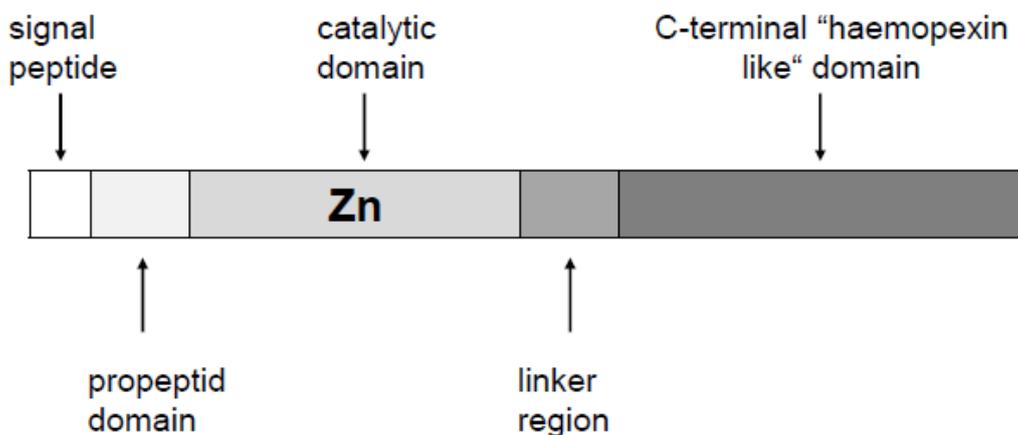
MMP-7 spaltet unter anderem Plasminogen, MMP-1, -2, -9 und Kollagen Typ-IV, die Hauptkomponente der Basalmembran. MMP-7 fördert die Tumorinvasion durch Spaltung von Proteinen der EZM und Aktivierung anderer MMP (Said et al. 2014).

Der immunhistochemische Nachweis beim fortgeschrittenen KRK von MMP-7 korreliert mit lokalen Lymphknotenmetastasen und der Fernmetastasierung (Adachi et al. 1999). Die MMP-7-Expression im KRK korreliert mit einer schlechten Überlebensrate (Masaki et al. 2001). Dies konnte im Rahmen einer weiteren Studie bestätigt werden, hier zeigte sich eine Korrelation von hohen MMP-7 Spiegeln mit der hepatischen Metastasierung und einer frühen Rückfallrate (Fang et al. 2009).

## 3.4 MMP-13

### 3.4.1 Struktur und Charakterisierung

Die Matrix Metalloproteinase 13, früher Kollagenase 3 genannt, wird vom humanen MMP-13-Gen auf Chromosom 11q22.3 kodiert (Freije et al. 1994). Wie viele andere MMPs wird MMP-13 als inaktive Pro-Form sekretiert und durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. MMP-13 besteht neben der Prodomäne aus einer katalytischen Domäne und einer hämopexinähnlichen Domäne, MMP-13-PEX.



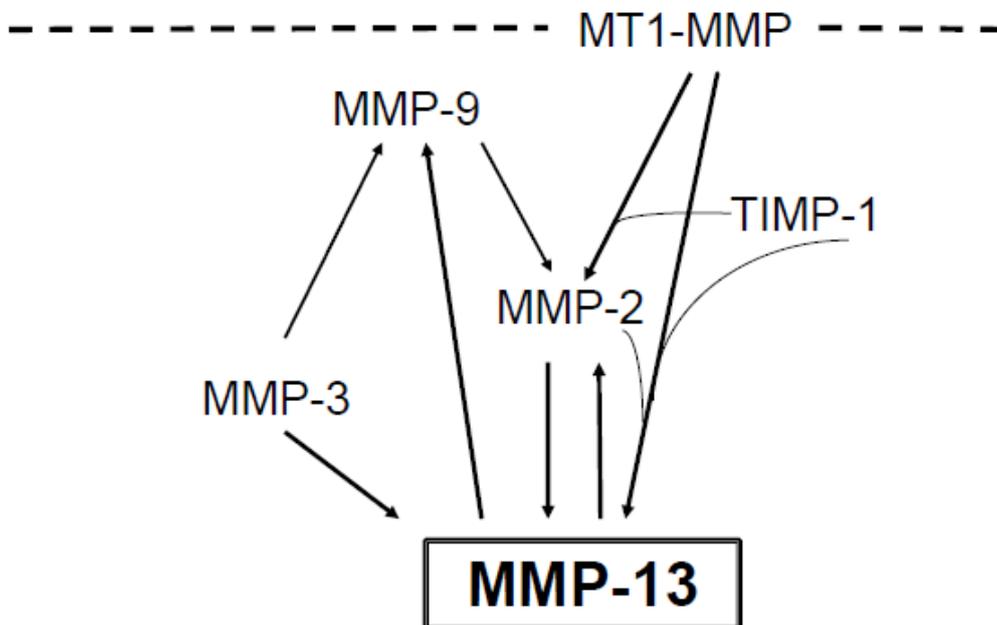
**Abbildung 5: Darstellung der Struktur von MMP-13**

*Darstellung von MMP-13. MMP-13 wird als inaktives Enzym synthetisiert und durch Abspaltung des N-terminalen Propeptids aktiviert.*

MMP-13 spaltet vor allem Kollagen, wobei Kollagen II durch MMP-13 deutlich besser gespalten wird als Kollagen I und III (Mitchell et al. 1996). Andere Substrate sind u.a. Aggrecan (Leeman et al. 2002b), Gelatine (Knauper et al. 1996) und Galectin-3 (Leeman et al. 2002b).

MMP-13 ist an das Gewebe gebunden und verwendet Heparansulfatproteoglykane als extrazelluläre Dockingmoleküle (Yu und Woessner 2000). MMP-13 wird von vielen verschiedenen Zelltypen als inaktive Pro-Form produziert, u.a. von Fibroblasten, Synoviozyten (Wernicke et al. 2002), Endothelzellen (Schmidt-Hansen et al. 2004; Hattori et al. 2003) und Kupferzellen (Hironaka et al. 2000).

MMP-13 spielt eine zentrale Rolle in der MMP-Aktivierungskaskade. Die Aktivierung des inaktiven Proenzym kann autoproteolytisch katalysiert sein oder durch andere MMPs katalysiert werden. Bei der Aktivierung von MMP-13 spielen vor allem MT1-MMP, MMP-2 und MMP-3 eine Rolle. Gehemmt wird MMP-13 durch TIMP-1, -2 und -3. MMP-13 selbst aktiviert MMP-2 und MMP-9.



**Abbildung 6: Rolle von MMP-13 im Rahmen der MMP-Aktivierungskaskade**

*Darstellung der zentralen Rolle von MMP-13 in der MMP-Aktivierungskaskade. MMP-13 wird durch MT1-MMP, MMP-2 und MMP-3 aktiviert. MMP-13 selbst aktiviert MMP-2 und MMP-9.*

Die MMP-13-Expression kann auch von Zytokinen induziert werden. Hierbei spielen vor allem Interleukin-1, -6 und der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  eine Rolle (Leeman et al. 2002b).

Während der Embryonalentwicklung wird MMP-13 im Skelett in Arealen exprimiert, in denen eine Restrukturierung und ein Abbau des Kollagens zwecks Knochenmineralisation notwendig ist. In Krankheitsprozessen wie der rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis und in humanen Karzinomen wird MMP-13 hochgradig überexprimiert. Hierbei scheint die Expression von MMP-13 mit der Tumoragektivität und der Invasivität zu korrelieren (Kudo et al. 2012; Said et al. 2014). Zuerst konnte MMP-13 im humanen Mammakarzinom nachgewiesen werden. Hierbei war zu beobachten, dass in-vitro-Mammakarzinomzellen Faktoren wie  $IL-1\alpha$  und  $IL-1\beta$  produzieren, die die umliegenden Fibroblasten induzieren, MMP-13 zu exprimieren (Uria et al. 1997).

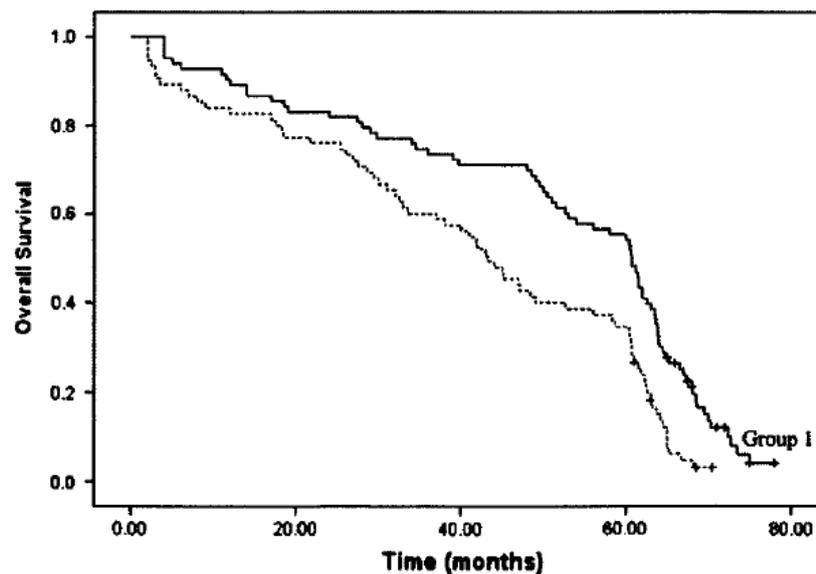
In malignen Melanomen konnte eine höhere Konzentration von MMP-13 in Tumoren mit hoher lokaler Invasion nachgewiesen werden (Leeman et al. 2002b). Uria et al zeigten, dass nur in einem Viertel gutartiger Knorpeltumore MMP-13 nachgewiesen werden konnte, wohingegen alle untersuchten Chondrosarkome MMP-13 exprimierten (Uria et al. 1998).

### **3.4.2 Rolle von MMP-13 in der kolorektalen Karzinogenese und Metastasierung**

Die Expression von MMPs spielt bei der Heilung zahlreicher Organe und Strukturen eine Rolle. Im Granulationsgewebe von Darm Anastomosen der Ratte wurde vermehrt MMP-13 beobachtet, nicht aber im Darmepithel selbst (Vaalamo et al. 1998). Während MMP-13 im normalen Darmgewebe oder bei der akuten Divertikulitis nicht zu finden war, konnte MMP-13 in entzündlich veränderten Segmenten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden (Vizoso et al. 2006). In präkanzerösen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und in adenomatösen Polypen konnten signifikant höhere MMP-13-mRNA-Spiegel detektiert werden als im umgebenden gesunden Gewebe (Rath et al. 2010). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa gelang der immunhistochemische Nachweis von MMP-13 in vWF<sup>+</sup>-Endothelzellen und Leukozyten, wohingegen nicht entzündete Mukosa keine MMP-13-Expression zeigte (Rath et al. 2010; Rath et al. 2011). Hiernach ist ein Zusammenhang zwischen chronischer Entzündungsaktivität und MMP-13-Expression wahrscheinlich (Rath et al. 2010).

Weiterhin spielt MMP-13 eine wichtige Rolle bei der Tumorinvasivität und dem Outcome KRKs. MMP-13 konnte immunhistochemisch im Zytoplasma von KRK

nachgewiesen werden und eine starke MMP-13-Färbung korrelierte mit einer schlechten Überlebensrate (Leeman et al. 2002a). Es wurde gezeigt, dass eine MMP-13-Expression mit schlechter histologischer Differenzierung, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen korreliert (Yang et al. 2012).



**Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve von MMP-13-positiven KRK**

*Kaplan-Meier-Kurve der MMP-13-positiven (Group 2) im Vergleich zu MMP-13-negativen (Group 1) Patienten. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen (Log-Rank Test = 12, 452,  $p < 0,001$ . Darstellung nach Yang et al. 2012.*

Darüber hinaus war die MMP-13-Konzentration in Tumorgewebe mit hepatischen Metastasen höher als in Tumoren ohne Metastasierung (Yamada et al. 2010). Hieraus schlossen die Autoren, dass MMP-13 als Prädiktor der Lebermetastasierung bei KRKs angesehen werden kann.

MMP-13, das hauptsächlich auf der Tumoroberfläche exprimiert wird, könnte somit als Marker für die kolorektale Karzinogenese in Frage kommen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte und Materialien

#### 4.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Eismaschine	Fa. Manitowoc, New Port Richey/USA
Elektrophorese-Kammer Multigel	Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland
Feinwaage Sartorius A200S	Fa. Sartorius, Göttingen/Deutschland
Gefrierschrank -20°C GN 2856	Fa. Liebherr, Bulle/Schweiz
Gefrierschrank -80°C MDF-U60865	Fa. Sanyo, Moriguchi/Japan
Heizplatte H1220	Fa. Leica, Wetzlar/ Deutschland
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke, Staufen/Deutschland
Mikroskop DMIL	Fa. Leica, Wetzlar/Deutschland
Mikrotom RM 2165	Fa. Leica, Wetzlar/Deutschland
Mikrowelle 900	Fa. Severin, Sundern/Deutschland
Mini-Zentrifuge Rotilabo	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Multipette	Fa. Eppendorf, Hamburg/ Deutschland
pH-Meter 632	Fa. Metrohm, Zofingen/Schweiz
Photometer	Fa. Thermo Fischer Scientific, Waltham/USA
Pipetten Typ Research	Fa. Eppendorf, Hamburg/ Deutschland
Reinstwasseranlage Milli-Q-Biocel und Elix 3	Fa. Merck Millipore, Darmstadt/ Deutschland
Rüttler Vibrax VXR	Fa. IKA, Staufen/Deutschland
Semi-Dry-Fastblot B34	Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland
Thermomixer Typ Comfort 5436	Fa. Eppendorf, Hamburg/ Deutschland
Vortexer VF-2	Fa. IKA, Staufen/Deutschland
Waage FA-1500-2	Fa. Faust, Schaffhausen/Schweiz
Zentrifuge	Hetterich Zentrifuge, Tuttlingen/ Deutschland

**Tabelle 8:      Verwendete Geräte**

#### 4.1.2 Verbrauchsgegenstände

<i>Verbrauchsgegenstand</i>	<i>Hersteller</i>
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen/ Deutschland
Entwicklungsfilm Hyperfilm Amersham ECL	Fa. GE Healthcare, Buckinghamshire/ UK
Eppendorf Cups (0,5ml; 1,5ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Filmkassette	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Gel blotting paper, GB 003	Fa. Whatman, Buckinghamshire/UK #10426892
Handschuhe NitraTex	Fa. Ansell, Brüssel/Belgien
Handschuhe Peha Soft, puderfrei	Fa. Hartmann, Neudorf/Österreich
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen/ Deutschland
Page Ruler™ Plus, Prestained Protein	Fa. Thermo Scientific, Dreieich/ Deutschland
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland
Pipettenspitzen für Multipette	Fa. Ritter, Schwabmünchen/ Deutschland
PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran	Fa. Merck Millipore, Darmstadt/Deutschland
Reaktionsgefäße Falcon (15ml, 50ml)	Fa. Greiner, Essen/Deutschland
Reaktionsgefäße Safe Seal	Fa. Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland
Whatmann Papiere	Fa. Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland

**Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsgegenstände**

#### 4.1.3 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Amidoschwarz-Pulver 10 B	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3- Indolylphosphat)	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. PAA, Pasching/Österreich
Coumaric Acid	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim/Deutschland, C9008-10G
Curix 60	Fa. AGFA Health Care, Greenville/USA
Dodecylsulfate-Na-Salt, >99,9 %	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland
ECL Detection Reagent	Fa. Amersham Biosciences, Freiburg/Deutschland
Eisessig 100 %	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
Essigsäure	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland

## Material und Methoden

Ethanol 99,6 %	Berkel AHK, Ludwigshafen/ Deutschland
Ethanol 96 %	Fischer, Saarbrücken/Deutschland
Ethanol 70 %	Sigma Aldrich, Steinheim/ Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1 %	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
ε-Aminocaprinsäure	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland, #130512
HCL	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim/ Deutschland #84422-12
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim/Deutschland
KCl	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland #6781.3
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland P030.1
Luminol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim/ Deutschland # A8511-5G
Mercaptoethanol	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Methanol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim/ Deutschland #STBF2109V
Methylgrün	Vector Methyl Green, Vector Laboratories, Burlingame/USA #H-3402
Milchpulver, fettarm	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Multigel	Fa. Biometra, Göttingen/Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland #3904.2
NaCl	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim/ Deutschland #31434
Natriumacetat	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %	Fa. B. Braun, Melsungen/ Deutschland
NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Pertex Eindeckmedium	Fa. Medite, Bergdorf/Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 37,5:1	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland, # A3029.1
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland
Trichloressigsäure 100 %	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland #1.06448.1000
Tris Base	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Tris HCL	Fa. Roth, Karlsruhe/Deutschland
Tween 20	Fa. Serva, Heidelberg/Deutschland

Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland #1.07210.1000
Xylol	VWR, Darmstadt/Deutschland
Zitronensäure	Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland #1002440500

**Tabelle 10:    Verwendete Chemikalien**

#### 4.1.4    Kommerzielle Kits

<i>Kommerzielle Kits</i>	
Serumkit: 2,5 % normal horse-serum	Vector Laboratories, Burlingame/USA #S-2012
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame/USA #SK-4100
VIP Substrate Kit for Peroxidase	Vector Laboratories, Burlingame/USA #Sk-4600
Qproteome FFPE	Tissue Kit, Qiagen, Hilden/Deutschland

**Tabelle 11:    Kommerzielle Kits**

#### 4.1.5    Verwendete Antikörper

<i>Primär- und Sekundärantikörper</i>	
<i>Primärantikörper IHC</i>	
Goat anti MMP-13 polyclonal IgG	R&D Systems, Minneapolis/USA # AF511
Rabbit anti CD 3 polyglonal IgG	Abcam, Cambridge/UK # ab16044
Goat anti CD 20 polyclonal IgG	Santa Cruz, Dallas/USA # sc-7735
Rabbit anti CD 54 (ICAM-1) polyclonal IgG	Cell Signaling, Cambridge/UK # 4915
Rabbit anti CK 20 polyclonal IgG	Protein tech, Chicago/USA # 17329-1-AP
Rabbit anti vWF polyclonal IgG	Dako, Hamburg/Deutschland # A 0082
Rabbit anti CD14 polyclonal IgG	Santa Cruz, Dallas/USA # sc-9150
Mouse anti Alpha-SMA monoclonal IgG	Progen, Heidelberg/Deutschland # 61001
Mouse anti CD 68 purified IgG	Bio Legend, San Diego/USA #137001
Mouse anti Vimentin Ab-2 monoclonal IgG	Thermo Scientific, Fremont/USA # MS-129-PO
<i>Sekundärantikörper IHC</i>	
Impress Reagent Kit Anti-Goat-Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame/USA #MP-7405
Impress Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame/USA #MP-7401
Impress Reagent Kt Anti-Mouse Ig Vector	Vector Laboratories, Burlingame/USA #MP-7402

*Primärantikörper Western Blot*

Rabbit anti MMP-13 polyclonal Ig	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland # sc-30073
Mouse anti- $\beta$ -Actin monoclonal Ig	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland # sc-47778
Rabbit anti- $\alpha$ -Tubulin polyclonal Ig	Cell Signaling, Cambridge/UK #2144

*Sekundärantikörper Western Blo*

Goat anti rabbit IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg/ Deutschland #sc 2054
Goat anti rabbit IgG AP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg/ Deutschland #sc 2057
Goat anti mouse IgG AP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg/ Deutschland #sc 2008
donkey anti goat HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg/ Deutschland #sc 2056

**Tabelle 12: Verwendete Antikörper**

## 4.2 Patientenkollektiv

Die Adenom- und Karzinomproben wurden nach routinemäßig durchgeführten koloskopischen Untersuchungen mit Polypektomie oder Operationen an kolorektalen Karzinomen durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums in Gießen rekrutiert. Das Biopsiematerial wurde routinemäßig fixiert und in Bezug auf hyperplastische Anteile, low-grade oder high-grade Dysplasien histopathologisch untersucht. Parallel zu diesen Routinefärbungen und Routinebefunden wurde eine zusätzliche immunhistochemische Färbung mit MMP-13-Antikörpern durchgeführt und semiquantitativ ausgewertet.

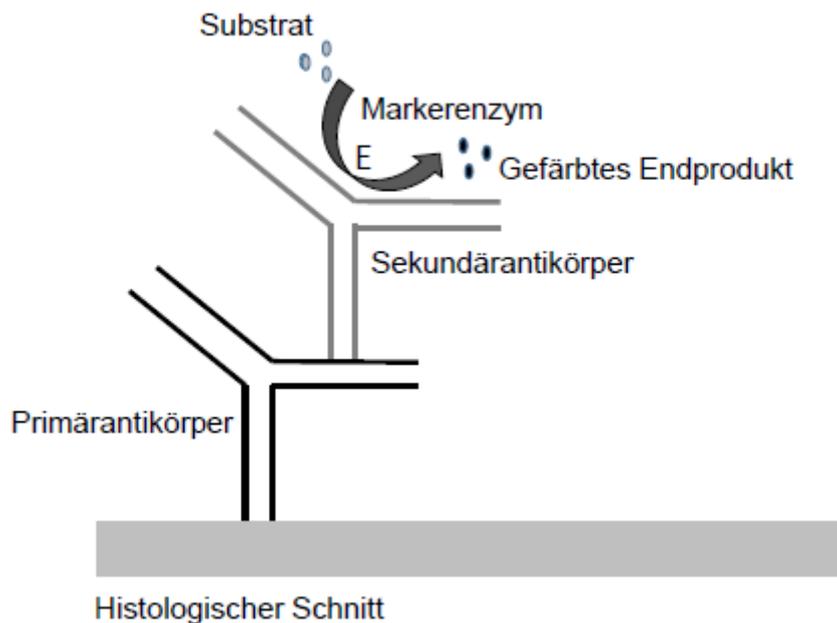
## 4.3 Immunhistochemische Färbung

### 4.3.1 Prinzip

Die Immunhistochemie dient der Detektion und der topographischen Zuordnung von Proteinen in einem Gewebe. Hierzu dienen Primärantikörper, die ein bestimmtes Epitop des Proteins erkennen.

Diese Primärantikörper werden aus Tieren gewonnen, die vorher mit dem gesuchten Antigen geimpft wurden und daraufhin durch B-Zell-Aktivierung Antikörper bilden. In unserer Studie wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das humane MMP-13 aus der Ziege verwendet.

Diese Primärantikörper binden spezifisch an das Epitop und müssen, bei der hier verwendeten Zwei-Schritt-Methode, durch Sekundärantikörper detektiert werden. Die Sekundärantikörper sind spezifisch gegen die Tierspezies gerichtet und mit einem Markerenzym ausgestattet. Das Markerenzym kann mit verschiedenen Färbemethoden nachgewiesen werden.



**Abbildung 8: Prinzip der Immunhistochemischen Färbung**

*Im ersten Schritt werden spezifische Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt werden Antikörper aufgetragen, die sich gegen die ersten Antikörper richten. Der sogenannte Sekundärantikörper, ist mit einem Enzym gekoppelt und löst die Farbentstehung mit einer Enzym-Substrat-Reaktion aus.*

#### 4.3.2 Durchführung

Das Biopsiematerial aus dem humanen Kolon wurde routinemäßig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die Gewebeblöcke in 3 µm dünne Schnitte geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden durch Inkubation in Xylol (2 x 10 min) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2 x 5 Minuten in 99,6 % Ethanol, 5 Minuten in 96 % Ethanol und als letztes 2 Minuten in 70 % Ethanol). Zum Abschluss wurden die Schnitte 5 Minuten mit kaltem Wasser gespült.

Um die durch Fixation bedingte Vernetzung der Epitope zu demaskieren, wurden die Schnitte 5 x 2 Minuten in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 730 Watt gekocht.

Nach dem Abkühlen der Schnitte für 30 min in Citratpuffer bei Raumtemperatur wurden sie mit PBS Puffer gespült.

Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte 15 Minuten in 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert und anschließend gespült. Des Weiteren wurden unspezifische Bindungen mit 2,5%igem normal horse Serum geblockt. Dieses enthält Antikörper und Serumprotein, die an (unspezifische) Antigene binden, die nicht nachgewiesen werden sollen.

Danach wurden die Primärantikörper Goat anti human-MMP 13 (R&D) auf die Schnitte pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Primärantikörper von den Schnitten mit PBS abgespült und die Sekundärantikörper Anti Goat IgG aufgebracht. Diese sind mit einer Peroxidase gekoppelt. Nach 30-minütiger Inkubation in der feuchten Kammer werden die Sekundärantikörper mit PBS abgespült und das Präparat unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Hierzu dient das VIP Substrate Kit for Peroxidase. Mit VIP stellt sich die MMP-13-Färbung violett dar. Die Entwicklung erfolgte unter Sichtkontrolle am Mikroskop und in einer Zeit von 7-10 Minuten. Anschließend wurde 5 min lang mit fließendem Wasser die Reaktion gestoppt und eine Kernfärbung mit Methylgrün für 60 Sekunden auf einer 60 °C heißen Heizplatte angeschlossen. Nach einminütigem Spülen mit Aqua dest. wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (5 min 96% Ethanol, 2 x 5 min Isopropanol, 3 x 5 min Xylol) erneut dehydriert. Nach dem Eindecken mit Pertex und Deckplättchen wurden die Objektträger getrocknet.

### **4.3.3 Doppelfärbungen**

Die Doppelfärbung dient der Darstellung von zwei Antigenen auf einem Schnitt. Zellen, die beide Antigene exprimieren, werden in einer Mischfarbe dargestellt (Chen et al. 2010). Diese Methode wurde angewandt, um zu zeigen, welche Zellen MMP-13 exprimieren.

Zunächst wurde die schon beschriebene MMP-13-Färbung durchgeführt. Nach der Entwicklung mit dem Vector VIP Substrate Kit wurden die Schnitte 4 x 5 Minuten mit PBS Puffer gespült und anschließend ein zweiter Primärantikörper auf die Schnitte pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Primärantikörper von den Schnitten mit PBS abgespült und dann der entsprechende Sekundärantikörper aufgebracht. Dieser ist mit einer Peroxidase gekoppelt. Nach 30-minütiger Inkubation in der feuchten Kammer wird der

Sekundärantikörper mit PBS abgespült und das Präparat unter Mikroskopkontrolle entwickelt. Hierzu dient das DAB (3,3'-diaminobenzidine) Substrate for Peroxidase.

Der zweite Primärantikörper stellt sich mit DAB braun dar. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte anschließend 5 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Anschließend wurde auch hier eine Gegenfärbung mit Methylgrün wie oben beschrieben durchgeführt. Es erfolgte eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindecken der Schnitte.

#### **Verwendete Lösungen:**

##### *PBS (Phosphat buffered saline)*

PBS (10x): 80 g NaCl + 2 g KCl + 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,45 g KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden in 900 ml Aqua dest. gelöst und anschließend bis auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

PBS (1x): 100 ml der PBS-Stammlösung (10x) wurden in 900 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend Titration mit HCl bis pH 7,4

##### *Citratpuffer Ansatz:*

Stammlösung A: 21,01g 0,1 M Zitronensäure (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. pH 2,1

Stammlösung B: 29,41 g 0,1M Trinatriumcitrat-Dihydrat (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>9</sub>) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. pH 8,4

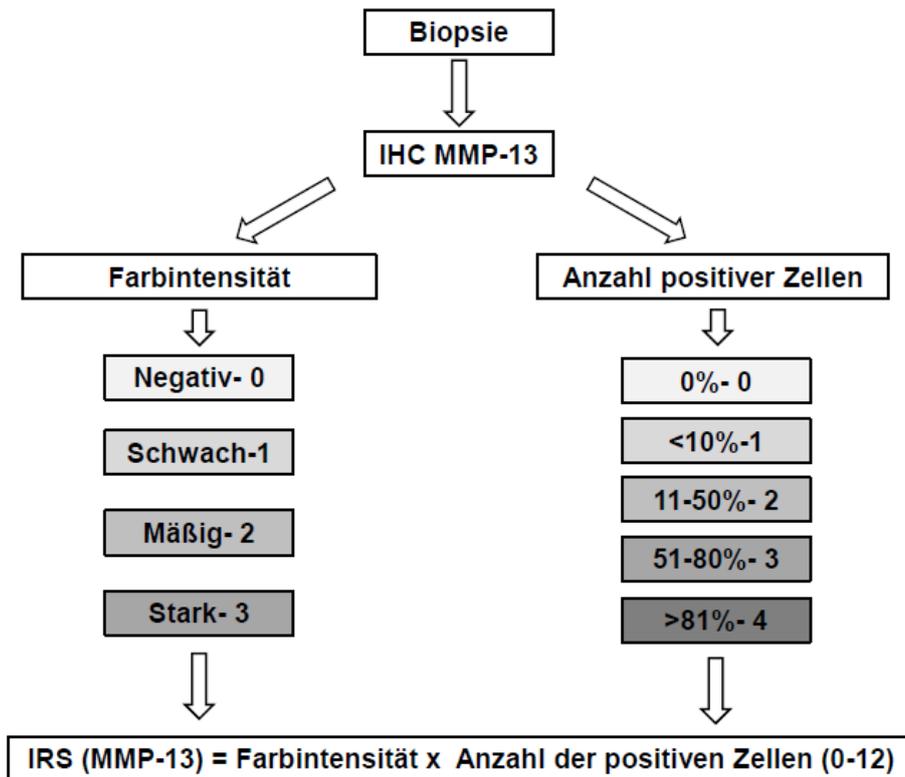
Gebrauchslösung: 9 ml Puffer A + 41 ml Puffer B mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. pH 6,0

**Tabelle 13: Lösungen IHC**

#### **4.3.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbung**

Die Auswertung der gefärbten Proben erfolgte mit dem Immunreaktiven Score modifiziert nach Remmele und Stegner. Dieser wurde ursprünglich entwickelt, um Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Mammakarzinomen zu quantifizieren (Remmele und Stegner 1987).

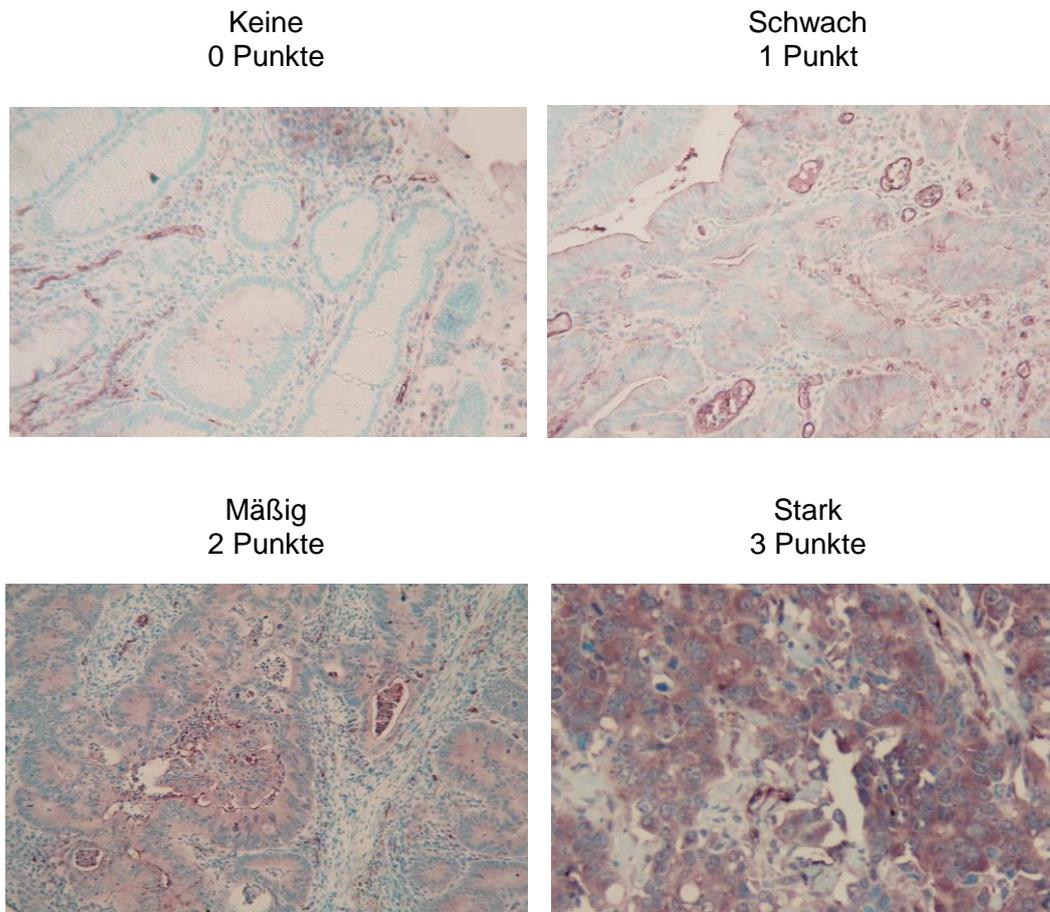
Beim Immunreaktiven Score werden die Anzahl der positiv gefärbten Zellen mit der Färbeintensität multipliziert. Für die Anzahl der positiv gefärbten Zellen können Werte von 0-4 erreicht werden, für die Färbeintensität Werte zwischen 0-3, sodass ein minimaler Score von 0 und ein maximaler Score von 12 erreicht werden kann.



**Abbildung 9: IRS(Immunreaktiver Score) entspricht Anzahl der positiven Zellen x Farbintensität**

Die Auswertung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung am Mikroskop. Die MMP-13 positiv bewerteten Zellen wurden gezählt und in die entsprechende Kategorie (0%, <10%, 11-50%, 51-80%, 81-100%) eingeordnet. Die Auswertung umfasste nur entsprechend dem Dysplasiegrad gefärbtes Darmepithel, positiv gefärbte Zellen des Bindegewebes wurde nicht miterfasst.

Die Färbintensität wurde ebenfalls am Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung beurteilt; hierzu wurden vorher Referenzaufnahmen erstellt:



**Abbildung 10: Referenzaufnahmen Farbintensität**

#### **4.4 Proteinextraktion**

Zur Evaluierung der Ergebnisse des Immunreaktiven Scores (IRS) wurden aus 8 exemplarischen Paraffinblöcken Proteine extrahiert. So konnte die MMP-13-Menge mit einer zweiten Methode validiert werden. Dabei wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und anschließend die Proteine extrahiert.

Hierzu wurden je drei Serienschritte mit einer Dicke von 10 µm von dem jeweiligen Paraffinblock geschnitten und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gesammelt. Um die Schnitte zu entparaffinieren wurde in die Eppendorfgefäße je 1 ml Xylol pipettiert, für 10 Sekunden mit Hilfe des Vortexer gemischt und anschließend 10 min inkubiert. Danach wurde das Eppendorfgefäß für 2 Minuten zentrifugiert und der entstehende Überstand vorsichtig verworfen. Das Entparaffinieren mit Xylol wurde einmal wiederholt, anschließend erfolgten diese

Arbeitsschritte weitere zwei Mal mit 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol.

Zur Proteinextraktion wurde das jeweilige Eppendorfgefäß, das das entparaffinierte Gewebe enthielt, folgenden Arbeitsschritten unterzogen:

- Es wurden je 94 µl Extraction Buffer EXB Plus und 6 µl β-Mercaptoethanol zupipettiert und anschließend mit dem Vortexer gemischt.
- Die Eppendorfgefäße wurden für die weiteren Schritte mittels einer Kappe fest verschlossen. Im Anschluss wurden die Eppendorfgefäße mit den enthaltenen Schnitten und dem Puffer für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Inhalt mit dem Vortexer erneut vermischt.
- Daraufhin wurden die Schnitte in den Eppendorfgefäßen für 20 Minuten auf einer 100 °C heißen Heizplatte und anschließend für 2 Stunden auf dem Thermomixer bei 80 °C und 750 U/min. inkubiert.
- Nach der Inkubation wurden die Eppendorfgefäße für 1 Minute im 4°C kalten Kühlschrank gekühlt und die Verschlusskappen entfernt.
- Im letzten Schritt wurden die Eppendorfgefäße mit den gelösten Proteinen für 15 Minuten bei 14,000 g bei 4°C zentrifugiert. Der entstehende Überstand enthielt die gelösten Proteine, so dass dieser in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt wurde.

### **4.5 Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz**

Zur Quantifizierung der extrahierten Proteinmenge wurde die Methode der Amidoschwarz-Bestimmung angewandt (Schaffner und Weissmann 1973).

Hierzu wurde 25 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA) in Lämmli-Puffer (einfach) gelöst und jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt, sodass 6 Standardwerte entstanden. Folgende Schritte wurden durchlaufen:

- Pro Probe und Standardwert wurde 1 µ auf ein Stück Celluloseacetat-Folie pipettiert und getrocknet.
- Die getrocknete Folie wurde im Anschluss für 10 min in der Amidoschwarz-Lösung gefärbt, dann mit 45% Methanol und 45% Eisessig entfärbt bis sich der Hintergrund fast weiß darstellte. Die Folie wurde nun wieder getrocknet. Die gefärbten Spots wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

- Zu den Proben wurden jeweils 400 µl Cellulose-Acetat-Auflöser pipettiert und solange mittels Vortexer durchmischt bis sich die Folie komplett aufgelöst hatte.
- Anschließend wurden je 200 µl je Probe und Standard in eine 96 Wellplatte überführt. Die Extinktion wurde bei 620 nm im Photometer gemessen und über die Eichgerade die Proteinkonzentration berechnet.
- 

### **Verwendete Lösungen:**

#### *Lämmli-Puffer*

Lämmli-Puffer (4x):	40 % Glycin 20 % Mercaptoethanol 8 % SDS 0,25 M Tris HCl pH 6,8 0,02 % Bromphenolblau
Lämmli-Puffer (1x):	2 mL Lämmli-Puffer (4x) 6 mL Aqua dest.

Amidoschwarzlösung	0,25 % Amidoschwarz-Pulver + 45 % MeOH + 45 % Aqua.dest. + 10 % Eisessig
--------------------	--

Amidoschwarz-Entfärbelösung	45 % MeOH + 45 % aqua dest + 10 % Eisessig
-----------------------------	--

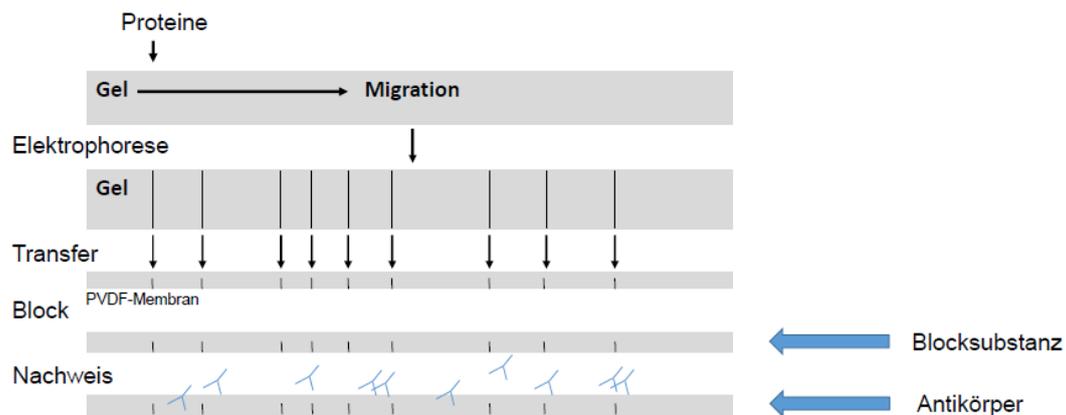
Cellulose Acetat-Lösung	80 ml Ameisensäure + 10 ml Eisessig + 1 ml TCA
-------------------------	--

**Tabelle 14: Verwendete Lösungen zur Proteinbestimmung**

## **4.6 Western Blot**

### **4.6.1 Prinzip**

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch (Schrödel 2010). Im ersten Schritt wird das Proteingemisch mittels einer Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix (SDS-PAGE) entsprechend der Proteingröße aufgetrennt in einzelne Proteinbanden. Die getrennten Proteinbanden werden danach für den Western Blot aus dem Gel auf eine feste Trägermembran (Polyvinylidene Fluoride Transfer Membrane) transferiert. Dieser Vorgang wird Blotting genannt. Aufgrund von Ladungswechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften und sind für die Antikörper-Bindung zur Detektion zugänglich (Löffler und Petrides 2014).



**Abbildung 11: Prinzip Western Blot**

*Darstellung modifiziert nach Mahmood und Yang 2012*

Die Proteine wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit auf einem Polyacrylamid-Gel, im Anschluss werden diese auf PVDF-Membran übertragen. Die Proteinbanden sind nun fest auf der Membran gebunden und können mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen werden. Damit ein Ergebnis zustande kommt, müssen vorher die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen blockiert werden, die nicht von Antikörpern erkannt werden können. Anschließend werden zwei verschiedene Antikörper auf die Membran gegeben. Die Primärantikörper binden zunächst an das gesuchte Protein. Nach dem Entfernen unspezifisch bindender Antikörper durch Waschen wird die Membran mit einem Sekundärantikörper behandelt. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist z.B. an ein Enzym gekoppelt, welches eine Farbreaktion katalysiert.

### 4.6.2 Proteinseparation durch SDS-PAGE

Aufgrund ihrer Ladungen wandern Proteine im elektrischen Feld. Ihre Wanderung wird dabei durch ihre Nettoladung, Größe und Gestalt bestimmt.

Zur Molekülmassenbestimmung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Als Träger diente ein vernetztes Polyacrylamidgel.

Zuerst wurden die Gummidichtung und dann die Ohrenplatte auf eine Glasplatte mit Abstandhalter gelegt; beides wurde mit 4 Klammern befestigt und aufgestellt. Das untere Gel (Trenngel) wurde zuerst gegossen. Dieses dient der Auftrennung der Proteine. Die Lösung für das Trenngel wurde bis 2 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatten der Laufkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgeschüttet und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Durch Einbringen eines Kammes wurden im Sammelgel Auftragesaschen für die Proben ausgespart. Das Sammelgel dient der Konzentration der Proteine. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gummidichtung und die Befestigungsklammer gelöst

und die Glasplatten mit Gel wurden in die Elektrophoresekammer eingebaut. Der Laufpuffer wurde in die Kammer gefüllt und die Proteine aufgetragen. Die einzelnen Geltaschen wurden mit 10-30 µl Gesamtvolumen beladen. Von den Gewebeproben wurden 5-15 µl Gesamtprotein aufgetragen, welches mit 5-15 µl Lämmli-Puffer mit Mercaptoethanol versetzt wurde.

Die Proteine wurden in einer wässrigen Lösung aufgenommen, die ein negativ geladenes Detergens enthielt: Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate oder SDS). Dieses stark negativ geladene Detergens bindet mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Bereiche des Proteins, wodurch das Molekül entfaltet und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben werden. Im Durchschnitt wurde 1 SDS-Molekül pro 1,5-2 Peptidbindungen gebunden, sodass die Ladungsdichte für alle Proteine gleich war (Löffler und Petrides 2014). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 130 V und 75 mA, mit einer Laufzeit von ca. 60 Minuten. Die Elektrophorese wurde über den Zeitraum durchgeführt, den die Lauffront benötigt, um vollständig durch das Gel zu wandern. Bei der Elektrophorese wanderten die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Polyacrylamid-Plattengel in Richtung der positiven Elektrode. Da kleine Proteine schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels gelangten, wurden die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Nach Ende des Laufs wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgelöst und verworfen.

### **Verwendete Lösungen:**

4x Trenngel-Puffer (500ml)	115 mL Aqua dest. 375 mL 2 M Tris pH 8,8 (= 1,5 M) 10 mL 20 % SDS (= 0,4 %)
Trenngel (10 %)	6,66 mL Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1 5 mL Trenngel-Puffer 200 µL APS 10 % 20 µL TEMED Auf 20 mL mit Aqua dest. auffüllen
4x Sammelgel-Puffer (500 ml)	365 mL Aqua dest. 125 mL 2 M Tris pH 6,8 (= 0,5 M) 10 mL 20 % SDS (= 0,4 %)
Sammelgel (6,6 ml)	0,66 mL Rotiphorese® Gel 30 37, 5:1 1,66 mL Sammelgel-Puffer 3,6 mL Aqua dest. 80 µL APS 10 % 8 µL TEMED

Tris-Glycin	10 g SDS
Laufpuffer (10x)	30 g Tris
	144 g Glycin
	auf 1000 mL Aqua dest. auffüllen

**Tabelle 15: Verwendete Lösungen Proteinseparation**

#### 4.6.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Die durch Elektrophorese separierten Proteine wurden von dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert (Blotting). Dieses Übertragungsverfahren beschreibt den eigentlichen Western-Blot. Auch hier wandern die Proteine von der Kathode zur Anode und dementsprechend von dem Gel auf die Membran. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für eine Minute in Methanol getränkt. Anschließend erfolgte die Spülung in Wasser sowie die 2-minütige Äquilibrierung in Anodenpuffer II. Währenddessen wurden zwei Whatman-Papiere kurz in Anodenpuffer I und ein Whatman-Papier in Anodenpuffer II getränkt. Weitere drei Whatman-Papiere wurden in Kathodenpuffer getränkt. Anschließend wurde der Blot luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Nitrozellulose zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet waren. Der Transfer von einem Gel wurde in der Blotkammer (Fastblot B44, Fa. Biometra) bei einer Stromstärke von 72 mA durchgeführt. Die Dauer des Blottens belief sich auf eine Stunde. Durch das senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtete elektrische Feld wanderten die Proteine in Richtung der Anode und somit Richtung Nitrozellulosemembran. Bei dem Transfer bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

#### **Verwendete Lösungen:**

Anode 1 Solution (500 mL)	75 mL 2 M Tris base (= 0,3 M) 100 mL Methanol (= 20 %) pH 10,4
Anode 2 Solution (500 mL)	6,25 mL 2 M Tris base (= 25 mM) 100 mL Methanol (= 20 %) pH 10,4
Kathode Solution (500 mL)	2,6 Aminocaproic acid (= 40 mM) 100 mL Methanol (= 20 %) 250 µL 20 % SDS pH 7,6

**Tabelle 16: Verwendete Lösungen Proteintransfer**

### 4.6.4 Proteindetektion

Das Prinzip der indirekten Proteindetektion beruht auf einem Primärantikörper, der durch einen markierten Sekundärantikörper erkannt wird. Diese Sekundärantikörper sind entweder mit den Enzymen HRP (horse radish peroxidase) oder AP (alkalische Phosphatase) gekoppelt. Nach dem Blocken der PVDF-Membran erfolgte die Dekoration mit den Antikörpern. Hierzu wurde die Membran bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert. Ein dreimaliger Waschvorgang à 10, 5 und 5 Minuten mit TBS/T-Waschpuffer folgte. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper. Dieser Schritt fand bei Raumtemperatur auf dem Schüttler statt. Danach wurde die Membran erneut mit TBS/T gewaschen (1 x 15 Minuten, gefolgt von 3 x 5 Minuten). Zuletzt erfolgte die Detektion mittels der hergestellten ECL (Enhanced Chemiluminescence-Lösung) bei Verwendung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Membran wurde hierzu eine Minute lang mit der ECL-Lösung inkubiert und anschließend in eine mit Plastikfolie ausgekleidete Filmkassette überführt. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer Dunkelkammer mittels Entwicklermaschine. In Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins wurde der Film auf der Membran unterschiedlich lange exponiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung mittels ECL-Entwicklung basiert auf der Anregung der HRP durch ein in der Detektionslösung erhaltenes Starterreagenz. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wird durch Umsetzung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Oxidation zu Luminol hervorgerufen. Das bei der Reaktion emittierte Licht belichtet einen Röntgenfilm.

Das Sichtbarmachen der Banden mit AP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte durch Inkubation mit einer AP-Lösung. Diese AP-Lösung beinhaltet BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz). Hierbei wird BCIP durch enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe (katalysiert durch die alkalische Phosphatase) in Indoxyl überführt (Gallagher et al. 2011). Folglich tautomerisiert Indoxyl zu einem Keton, das in basischem Milieu (durch den AP-Inkubationspuffer bewerkstelligt) dimerisiert und unter Abspaltung von Protonen eine blaue Farbe entwickelt. Das freigesetzte  $H^+$  reduziert schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum purpurnen Diformazan. In der Folge werden die Banden durch Ausfällung dieser beiden Farbstoffe an den Antikörper-gebundenen Stellen sichtbar (Gallagher et al. 2011).

<b>Verwendete Lösungen:</b>	
TBS (10x) pH 7,5	200 mM Tris pH 7,5 1,37 M NaCl Auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
TBS-Tween	200 mL 10x TBS pH 7,5 Auf 2 L mit Aqua dest. auffüllen 2 mL Tween 20
ECL-Lösung	10 mL Aqua dest. 0,5 mL 2 M Tris pH 8,5 2,6 µL 30 % Wasserstoffperoxid 50 µL 250 mM Luminol 25 µL 90 mM Coumeric acid
AP-Inkubationspuffer (500 ml)	10 mL aus 5 mM NaCl 2,5 mL 1 M MgCl <sub>2</sub> 50 mL 1 M Tris pH 9,5 Auf 500 mL mit Aqua dest. auffüllen
AP-Lösung	NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) 66µL + BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) 33 µL + 10 mL AP-Inkubationspuffer

**Tabelle 17: Verwendete Lösungen zur Proteindetektion**

#### 4.6.5 Stripping

Um eine bereits mit Antikörpern benetzte Membran erneut für andere Proteinanalysen verwenden zu können, gibt es die Möglichkeit, schon gebundene Antikörper von der Membran zu waschen. Beim Stripping werden sowohl Primär- und Sekundärantikörper als auch die zum Blocken verwendeten Milcheiweiße von der Membran entfernt. Dazu ist die erneute Inkubation mit Blocking-Puffer nötig. Stripping wendet man beispielsweise bei der Proteindetektion der entsprechenden Ladekontrolle an. In der vorliegenden Arbeit wurden  $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle verwendet. Zur Durchführung dieser Methode wurde die Membran drei Mal à 10 Minuten in TBS/T-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in Stripping-Puffer auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte erneut ein dreimaliger Waschvorgang mit TBS/T zu je 5 Minuten.

**Verwendete Lösungen:**

Stripping Puffer: 15 g Glyzin,  
1 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfate),  
auf ca. 950 ml mit Aqua dest. auffüllen,  
pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 2,2 einstellen,  
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

**Tabelle 18: Verwendete Lösungen für den Strippingpuffer**

#### **4.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und deren graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und R Version 3.1.3.

Die statistische Auswertung des IRS zwischen den 4 Gruppen (gesund, low-grade, high-grade und Carcinom) erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (Hedderich und Sachs 2015). Dieser testet, ob der Median des IRS in allen vier Gruppen gleich ist. Ein paarweiser Vergleich des IRS wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test und der Bonferroni-Holm-Korrektur für mehrere Tests durchgeführt. Eine Signifikanz wurde festgelegt auf  $p \leq 0,05$ .

Die Aussagekraft des IRS wurde mittels receiver operating characteristic (ROC) überprüft. Das Konfidenzintervall für die Fläche unter der Kurve (AUC) wurde mittels DeLong-Verfahren berechnet (Hedderich und Sachs 2015). Die Diskriminierungsschwelle für diagnostische Zwecke wurde mit Hilfe des Youdenindex bestimmt (Hedderich und Sachs 2015).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Patientenkohorte

105 Patienten mit histologisch gesicherten kolorektalen Adenomen und KRK wurden in die Studie aufgenommen. Insgesamt konnten von den 105 Patienten 137 Patientenproben ausgewertet werden.

Die Altersspanne lag bei 36-92 Jahren, das Durchschnittsalter bei 67 Jahren mit einer Standardabweichung von 13 Jahren. 34 Patienten (32,4%) waren Frauen, 71 Männer (67,6%). Die Proben umfassten 15 gesunde Absetzungsränder (10,9%), 15 (10,9%) hyperplastische Adenome, 64 (46,7%) low-grade Adenome, 20 (14,6%) high-grade Adenome und 23 (16,8%) KRK.

Es konnten folgende histologische Typen unterschieden werden:

- 15 (10,9%) hyperplastische Adenome,
- 15 (10,9%) intakte Mukosa, gesunde Absetzungsränder,
- 37 (27,0 %) tubuläre Adenome
- 70 (51,1 %) tubulovillöse Adenome.

Die kolorektalen Adenome und KRK waren wie folgend verteilt: 31 (22,6%) waren im Rektum lokalisiert, 6 (4,4%) im Rektosigmoid, 31 (22,6%) im Sigmoid, 11 (22,6%) im Kolon descendens, 8 (5,8%) im Kolon transversum, 10 (7,3%) in der rechten Kolonflexur, 25 (18,2%) im Kolon ascendens und 15 (10,9%) im Coecum.

#### Patientendaten

	<i>n</i>	<i>Prozent/Total</i>
<i>Demographische Daten</i>		
Frauen	34	32,4%
Männer	71	67,6%
<i>Alter</i>		
Durchschnitt	66,7	
SD	13,4	
<i>Histologischer Typ</i>		
tubulär	37	27,0%
tubulovillös	70	51,1%
hyperplastisch	15	10,9%
Absetzungsränder	15	10,9%
<i>Dysplasiegrad</i>		
hyperplastisch	15	10,9%
Absetzungsränder	15	10,9%

## Ergebnisse

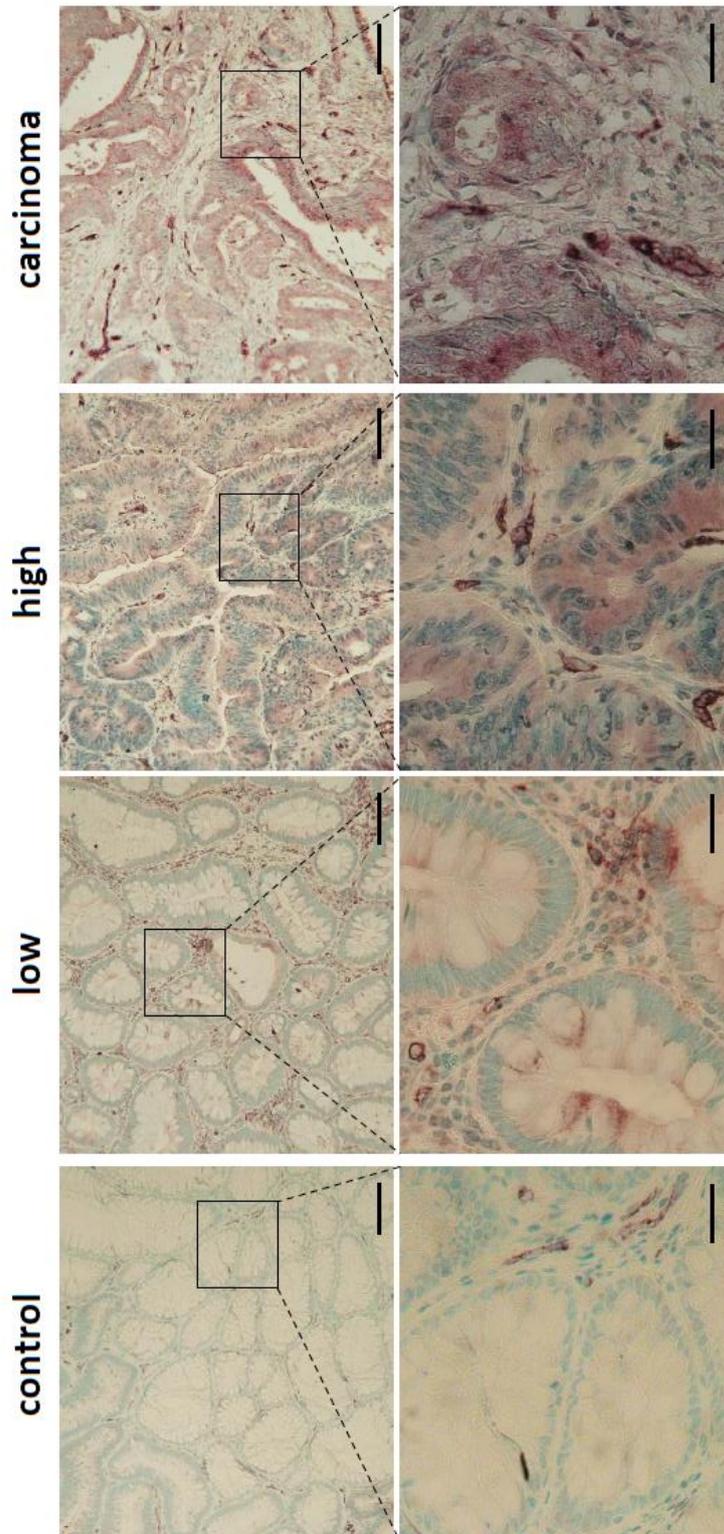
low-grade	64	46,7%
high-grade	20	14,6%
KRK	23	16,8%
<i>Lokalisation</i>		
Rektum	31	22,6%
Rektosigmoid	6	4,4%
Sigmoid	31	22,6%
Kolon descendens	11	8,0%
Linke Kolonflexur	0	0,0%
Kolon transversum	8	5,8%
Rechte Kolonflexur	10	7,3%
Kolon ascendens	25	18,2%
Coecum	15	10,9%

**Tabelle 19: Demographische und klinische Daten der Kohorte, n=105**

### **5.2 MMP-13-Expression in Abhängigkeit des pathologischen Stadiums**

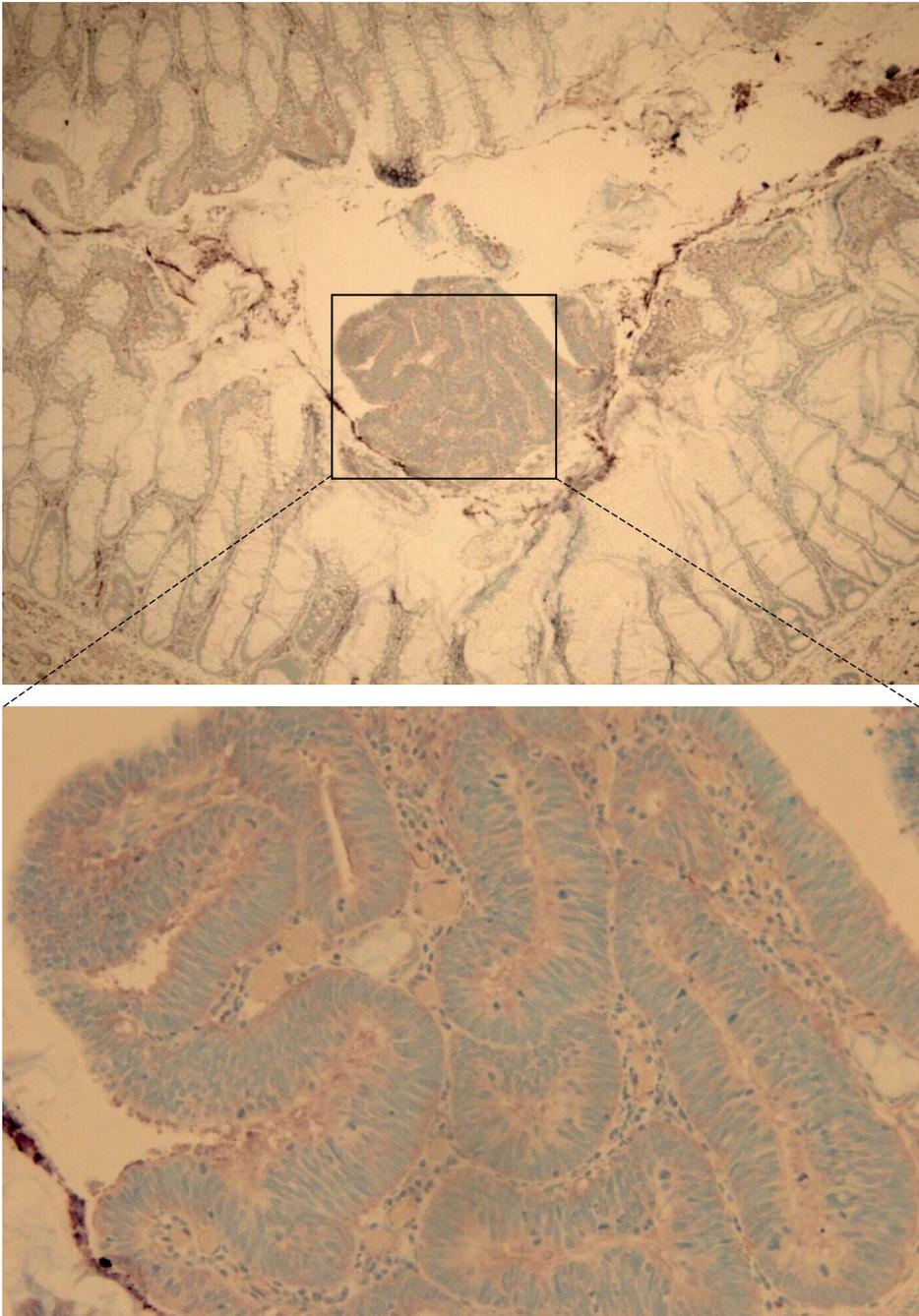
Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz entstehen in 10-15 Jahren KRK auf dem Boden eines Adenoms mit zunächst low-grade IEN, welche sich im Verlauf von Jahren zu high-grade IEN weiterentwickeln. Hierbei konnten wir im Rahmen dieser Transformation einen Anstieg der MMP-13-Proteinexpression in Abhängigkeit des pathologischen Stadiums von gesunder Kontrolle über low-grade zu high-grade Adenomen bis hin zum Karzinom beobachten. Dies wird in Abbildung 12 deutlich. MMP-13 konnte im Zytoplasma von hyperplastischen Adenomen und gesunden Absetzungsrändern, welche als Kontrolle benutzt wurden, nicht angefärbt werden. In low-grade Adenomen konnte in 50% der Fälle keine Anfärbung im Zytoplasma und in 45% eine schwache MMP-13 Färbung gezeigt werden. In high-grade Adenomen und KRK zeigte sich eine mäßige oder starke Anfärbung des Zytoplasmas. Die Anfärbung des Zytoplasmas wurde mittels IRS genauer evaluiert.

Abbildung 13 zeigt eine high-grade Dysplasie, die von normaler Kolonmukosa umgeben ist. Hier zeigt sich deutlich, dass das Zytoplasma der high-grade Dysplasie, mit MMP-13 Protein, angefärbt wurde, und dass im Zytoplasma der gesunden umgebenen Kolonmukosa kein MMP-13 immunhistochemisch nachweisbar ist.



**Abbildung 12: Ansteigende Expression von MMP-13 in der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz**

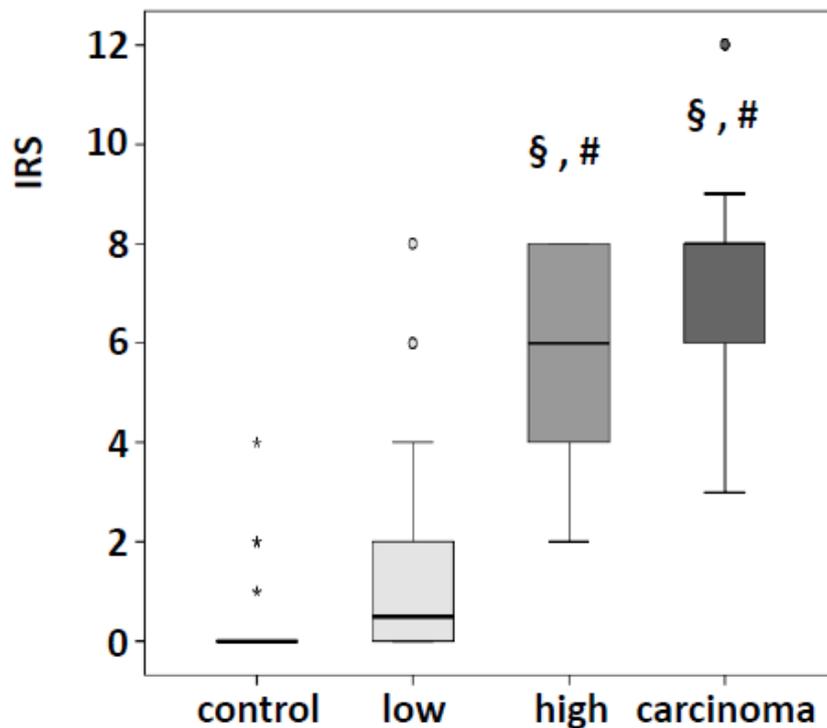
*Immunohistochemische Färbungen von MMP-13 (violett) in gesunden Kontrollen, low-grade Adenomen, high-grade Adenomen und KRK zeigen eine Korrelation zwischen neoplastischem Grad und der MMP-13-Expression. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Maßstab: 100  $\mu$ m, oberes Feld 100 $\times$  und 25  $\mu$ m, unteres Feld. 400 $\times$  25  $\mu$ m.*



**Abbildung 13: High-grade Areal in gesundem Gewebe**  
*Immunohistochemische Färbung eines high-grade Areals, das von gesundem Gewebe umgeben ist, hier zeigt sich deutlich die verstärkte Anreicherung von MMP-13 (violett) in dem high-grade Areal. Zellkerne sind in blau dargestellt.*

### 5.3 Diskriminierung von präkanzerösen kolorektalen Läsionen durch IRS

Der immunreaktive Score (IRS) dient der Quantifizierung der immunhistochemisch nachgewiesenen Proteinexpression. Die MMP-13-Proteinexpression nimmt, gemessen am IRS, von gesunder Kontrolle zu low-grade zu high-grade Adenomen hin zum Karzinom zu. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des IRS zwischen gesunden Proben und low-grade Adenomen ( $p = 0,008$ ), sowie zwischen low-grade Adenomen und high-grade Adenomen ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 14: IRS von MMP-13 in Abhängigkeit vom Dyplasiegrade des Gewebes**

Der Immunreaktive Score von MMP-13 differenziert zwischen low- und high-grade Adenomen. §  $p < 0.01$  im Vergleich zur gesunden Kontrolle. #  $p < 0.001$  und im Vergleich zu low-grade Adenomen. Die Daten sind im Box-Whisker-Plot dargestellt. Als Ausreißer (o) wurden Werte definiert, die von der Box um einen 1,5- bis 3-fachen Interquartilbereich abweichen. Extremwerte (\*) mit einer Distanz von mehr als 3 Kastenlängen wurden bei der statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

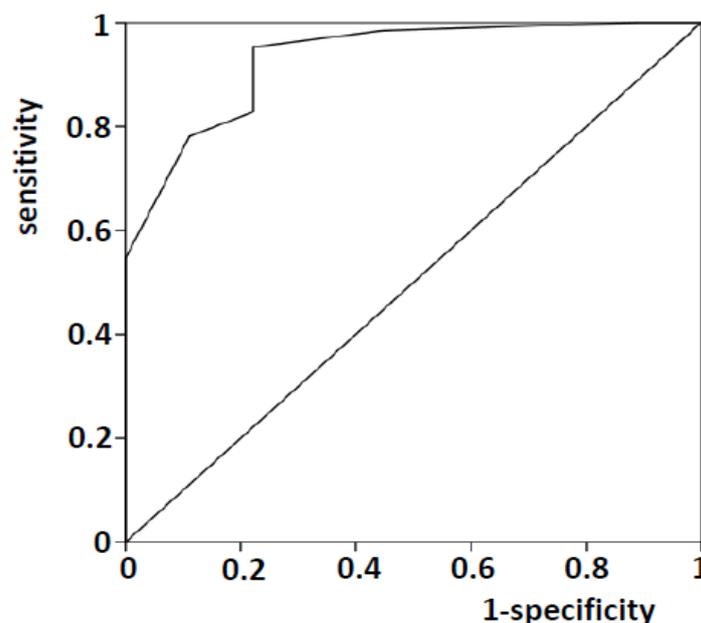
## Ergebnisse

Hingegen wurde keine statistische Signifikanz zwischen high-grade Adenomen und KRK ermittelt ( $p = 0.059$ ).

Zur Evaluierung des IRS als einem diagnostischen Werkzeug wurde die Receiver Operating Characteristic (ROC) und die Area Under the Curve (AUC) berechnet. Zur Ermittlung der ROC-Kurve wird die Richtig-positiv-Rate (= Sensitivität) gegen die Falsch-positiv-Rate (= 1-Spezifität) aufgetragen. Die Punkte auf der Kurve kennzeichnen jeweils eine bestimmte Relation der Maße zueinander. Besitzt ein diagnostisches Verfahren eine ähnliche Trennschärfe wie der Zufall, überlagern sich die Winkelhalbierende (entspricht der Ratewahrscheinlichkeit) und die ROC-Kurve. Hingegen wäre bei einem perfekten Verfahren eine rechtwinklige Kurve zu erwarten. Die linke obere Ecke des Diagramms entspricht somit einer Sensitivität und Spezifität von 100% (Hedderich und Sachs 2015).

Zudem wurde die AUC berechnet. Diese kann Werte zwischen 0,5 und 1 (50-100%) annehmen. Je höher die erreichte AUC ist, desto diskriminierungsfähiger ist ein Test (Hedderich und Sachs 2015).

Bei der durchgeführten Auswertung mittels IRS zeigte sich aus der vorherigen Berechnung eine gute Diskriminierung der Gruppen gesund und low-grade gegenüber high-grade Adenomen und Karzinomen. Zur Darstellung der ROC-Kurve und zur Berechnung der AUC wurden diese zwei Gruppen jeweils zusammengefasst. Hieraus ergibt sich die dargestellte ROC-Kurve.



**Abbildung 15: ROC-Kurve**

Mit den Gesamtdaten wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Diese dient der Überprüfung der diagnostischen Genauigkeit mittels IRS zwischen gesund/low-grade oder high-grade/Karzinom. AUC der ROC = 0.963, 95% CI 0.94-0.99,  $p < 0.001$ .

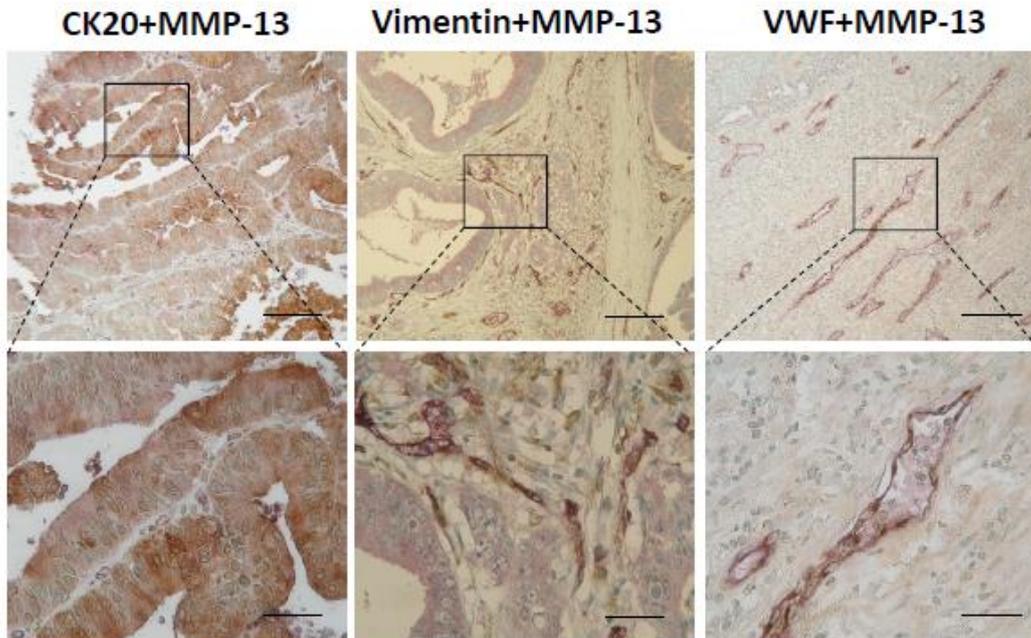
## Ergebnisse

Aus den Daten wurde eine AUC der ROC-Kurve von 96,28% mit einem 95% Konfidenzintervall von 93,7%-98,9% errechnet ( $p < 0.001$ ). Dies bedeutet, dass der IRS eine hohe diagnostische Genauigkeit hat, die Gruppen gesund/low-grade von high-grade/Karzinom zu unterscheiden. Ergibt sich ein IRS von  $> 2$ , haben 97,67% (Sensitivität) der Patienten ein high-grade Adenom oder KRK. Unter Berücksichtigung der Prävalenz von high-grade Adenomen und Karzinomen ist der positive prädiktive Wert des IRS 73,64%. Im Umkehrschluss wurden 84,04% der Patienten korrekt als gesund oder low-grade Adenom identifiziert. Der negative prädiktive Wert liegt bei 98,75%.

### **5.4 Zellulärer Ursprung von MMP-13 in KRK**

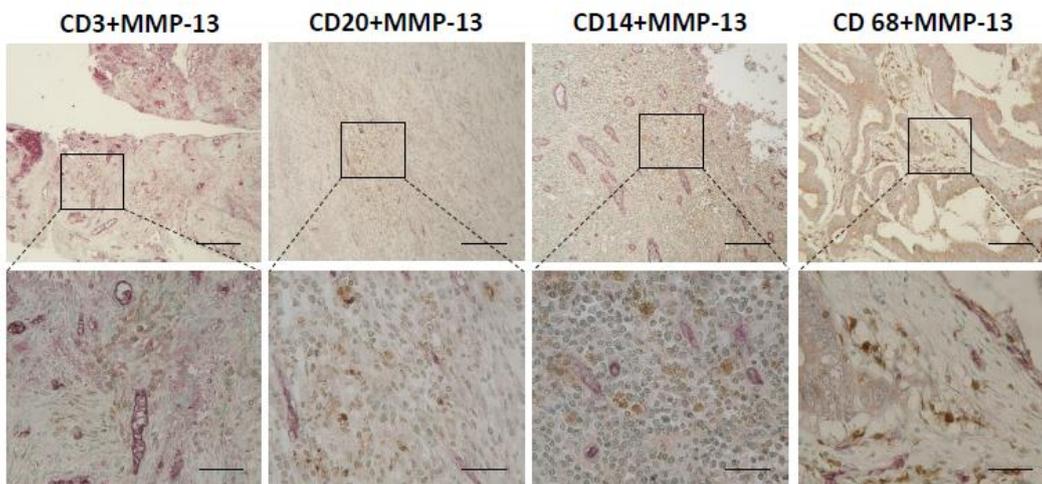
Zur genauen Identifizierung der Zellen, die MMP-13 im KRK exprimieren und produzieren, wurden Doppelfärbungen angefertigt. Erfolgreiche Doppelfärbungen konnten für CK20 (Cytokeratin) als Epithelmarker, vWF (von-Willebrandt-Faktor) als Endothelmarker und Vimentin als Marker für Fibroblasten durchgeführt werden. Damit kommen als zellulärer Ursprung von MMP-13 im KRK Epithelzellen, Endothel und Fibroblasten in Frage.

Keine Kolokalisation von MMP-13 mit den entsprechenden Markern konnte in B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen gezeigt werden. Hierzu wurden CD3 als T-Zell-Marker, CD20 als B-Zell-Marker, CD14 als Monozytenmarker und CD68 als Makrophagenmarker verwendet.



**Abbildung 16: Erfolgreiche Doppelfärbung**

Immunhistochemische Doppelfärbung von MMP-13 (lila) und Epithelmarker CK20, Fibroblastenmarker Vimentin und Endothelmarker vWF (braun) zeigen die Expression von MMP-13 in Epithelien, Endothelien und Fibroblasten. Maßstäbe: 100  $\mu$ m, oberes Feld 100  $\times$  und 25  $\mu$ m, unteres Feld 400  $\times$ .



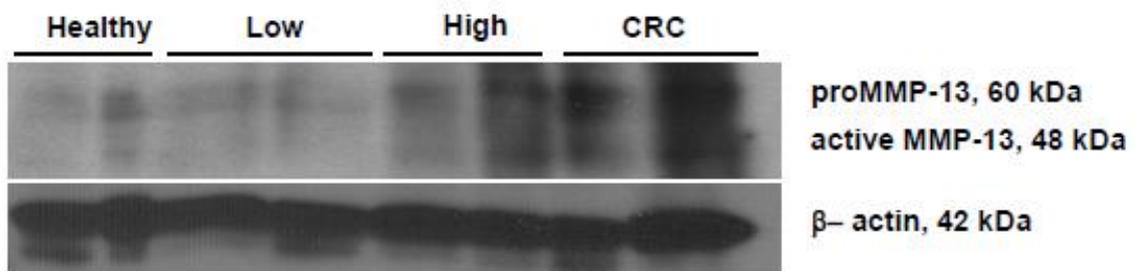
**Abbildung 17: Negative Doppelfärbungen**

Immunhistochemische Kofärbungen von MMP-13 (lila) und T-Zellmarker CD3, B-Zellmarker CD20 und Monozyten CD14 (braun) im KRK. Maßstäbe: 100  $\mu$ m, oberes Feld 100  $\times$  und 25  $\mu$ m, unteres Feld 400  $\times$ . Die Kerne sind blau gefärbt.

### 5.5 Evaluierung des IRS mittels Western Blot

Zur weiteren Evaluierung der MMP-13-Expression wurde ein Western Blot mit je zwei Proben pro Dysplasiegrad durchgeführt. Die Western Blot Analyse diente dazu, mit einer zweiten Methodik MMP-13 in den jeweiligen Dysplasiegraden nachzuweisen und damit das Ergebnis des IRS zu untermauern.

Hier zeigt sich, dass die MMP-13-Expression mit dem Grad der Dysplasie steigt. In gesunden Proben und low-grade Adenomen konnte nur ein schwaches Signal nachgewiesen werden, vor allem für das inaktive proMMP-13 (60 kDa). In high-grade Adenomen und KRK konnte ein stärkeres Signal für proMMP-13 und das aktive MMP-13 (48 kDa) gezeigt werden. Die Expression des aktiven MMP-13 zeigte sich vor allem in den KRK-Proben. Eine Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin (42 kDa) belegte eine gleichmäßige Proteinbeladung aller Proben an. Das Ergebnis des Western Blot korrelierte mit dem des IRS und kann somit als Evaluierung angesehen werden.



**Abbildung 18: Western Blot**

*Ein repräsentativer Western Blot demonstriert die steigende MMP-13-Proteinexpression in high-grade Adenomen und KRK. Eine Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin zeigt eine gleichmäßige Proteinbeladung aller Proben.*

## 6 Diskussion

Die Prognose bei KRK hängt von dem Ausmaß der lokalen, aber vor allem von der metastatischen, Tumorausbreitung ab (Kanas et al. 2012). Hierbei erfordern Invasion und Metastasierung ein Attachment von Tumorzellen an die Basalmembran, die Degradation des lokalen Bindegewebes sowie die Penetration und Migration durch das Stroma. MMPs sind hierbei die Schlüsselenzyme, die für den Abbau der EZM verantwortlich sind (Bonnans et al. 2014). MMPs sind also für die Tumorinvasion und Tumorausbreitung verantwortlich. Die Expression von MMPs ist eng mit der Entwicklung, Invasion und Progression von KRK verwandt (Ligi und Mannello 2016). Es konnte durch eine erhöhte Transkriptionsrate gezeigt werden, dass die meisten Fälle der KRK durch eine verstärkte Expression von MMP-3, -7, und -13 gekennzeichnet sind (Rath et al. 2010). Studien belegen, dass die Expression von MMP-13 mit der Entwicklung und Progression des KRK korreliert. 91 % der KRK zeigen einen immunhistochemischen Nachweis von MMP-13 (Leeman et al. 2002a, Curran et al. 2004). Ein Vergleich der MMP-13-Genexpression mit klinisch pathologischen Faktoren erbrachte eine hohe Korrelation mit der hepatischen Metastasierung, einer schlechten Prognose und einer frühen Rückfallrate (Yamada et al. 2010). Auch bei präkanzerösen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und adenomatösen Polypen konnten erhöhte MMP-13-Spiegel beobachtet werden, wenn auch deutlich niedriger als in kolorektalen Karzinomen (Rath et al. 2006; O'Sullivan et al. 2015). In Adenomen könnte MMP-13 demnach als früher Indikator für die kolorektale Karzinogenese dienen. In einer Zeitdauer von 10-15 Jahren entstehen die überwiegende Anzahl der KRK auf dem Boden eines Adenoms mit zunächst niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien (low-grade), welche sich im Verlauf von Jahren zu hochgradigen intraepithelialen Neoplasien (high-grade) weiterentwickeln. Gerade in diesem Prozess ist eine Früherkennung und Polypektomie wichtig, um die Entwicklung eines KRK zu verhindern (Brenner et al. 2010a; Bretthauer et al. 2016). Patienten mit einem Adenom, das größer 1cm ist und high-grade IEN zeigt, haben ein erhöhtes Risiko, weitere high-grade Adenome oder KRK zu entwickeln (Toll et al. 2011). Neben dem Dysplasiegrad spielt auch die Anzahl der Adenome eine Rolle für die Risikostratifizierung. Im Rahmen einer norwegischen bevölkerungsbasierten Kohortenstudie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit high-risk Adenomen trotz Polypektomie ein höheres Darmkrebssterberisiko als die Allgemeinbevölkerung haben (Loberg et

al. 2014). Der frühen Risikoabschätzung der Entwicklung eines KRK wird somit eine große Rolle zugeschrieben, welches mit Hilfe von MMP-13 möglich wäre.

## **6.1 Ergebnisdiskussion**

Zusammenfassend konnte folgendes in der vorliegenden Studie gezeigt werden: Die Proteinexpression von MMP-13 steigt im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz von low-grade Adenomen, über high-grade Adenome hin zum Karzinom an. Dies konnte mittels IRS evaluiert werden und im Western Blot bestätigt werden. Zur Identifizierung von low-grade und high-grade Adenomen, sowie KRK zeigt der IRS eine hohe diagnostische Genauigkeit. Vor allem der Anstieg des IRS von low-grade zu high-grade Adenomen zeigt, dass MMP-13 ein früher Marker in der Adenom-Karzinom-Sequenz ist. Des Weiteren konnte durch Doppelfärbungen der zelluläre Ursprung von MMP-13 im KRK geklärt werden.

### **6.1.1 Repräsentative demographische und klinische Merkmale der Patientenkohorte**

In der vorliegenden Studie lag die Altersspanne der Patienten bei 36-92 Jahren, das Durchschnittsalter bei 67 Jahren. Im Vergleich findet man eine steigende Inzidenz von kolorektalen Adenomen und KRK mit höherem Alter. 90% der Fälle von KRK finden sich nach dem 50. Lebensjahr (Barreton et al. 2011). Eine ähnliche Verteilung gilt für kolorektale Adenome. Im Alter von 50-59 Jahren konnte in Autopsie- und Screeninguntersuchungen eine Prävalenz für kolorektale Adenome von 41-69% festgestellt werden (Peipins und Sandler 1994), die in späteren Lebensdekaden auf 88% ansteigt. Es zeigt sich im Vergleich der Daten der Altersverteilung, dass mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren ein sowohl für das KRK als auch für Adenome repräsentatives Patientenkollektiv ausgewählt wurde. Ein Patient mit KRK hatte bei Diagnosestellung das 40. Lebensjahr noch nicht vollendet. Die wahrscheinlichste Ursache dafür sind eine genetische Disposition im Sinne eines HNPCC oder ein inzidentelles Karzinom. Die zur genauen Diagnose notwendigen Ergebnisse einer molekulargenetischen Untersuchung liegen nicht vor.

In die Studie wurden 34 (32,4%) Frauen und 71 (67,6%) Männer eingeschlossen, von denen 13 Männer und 10 Frauen an KRK erkrankt waren. Männer sind im Vergleich häufiger von kolorektalen Adenomen betroffen als Frauen, hier zeigt sich ein Verhältnis von M/F von 1,5-2:1 (Roy und Bianchi 2009, Barreton et al.

2011). Unter anderem wird hier eine präventive Wirkung von Östrogen und Progesteron auf die Entstehung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen diskutiert (Chlebowski et al. 2004).

Im Gegenzug dazu ist beim KRK das Verhältnis M/F als annähernd gleich anzusehen (Peipins und Sandler 1994). In Deutschland erkrankten im Jahr 2013 34.000 Männer und 29.000 Frauen an KRK (Robert-Koch-Institut 2016). Dies spiegelt sich auch annähernd im Patientenkollektiv dieser Studie wieder. Insgesamt wurden mehr Männer in die Studie eingeschlossen. Für KRK zeigt sich allerdings eine prozentuale Annäherung der Fallzahl von Männern und Frauen, hier wurde ein Verhältnis von M/F von 1,3:1 erreicht.

Die mukosalen Biopsieproben der Studie enthielten 64 (46,7%) low-grade Adenome und 20 (14,6%) high-grade Adenome. In der Literatur werden im Vergleich bei den klassischen Adenomen am häufigsten low-grade Dysplasien beschrieben (Kolorektales Adenom Spezielle Pathologie 2015). Dahingegen liegt die Rate der high-grade Dysplasien in den untersuchten Adenomen bei etwa 10% (Baretton et al. 2011; Bretthauer et al. 2016). Es wird deutlich, dass low-grade IEN häufiger auftreten als high-grade IEN. Dies spiegelt sich auch in den vorliegenden Patientendaten dieser Studie wieder.

In der Studie konnten folgende histologische Typen unterschieden werden: 15 (10,9%) waren hyperplastische Adenome, 15 (10,9%) waren gesunde Absetzungsränder, 37 (27,0%) waren tubuläre und 70 (51,1%) tubulovillöse Adenome. In der Literatur findet man im Vergleich Daten für hyperplastische Adenome als häufigste Adenome mit 35%, 28% tubuläre und 22% tubulovillöse Adenome (Kolorektales Adenom Spezielle Pathologie 2015). Die Einordnung in hyperplastisch, tubulär und villös im Rahmen der Studie erfolgte bereits in der Pathologie und wurde von dort übernommen. Hyperplastische Adenome sind in der Studie mit nur knapp 11% im Vergleich zu Daten aus der Literatur mit 35% nicht in ausreichender Menge repräsentiert. Die hyperplastischen Adenome wurden gemeinsam mit den gesunden Absetzungsrändern als Kontrollgruppe genutzt, sodass die Fallzahl bei ausreichender Menge nicht weiter erhöht wurde.

Die kolorektalen Adenome und KRK waren in der Studie zu 42,2 % rechtsseitig und 57,8% linksseitig lokalisiert. Sowohl für kolorektale Adenome als auch für KRK steigt die Inzidenz nach distal an. So finden sich 66-77% der Adenome im

Rektosigmoid (Baretton et al. 2011), bei KRK sind 80% der Tumoren in diesem Bereich lokalisiert. In dem vorliegenden Patientenkollektiv waren nur 50% der Adenome und KRK in diesem Bereich verortet. Hierbei ist auffällig, dass sich über 40% rechtsseitig befanden. Neuere Studien zeigen, dass rechtsseitige Kolonkarzinome in ihrer Inzidenz zunehmen (Nitsche et al. 2016). Im Rahmen der Vorsorgekoloskopie konnten vor allem die linksseitigen KRK reduziert werden, nicht jedoch die rechtsseitig lokalisierten (Brenner et al. 2010b). Diese unterscheiden sich von linksseitigen hinsichtlich einer schlechteren Prognose, einem fortgeschrittenem Stadium bei Diagnosestellung und ihrem molekularen Entstehungsweg (Lee et al. 2015). Eine schlechtere Prognose für rechtsseitige KRK konnte bisher nur für die westliche Bevölkerung gezeigt werden. Hierfür werden verschiedenen Faktoren, wie der unterschiedliche Lebensstil, das Gesundheitswesen und der genetische Hintergrund, verantwortlich gemacht (Yahagi et al. 2016). Rechtsseitige Kolonkarzinome entstehen im Vergleich zu linksseitigen weniger im Rahmen der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz, sondern über die serratierte Karzinogenese (Tannapfel et al. 2010). Serratierte Adenome wurden aus der Studie ausgeschlossen. Jedoch ist es möglich, dass KRK, die über die serratierte Karzinogenese entstanden sind, mit eingeschlossen wurden. Hierzu fehlen genauere Analysen. Eine genaue Unterscheidung wäre mit Hilfe von molekularpathologischen Analysen wie einer PCR möglich, da im Rahmen der serratierten Karzinogenese andere Mutationen durchlaufen werden als in der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz (Tannapfel et al. 2010).

In Zusammenstellung der vorhandenen Patientendaten im Vergleich zu Literaturangaben (Baretton et al. 2011; Peipins und Sandler 1994; Kolorektales Adenom Spezielle Pathologie 2015) ist in Bezug auf Alter, Geschlechterverteilung, Dysplasiegrad und Lokalisation ein repräsentatives Patientenkollektiv in die Studie aufgenommen worden. Hyperplastische Adenome als häufigste Form sind in der Studie unterrepräsentiert. Diese wurden im vorliegenden Fall nur als Kontrollgruppe genutzt, bei ausreichender Fallzahl wurde diese nicht weiter erhöht. Daten über familiäre oder andere Risikofaktoren, wie das Vorliegen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Ernährungsgewohnheiten fehlen, so dass hier keine Unterscheidung in Subgruppen erfolgen konnte. Dies wäre für künftige Studien sinnvoll, da diese Faktoren mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines KRK einhergehen (Haggard und Boushey 2009).

### **6.1.2 MMP-13-Expression in der Adenom-Karzinom-Sequenz**

Die immunhistochemische Anfärbung (Abbildung 12) zeigt einen Anstieg der MMP-13-Expression in Abhängigkeit vom pathologischen Stadium. In als Kontrolle benutzten hyperplastischen Adenomen und gesunden Absetzungsrandern konnte MMP-13 im Zytoplasma nicht angefärbt werden. Diese Beobachtungen stimmen mit bisherigen Studien überein (Leeman et al. 2002a).

In low-grade Adenomen konnte in 50% der Fälle keine Anfärbung im Zytoplasma und in 45% eine schwache Färbung gezeigt werden.

Es wäre zum einen möglich, dass nur einige low-grade IEN MMP-13 im Zytoplasma exprimieren und sich dadurch anfärben. Vor allem interessant wäre es, zu wissen, ob gerade diese Adenome eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, high-grade Dysplasien zu entwickeln. Dies konnte im Rahmen in der vorliegenden Studie nicht geklärt werden, da die vorliegenden Adenome vollständig entfernt und keine weiteren Langzeitdaten vorliegen.

Zum anderen ist eine Anfärbung von MMP-13 im Zytoplasma von low-grade Adenomen durch eine unspezifische Hintergrundfärbung möglich. Diese tritt im Rahmen der Färbemethode auf und wird vor allem durch endogene Enzyme wie die Peroxidase verursacht (Burns 1975). Um die Hintergrundfärbung zu verringern, werden diese Enzyme mit Wasserstoffperoxid gehemmt und eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Nichtsdestotrotz bleibt eine Unsicherheit über die korrekte Aussage der Immunreaktivität, wenn sich Zellen schwach anfärben.

Die Proben von high-grade Adenomen und KRK zeigten eine mäßige oder starke Anfärbung des MMP-13 im Zytoplasma. Dies konnte für alle Karzinomproben und in 95% der high-grade Proben beobachtet werden. In high-grade Adenomen konnte nur in 5% der Fälle und in KRK in keinem Fall eine schwache Anfärbung gezeigt werden. Eine steigende MMP-13 Expression scheint also mit dem Dysplasiegrad zu korrelieren.

Die in Abbildung 13 gezeigte high-grade Dysplasie, die von normaler Kolonmukosa umgeben ist, zeigt eine positive MMP-13-Immunreaktivität im Zytoplasma. Der Nachweis von MMP-13 allein im Zytoplasma der high-grade Dysplasie unterstreicht hierbei die Aussage, dass die MMP-13-Expression in Abhängigkeit des Dysplasiegrades steigt, und eine deutliche Abgrenzung der high-grade Dysplasie durch die MMP-13-Anfärbung möglich ist. Hieraus ist zu schließen, dass die MMP-13-Anfärbung zur Differenzierung der Dysplasiegrade

vor allem in Abgrenzung zur high-grade IEN und Karzinomen genutzt werden kann. Bisher dienen hierzu allein morphologische Kriterien, wie zum Beispiel die Form und Größe der Zellkerne sowie die Zellpolarität. Mit Hilfe von MMP-13 wäre dies einfacher möglich, allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass nicht alle high-grade Dysplasien von MMP-13 angefärbt werden konnten.

### **6.1.3 Diskriminierung der präkanzerösen kolorektalen Läsionen mittels IRS**

Zur Evaluation der immunhistochemischen Färbungen erfolgte die Auswertung der Proben mit dem Immunreaktiven Score, modifiziert nach Remmele und Stegner. Der IRS wurde ursprünglich entwickelt, um Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von Mammakarzinomen zu quantifizieren (Remmele und Stegner 1987). Diese Methode der Quantifizierung wird auch immer noch in Deutschland genutzt, um eine Entscheidung für eine antihormonelle Therapie zu treffen (Maass et al. 2015). Im angloamerikanischen Raum wird hierzu hingegen der Allredscore verwendet (Fitzgibbons et al. 2014). Hierbei werden die Färbeintensität mit der Anzahl der positiven Zellen addiert, und nicht wie bei dem IRS multipliziert. Sowohl bei dem IRS, als auch bei dem Allredscore gelten Werte von  $>2$  als positives Testergebnis (Fedchenko und Reifenrath 2014). Beide Testverfahren sind semiquantitativ und leicht zu bestimmen. In beiden Scores fließt die Färbeintensität mit ein. Diese ist nur anhand vorheriger Referenzaufnahmen wiederholbar zu bestimmen (Fedchenko und Reifenrath 2014). Daher wurde auch in der vorliegenden Studie die Färbeintensität anhand von Referenzaufnahmen bestimmt. Nichts desto trotz bleiben diagnostische Unsicherheiten. So wurden nicht alle Schnitte gleichzeitig gefärbt und die Auswertung ist Untersucherabhängig. Allgemeine Kritik an dieser Art der Auswertung ist vor allem die Verwendung von verschiedenen Färbeverfahren von ungleicher Qualität, sodass bei der Quantifizierung des Östrogenrezeptors im Mammakarzinom eine Fehlbeurteilungsquote von bis 20 % erreicht wird (Allred 2010). Eine Lösung zu einer standardisierten Auswertung wäre zum Beispiel eine computerbasierte Auswertung. Die vorliegende Software (Leica QWin Standard 2006) konnte gut positiv gefärbte Zellen auszählen, allerdings die Färbeintensität nicht beurteilen, sodass sich für die Auswertung mittels IRS entschieden wurde. Die Anwendung des IRS stellt hierbei eine einfach anzuwendende und kostengünstige Auswertung der Proben dar.

## Diskussion

Die MMP-13-Proteinexpression nimmt, gemessen am Immunreaktiven Score, von gesunder Kontrolle zu low-grade zu high-grade Adenomen hin zum Karzinom zu. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Immunreaktiven Scores zwischen gesunden Proben und low-grade ( $p = 0,008$ ), sowie zwischen low-grade und high-grade Adenomen ( $p < 0,001$ ). Keine statistische Signifikanz zeigt sich zwischen high-grade Adenomen und KRK ( $p = 0.059$ ).

Hieraus lässt sich folgender Schluss ziehen:

Vor allem der starke Anstieg des MMP-13-IRS von low- zu high-grade Adenomen definiert einen frühen Zeitpunkt in der Adenom-Karzinom-Sequenz. Daher vermag MMP-13 ein früher prädiktiver Marker der kolorektalen Karzinogenese zu sein. Durch Erhöhung der Fallzahl wäre eventuell eine Signifikanz zwischen den Gruppen high-grade und Karzinom zu erreichen.

Es wäre auch möglich, dass sich durch eine Erhöhung der Fallzahl die Gruppen gesund und low-grade, sowie high-grade und KRK im IRS annähern, ähnlich wie die Gruppen zur Berechnung der ROC (Receiver Operating Characteristic) und AUC (Area Under the Curve) zusammengefasst wurden. Bei der durchgeführten Auswertung mittels IRS zeigte sich aus der Berechnung eine gute Diskriminierung der Gruppen gesund/low-grade gegenüber high-grade/Karzinom. Hieraus wurde eine AUC der ROC-Kurve von 96,28% mit einem 95% Konfidenzintervall von 93,7%- 98,9% errechnet ( $p < 0,001$ ). Eine Unterscheidung der einzelnen Gruppen ist mit dem IRS nicht möglich.

Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz erfolgt eine maligne Transformation sukzessive über Mutationen von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen. Hierbei kommt es auch zu einer Überexpression von MMP-13. Dies ist zum einen schon in dem initialen Schritt von gesund zu low-grade Adenomen zu sehen, aber wird vor allem deutlich in der Entwicklung von low-grade zu high-grade Adenomen. Diese Schritte sind vor allem gekennzeichnet durch die Aktivierung von K-ras und dem Verlust des langen Arms auf Chromosom 18, mit den Genen für SMAD-4 und SMAD-2, die Tumorsuppressorgene codieren (Walther et al. 2009). Hierbei ist anzunehmen, dass die beschriebenen genetischen Mutationen zu einer Überexpression von MMP-13 führen. Im gesunden Zustand unterdrückt SMAD-4 die Tumorzellmigration und die Aktivierung von MMP-9 in Zellen des Kolon (Papageorgis et al. 2011). Im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese kommt es zu einer Inaktivierung von SMAD-4 (Papageorgis et al. 2011) und somit auch zur Aktivierung der Tumorzellmigration und MMP-9 Aktivierung. Ein ähnlicher Effekt könnte für den Anstieg von MMP-13 verantwortlich sein. In Chondrozyten konnte

gezeigt werden, dass SMAD-3 die Expression von MMP-13 unterdrückt. Eine Mutation des SMAD-3 Gens führt zu Knorpeldegeneration und Osteoarthritis durch die Induktion von MMP-13 (Chen et al. 2012).

Im Rahmen einer nächsten Studie könnte unter anderem mittels quantitativer real-time PCR (Polymerasekettenreaktion) geklärt werden, in wie weit eine Korrelation von MMP-13 mit molekularpathologischen Parametern, wie der Inaktivierung SMAD-4 auch in der kolorektalen Karzinogenese eine Rolle spielen. Dies würde dann die Ergebnisse des IRS unterstreichen.

Des Weiteren konnte mit den Berechnungen gezeigt werden, dass 97,67% (Sensitivität) der Patienten bei einem IRS > 2 ein high-grade Adenom oder KRK haben. Mit der immunhistochemischen Färbung und Auswertung lassen sich also high-grade Adenome und KRK gut identifizieren. Hierzu ist eine Immunreaktivität von MMP-13 nötig, die zu einem IRS > 2 führt. Wie die Studie zeigt, steigt die MMP-13-Expression in KRK und high-grade Adenomen an; dies wird durch den Anstieg des IRS deutlich. Ein niedriger IRS korreliert mit einer verringerten Expression von MMP-13. Unter Berücksichtigung der Prävalenz von high-grade Adenomen und Karzinomen konnte ein positiver prädiktiver Wert des IRS von 73,64% berechnet werden. Im Umkehrschluss wurden 84,04% der Patienten korrekt als gesund oder low-grade Adenom identifiziert. Der negative prädiktive Wert liegt bei 98,75%. Im Vergleich hierzu zeigt der Guajak-basierte Test einen positiven prädiktiven Wert zur Entdeckung von fortgeschrittenen Adenomen oder Karzinomen von 17,1% und einen negativen prädiktiven Wert von 90,4% (Brenner und Tao 2013).

Da der IRS einen höheren positiven prädiktiven Wert für gesunde und low-grade Adenome als für KRK und high-grade Adenome und einen hohen prädiktiven negativen Wert hat, kann er als Ausschlussverfahren angesehen werden. Als diagnostisches Verfahren kann er somit gut gesunde und low-grade Adenome identifizieren, da diese sich nicht oder nur gering anfärben ließen. High-grade Adenome und KRK konnten hiervon gut mittels IRS abgegrenzt werden. In Zusammenfassung zeigt der IRS eine hohe diagnostische Genauigkeit zur Identifizierung von low-grade und high-grade Adenomen

### **6.1.4 Der zelluläre Ursprung von MMP-13 im KRK**

Der zelluläre Ursprung von MMP-13 ist von großer Bedeutung, um ein Verständnis der Kommunikation von Zellen und der EZM zu bekommen. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass MMP-13 von Endothel

(Freije et al. 1994, Vizoso et al. 2006), Fibroblasten (Rasanen und Vaheri 2010) und Epithelzellen des KRK (Leeman et al. 2002a) gebildet wird.

Dies konnte durch Doppelfärbungen im Rahmen der vorliegenden Studie für das KRK bestätigt werden. Erfolgreiche Doppelfärbungen konnten für CK20 als Epithelmarker, vWF (von-Willebrandt-Faktor) als Endothelmarker und Vimentin als Marker für Fibroblasten durchgeführt werden. Daraus kann als zellulärer Ursprung von MMP-13 im KRK auf Epithel, Endothel und Fibroblasten geschlossen werden.

MMP-13 ist für die Migration von Endothelzellen essentiell (Toriseva et al. 2012). In vitro-Silencing von MMP-13 mRNA via RNA-Interferenz führte zu einer reduzierten Migration von Endothelzellen (Lopez-Rivera et al. 2005). NO (Stickstoffmonoxid), ein Downstream-Effektor von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), katalysiert die Freisetzung von MMP-13 aus dem MMP-13/Caveolin-1-Komplex. Das freigesetzte MMP-13 ist für den Abbau von Kollagen verantwortlich, eine Voraussetzung für die Migration von Endothelzellen (Lopez-Rivera et al. 2005). Bei Colitis ulcerosa-Patienten konnte neben der Expression von MMP-13 in Endothelzellen eine Assoziation mit Inflammation und Angiogenese nachgewiesen werden (Rath et al. 2010, O'Sullivan et al. 2015). Die Studie von Rath et al. zeigte bei Patienten mit Colitis ulcerosa den Fluoreszenzimmunhistochemische Nachweis von MMP-13 in CD54 (cluster of differentiation)-positiven Leukozyten.

In der vorliegenden Studie konnte keine Kolo-kalisation von MMP-13 in B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen gezeigt werden. Zum Nachweis wurden CD3 als T-Zellmarker, CD20 als B-Zellmarker, CD14 als Monozytenmarker und CD68 als Makrophagenmarker verwendet. Eine mögliche Erklärung für den Nachweis von MMP-13-positiven Leukozyten nur in den Proben von Patienten mit Colitis ulcerosa, ist neben den unterschiedlichen Zielantigenen, die in den Studien benutzt wurden, eine unterschiedliche Pathogenese der MMP-13-Aktivierung. Die im Rahmen der Colitis ulcerosa nachzuweisende Expression von MMP-13 in Leukozyten könnte demnach spezifisch für das Entzündungsgeschehen sein, da es in nicht entzündlich veränderten Adenomen nicht nachzuweisen war.

Im Rahmen der Tumorentwicklung und -progression spielen Immunzellen eine wichtige Rolle (Zamarron und Chen 2011; Terzic et al. 2010). So konnte im KRK gezeigt werden, dass mit der Dichte und der Lokalisation von Immunzellen eine Vorhersage für das Überleben von Patienten getroffen werden kann (Galon et al. 2006). Den Immunzellen werden hierbei sowohl tumorfördernde, als auch

tumorhemmende Funktionen zugeschrieben (Zamarron und Chen 2011). Obwohl keine Expression von MMP-13 in B-, T-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden konnte, ist über die Sekretion von MMP-13 und anderen Chemokinen, wie Interleukine, aus den Tumorzellen eine Kommunikation mit diesen Zellen anzunehmen (Terzic et al. 2010).

Fibroblasten spielen eine wichtige Rolle in der Progression, dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren (Kalluri 2016). Durch die Produktion von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und MMP interagieren Tumore und die umliegenden Fibroblasten (Kalluri und Zeisberg 2006). So konnte im Mammakarzinom gezeigt werden, dass Tumorzellen über die Sekretion von IL-1 die umliegenden Fibroblasten zur MMP-13-Expression induzieren (Uria et al. 1997, Leeman et al. 2002b). Die Induktion von MMP-13 durch IL-1 erfordert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Dies konnte zuerst in Chondrosarkomzellen gezeigt werden (Leeman et al. 2002b). Dieser Effekt konnte auch in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden (Buhrmann et al. 2014; Sakamoto et al. 2009). NF- $\kappa$ B spielt als Transkriptionsfaktor eine Rolle bei Zellproliferation und dem Zelltod und ist somit auch bei der Entstehung des KRK von Bedeutung (Hoesel und Schmid 2013).

In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass aktivierte Fibroblasten MMP-13 sezernieren, und dies mit der VEGF-Sekretion korreliert. Daraus wurde geschlossen, dass die MMP-13-Sekretion durch Fibroblasten die Angiogenese fördert (Rasanen und Vaheri 2010). Die Angiogenese in Tumoren ist essentiell für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und somit für die Tumorpheriferation, sowie die Metastasierung (Weis und Cheresh 2011).

Hierbei wird deutlich, dass zur komplexen Interaktion von Fibroblasten und Tumorzellen auch MMP-13 notwendig ist. MMP-13 wird sowohl von Fibroblasten, als auch von den Tumorzellen selbst sezerniert und führt durch Stimulation von Chemokinen zur Angiogenese und somit zur Progression und Metastatsierung von Tumoren.

Als weiterer Ursprung von MMP-13 im KRK konnten Tumorepithelzellen identifiziert werden. Bereits Leeman et al. konnten in 91% der KRK MMP-13 immunhistochemisch nachweisen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine starke Anfärbung von MMP-13 im Zytoplasma von Tumorzellen mit einer schlechten Prognose korreliert.

Die Identifizierung von Zellen im KRK, die MMP-13 produzieren, führt zu einem besseren Verständnis der Interaktion von EZM und Tumorzellen und bildet eine

Grundlage zur zielgerichtet therapeutischen Modulation. Tumorzellen sind nicht als isolierte Entitäten anzusehen, sondern stehen in enger Wechselwirkung mit ihrer Umgebung. Die Analyse der Interaktion der Tumorepithelzellen mit dem Stroma zeigt, dass die umliegenden Stromazellen einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung maligner Erkrankungen haben. Durch das genauere Verständnis der Interaktionen von MMP als wichtige Mediatoren der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ist es möglich, MMP mit zielgerichteten Molekülen anzugreifen.

### **6.1.5 Bestätigung des IRS-Scoring durch Western Blot-Analyse**

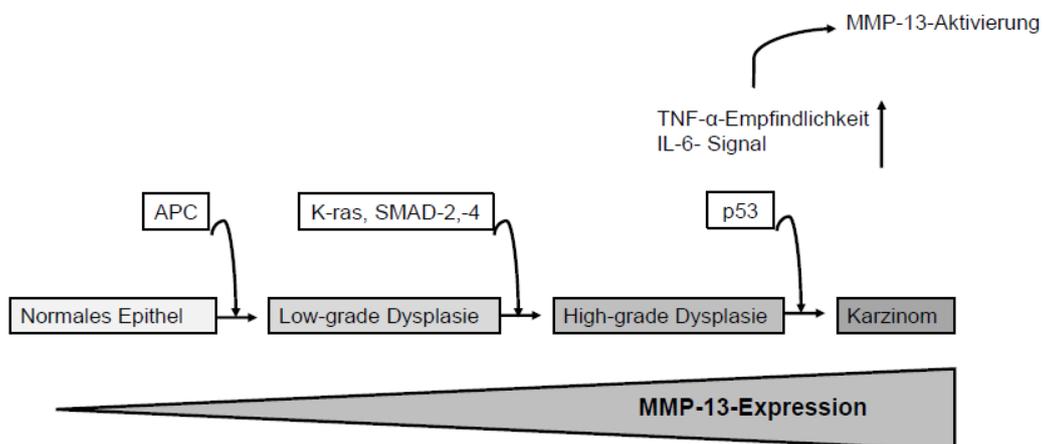
Der zur Evaluierung des IRS durchgeführte Western Blot zeigte, dass die MMP-13-Expression mit dem Grad der Dysplasie steigt. Die Durchführung des Western Blot war aufgrund des schwierigen Verfahrens der Proteinextraktion aus Paraffinblöcken erschwert und eignet sich nicht zur Routinediagnostik. Nichtsdestotrotz konnten die Ergebnisse des IRS mit dieser zweiten Methode validiert werden, wenn auch nur in je zwei Proben pro Dysplasiegrad. Limitierend waren hierbei das schwierige Verfahren der Proteinextraktion und die Menge geeigneter Proben. Am besten geeignet für den Western Blot waren Proben, in denen nur ein Dysplasiegrad nachweisbar war, da es bei der Bearbeitung der jeweiligen Probe zu einer Vermischung der Proteine kommt. Bei Adenomen mit low-grade und high-grade Dysplasie ist in der Regel nur ein Teil des Gewebes verändert, sodass eine Vermischung mit gesundem Gewebe erfolgt wäre.

Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde der Western Blot an ausgewählten Proben durchgeführt, in denen eine bereits histologisch geeignete große Menge eines Dysplasiegrades nachgewiesen worden war.

Bei dem durchgeführten Western Blot zeigte sich nur ein schwaches Signal für das inaktive proMMP-13 in gesunden Proben und low-grade Adenomen. In high-grade Adenomen und KRK konnte ein stärkeres Signal für proMMP-13 und das aktive MMP-13 gezeigt werden (Abb. 18). Die Aktivierung des inaktiven Proenzym kann autoproteolytisch katalysiert sein oder durch andere MMPs katalysiert werden. Bei der Aktivierung von MMP-13 spielen vor allem MT1-MMP, MMP-2 und MMP-3 eine Rolle. Des Weiteren kann die MMP-13-Expression von Zytokinen induziert werden, hier sind neben Interleukin-1 und -6 auch der Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) verantwortlich (Leeman et al. 2002b). TNF- $\alpha$  bewirkt in gesunden Zellen Apoptose und Tumorsuppression. In Studien konnte gezeigt

werden, dass er im KRK tumorfördernd wirkt (West et al. 2015). TNF- $\alpha$  führt über eine Hemmung der pro-apoptotischen Kinase C $\delta$  zum Wachstum von Tumorzellen (West et al. 2015). Hohe IL-6-Spiegel sind mit ansteigenden Tumorstadien und Tumorgröße, Metastasierung und verkürztem Überleben assoziiert (Grundmann und Meyer 2013). Daneben führt IL-6 zur Induktion der Mikrosatelliteninstabilität (West et al. 2015). Eine Aktivierung von IL-6 im KRK erfolgt wiederum bei der Mutation des K-ras-Onkogens, das im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz mutiert. Hier liegt eine mögliche Erklärung für den Anstieg des aktivierten MMP-13. So lässt es vermuten, dass die Mutationen, die im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz durchlaufen werden, zu einer Induktion von Chemokinen führen, die wiederum MMP-13 aktivieren.

Die Expression des aktiven MMP-13 zeigt sich im Western Blot vor allem in den KRK-Proben. Die maligne Transformation erfolgt sukzessive über Mutationen von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen. Hierbei ist im letzten Schritt hin zum Karzinom häufig eine Mutation von p53 nachweisbar. Diese Mutation führt neben der Tumorinvasivität zu einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Empfindlichkeit und zu einem verbesserten Interleukin-6-Signal (West et al. 2015). Beide Chemokine aktivieren dann wiederum vermehrt MMP-13. Eine Überprüfung dieser Erklärung wäre im Rahmen einer nächsten Studie sinnvoll.



**Abbildung 19: MMP-13 in der Adenom-Karzinom-Sequenz**

Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz erfolgt eine maligne Transformation sukzessive über Mutationen von Tumorsuppressor- und Protoonkogenen. Molekulargenetisch steht an erster Stelle eine Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens gefolgt von einer Mutation des K-ras-Protoonkogens. Im weiteren Verlauf folgt die Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens. Hierbei konnte ein Anstieg der MMP-13-Expression beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist zum einen die direkte Wirkung der genetischen Mutationen (wie z.B. SMAD-4) auf die MMP-13-Expression, zum anderen auch eine vermehrte Aktivierung durch Chemokine (wie TNF- $\alpha$  und IL-6).

## 6.2 Limitation der Studie

Ziel der Studie war es, die MMP-13-Expression in kolorektalen Adenomen und Karzinomen zu untersuchen, um die Eignung als Marker zur präzisen und genauen Diagnose zu prüfen. In 137 Proben von 105 Patienten wurde die Assoziation des Dysplasiegrades mit der Expression von MMP-13 mithilfe eines neu adaptierten Immunreaktiven Scores (IRS) beurteilt.

Diese Studie zeigt, dass die Proteinexpression von MMP-13, gemessen am IRS, mit dem Dysplasiegrad steigt. Dies wurde mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Zur Etablierung der MMP-13-Immunreaktivität als prognostischer Marker ist eine weitere multizentrische, prospektive Studie nötig. Hierbei ist eine Erweiterung des Patientenkollektivs sinnvoll. Neben der Erhöhung der Fallzahl sind der Einschluss von serratierten Adenomen und die Differenzierung der Patienten in Subgruppen dabei zu beachten. Dies war im Rahmen der vorliegenden unizentrischen Studie vor allem aufgrund fehlender Patientendaten nicht möglich. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden sessil serratierte Adenome nicht eingeschlossen. Die serratierte Karzinogenese stellt einen alternativen Weg der Karzinomentstehung dar. Diese Abgrenzung zur klassischen Karzinogenese konnte aufgrund neuer molekularbiologischer Erkenntnisse erst in den letzten 10 Jahren gemacht werden (Jass 2007). Wie auch die klassischen Adenome entwickeln sich die serratierten Adenome zu KRK weiter (Munding und Tannapfel 2013). Die aus serratierten Adenomen entstehenden KRK unterscheiden sich in ihrem biologischen Verhalten, der Lokalisation und ihrem molekularen Profil. So treten sie vermehrt bei Frauen auf und sind eher im proximalen Kolon lokalisiert (Tannapfel et al. 2010). Aufgrund der unterschiedlichen molekularen Entstehungsmechanismen, wurden serratierte Adenome nicht mit in die vorliegende Studie eingeschlossen, dies wäre aber in einer weiteren Studie sinnvoll.

Des Weiteren erfolgte im Rahmen dieser Studie keine Differenzierung der Patienten in Subgruppen, zum Beispiel nach familiären Risikofaktoren, chronischen entzündlichen Darmerkrankungen und nach links- und rechtsseitigen Läsionen. Eine Unterscheidung in diese Untergruppen ist sinnvoll, da sie mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms assoziiert sind.

Die Aussagekraft von MMP-13 als prognostischer Marker sollte im Rahmen einer weiteren multizentrischen Studie gezeigt werden, in der das Patientenkollektiv vergrößert wird und die oben genannte Patientengruppen differenziert werden

können. Neben dem größeren Stichprobenumfang haben multizentrische Studien in der Regel eine höhere Aussagekraft, da hier deutlicherer Ergebnisse mit repräsentativen Patientenproben erreicht werden.

### **6.3 Ausblick**

Im Rahmen der Studie konnte gezeigt werden, dass der IRS eine geeignete Methode zur Beurteilung des pathologischen Grades von präkanzerösen und kanzerösen kolorektalen Läsionen darstellt. MMP-13 wurde als ein ausgezeichneter Marker für high-grade IEN und das KRK identifiziert. Gerade high-grade IEN kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Patienten mit high-grade Dysplasien zeigen ein erhöhtes Risiko, weitere high-grade Adenome oder KRK zu entwickeln (Toll et al. 2011) und weisen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein höheres Darmkrebssterberisiko auf (Loberg et al. 2014). Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine starke MMP-13-Expression mit der Entwicklung und Progression des KRK korreliert. Folglich könnte der IRS dazu dienen, metastatisches Verhalten, Prognose und Rückfallrate des KRK zu prognostizieren. Hierzu ist die konventionelle Histologie nicht in der Lage. Der neu adaptierte immunreaktive MMP-13-Score (IRS) ermöglicht eine gezielte Überwachung betroffener Patienten. Um MMP-13 als frühen Marker der kolorektalen Karzinogenese zu etablieren, ist eine Langzeitstudie von 10-15 Jahren nötig, in der der klinische Verlauf von Patienten mit kolorektalen kanzerösen und präkanzerösen Läsionen in Bezug auf Tumorverhalten und Metastasierung beobachtet wird. Sollte sich hierbei zeigen, dass bereits MMP-13-positive Adenome ein erhöhtes beziehungsweise verfrühtes Risiko der Entartung aufweisen, sind diese Patienten engmaschiger endoskopisch zu kontrollieren. Unter anderem wird hierbei anhand des Oberflächenmusters eine Aussage über die Dignität getroffen (Kudo et al. 2001). Im Rahmen des technischen Fortschrittes kann mittels Chromoendoskopie bereits in vivo zwischen Hyperplasie und Adenom unterschieden werden. Hierbei kann zum Beispiel mit Hilfe des Narrow band Imaging eine Verstärkung des Kontrastes erreicht werden, was zu einer erhöhten Adenomdetektionsrate führen kann (Leung et al. 2014). Eine weitere Verbesserung der digitalen Strukturverstärkung bietet die Fluoreszenzendoskopie. Bei diesem Verfahren werden Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert eingesetzt, die sich beispielsweise in Dysplasien oder Tumoren anreichern und so das veränderte Gewebe optisch deutlicher machen.

## Diskussion

MMP-13 könnte somit bereits in vivo sichtbar gemacht werden und prognostische Aussagen ermöglichen. Ein ähnlicher Ansatz wurde im Rahmen einer tierexperimentellen Studie zur Detektion von KRK bei Colitis ulcerosa mittels MMP-2- und MMP-9-Fluoreszenzendoskopie durchgeführt (Schwegmann et al. 2016). Hierbei wurden Mäusen mit KRK 24 Stunden vor der Koloskopie MMP-2/-9 markierte Tracer intravenös appliziert. Die Entwicklung der Tumore wurde in vivo durch Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie evaluiert. Hierbei zeigte sich ex vivo, dass in der konventionellen Weißlichtendoskopie jeder dritte Tumor im Kolonkarzinommodell übersehen wurde. Die mukosale MMP-2- und MMP-9-Expression war in Adenomen mit high-grade IEN und Adenokarzinomen erhöht. Hieraus schlossen die Autoren, dass die MMP-2- und MMP-9-gerichtete Fluoreszenzendoskopie vielversprechend erscheint, um die Detektionsrate kolorektaler Frühkarzinome im Rahmen der Koloskopie im Menschen weiter zu erhöhen (Schwegmann et al. 2016).

Neue molekulare Biomarker können sowohl für die Einschätzung der Prognose, als auch zur Diagnosesicherung z.B. im Rahmen neuer bildgebender Verfahren genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass MMP-13 einen frühen Indikator der kolorektalen Karzinogenese darstellt. Hierbei könnte MMP-13 als prognostischer Marker genutzt werden. MMP-13 könnte also nicht nur immunhistochemisch dazu genutzt werden, eine präzise und genaue Diagnose zu stellen, sondern könnte auch im Rahmen neuer Verfahren bereits in vivo sichtbar gemacht werden und somit prognostische Aussagen ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

**Ziel:** Ziel unserer Studie war es, die MMP-13-Expression in kolorektalen Adenomen und Karzinomen zu untersuchen, um damit auf eine präzise und genaue Diagnose schließen zu können.

**Studiendesign:** Es wurden 105 Patienten mit histologisch gesicherten kolorektalen Adenomen und KRK in die Studien aufgenommen. Insgesamt konnten von den 105 Patienten 137 Patientenproben ausgewertet werden.

Die Adenom- und Karzinomproben wurden nach routinemäßig durchgeführten koloskopischen Untersuchungen mit Polypektomie oder Operationen an kolorektalen Karzinomen durch das Institut für Pathologie der Universitätsklinik Gießen rekrutiert. Das Biopsiematerial wurde routinemäßig fixiert und in Bezug auf hyperplastische Anteile, low- oder high-grade Dysplasien histopathologisch untersucht. Parallel wurde eine immunhistochemische Färbung mit MMP-13 durchgeführt. Zur Evaluation der immunhistochemischen Färbung erfolgte die Auswertung der Proben in Anlehnung an den Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner. Die Ergebnisse des IRS wurden mittels Western Blot verifiziert. Zur Identifizierung der Zellen, die MMP-13 im KRK produzieren, wurden Doppelfärbungen angefertigt.

**Ergebnisse:** Die MMP-13-Proteinexpression nimmt gemessen am Immunreaktiven Score von gesunder Kontrolle über low-grade zu high-grade Adenom bis zum Karzinom zu. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Immunreaktiven Scores zwischen gesunden Proben und low-grade ( $p = 0,008$ ), sowie zwischen low-grade Adenomen und high-grade Adenomen ( $p < 0,001$ ). Keine statistische Signifikanz wurde zwischen high-grade Adenomen und KRK erreicht ( $p = 0,059$ ). Erfolgreiche Doppelfärbungen konnten für CK20 als Epithelmarker, vWF (von-Willebrandt-Faktor) als Endothelmarker und Vimentin als Marker für Fibroblasten durchgeführt werden.

**Schlussfolgerung:** Der IRS stellt eine geeignete Methode zur Beurteilung des pathologischen Grades von präkanzerösen und kanzerösen kolorektalen Läsionen dar. MMP-13 wurde als ausgezeichneter Marker für high-grade IEN und das KRK identifiziert. Der IRS könnte dazu dienen, metastatisches Verhalten, Prognose und Rückfallrate des KRK zu prognostizieren. Die Identifikation des zellulären Ursprungs von MMP-13 im KRK bietet darüber hinaus die Basis für eine gezielte therapeutische Modulation.

## 8 Summary

**Objective:** The assessment of suitable biomarkers to discriminate precancerous colorectal cancer stages might improve diagnosis and individual therapy as well as outcome. Here we investigate the association between grade of dysplasia and MMP-13 expression in biopsies from patients with cancerous and non-cancerous colorectal adenomas.

**Design:** Routinely fixed biopsies of 137 colorectal adenomas and colorectal cancer from 105 patients were examined histologically concerning hyperplastic, low- or high-grade dysplasia. Immunohistochemical staining of MMP-13 was performed and evaluated semi-quantitatively by the use of a newly adapted immunoreactive score. Calculated immunoreactive scoring results were validated through western blotting. Cellular sources for MMP-13 were identified by immunostaining.

**Results:** The amount of MMP-13 expression correlated with the histopathologic classification of (pre-)cancerous lesions. Semi-quantitative immunoreactive scoring revealed a significant increase from low- to high-grade adenomas, whereas any further increase in patients with carcinoma did not reach statistical significance. The results were validated by western blotting. Epithelial- and endothelial cells as well as fibroblasts were identified as main cellular sources for MMP-13 production in colorectal lesions.

**Conclusions:** MMP-13 IRS represents a suitable method to assess the pathological grade of precancerous and cancerous colorectal lesions. MMP-13 has been identified as an excellent marker of high-grade IEN and CRC, and may thus be applied for prognostic stratification. The identification of cellular MMP-13 sources offers a basis for targeted therapeutic modulation in CRC.

## 9 Literaturverzeichnis

Adachi, Y.; Yamamoto, H.; Itoh, F.; Hinoda, Y.; Okada, Y.; Imai, K.: Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 45 (2), 1999. S. 252–258.

Aizer, Ayal A.; D'Amico, Anthony V.: Should all colorectal cancer patients over age 60 be screened for prostate cancer? *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 27 (10), 2013. S. 1032–1038.

Allison, J. E.; Tekawa, I. S.; Ransom, L. J.; Adrain, A. L.: A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine* 334 (3), 1996. S. 155–159.

Allred, D. C.: Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, 2010. S.52-59.

Arpino, V.; Brock, M.; Gill, S. E.: The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46, 2015. S. 247–254.

Baretton, G. B.; Tannapfel, A.; Schmitt, W.: Standardisierte und strukturierte histopathologische Befundung kolorektaler Polypen: Eine Checkliste für die Praxis vor dem Hintergrund der neuen WHO-Klassifikation. *Der Pathologe* 32 (4), 2011. S. 289–296.

Bigg, H.: The inhibition of metalloproteinases as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Current Opinion in Pharmacology* 1 (3), 2001. S. 314–320.

Bokey, E. L.; Ojerskog, B.; Chapuis, P. H.; Dent, O. F.; Newland, R. C.; Sinclair, G.: Local recurrence after curative excision of the rectum for cancer without adjuvant therapy: role of total anatomical dissection. *The British journal of surgery* 86 (9), 1999. S. 1164–1170.

Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z.: Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (12), 2014. S. 786–801.

Brenner, H.; Altenhofen, L.; Hoffmeister, M.: Eight years of colonoscopic bowel cancer screening in Germany: initial findings and projections. *Deutsches Ärzteblatt international* 107 (43), 2010a. S. 753–759.

Brenner, H.; Hoffmeister, M.; Arndt, V.; Stegmaier, C.; Altenhofen, L.; Haug, U.: Protection from right- and left-sided colorectal neoplasms after colonoscopy: population-based study. *Journal of the National Cancer Institute* 102 (2), 2010b. S. 89–95.

Brenner, H.; Tao, S.: Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy. *European journal of cancer* 49 (14), 2013. S. 3049–3054.

Bretthauer, M.; Kaminski, M. F.; Loberg, M.; Zauber, A. G.; Regula, J.; Kuipers, E. J.; Hernan, M. A.; McFadden, E.; Sunde, A.; Kalager, M.; Dekker, E.; Lansdorp-Vogelaar, I.; Garborg, K.; Rupinski, M.; Spaander, M. C. W.; Bugajski, M.; Hoie, O.; Stefansson, T.; Hoff, G.; Adami, H.-O.: Population-Based Colonoscopy Screening for Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA internal medicine* 176 (7), 2016. S. 894–902.

- Brew, K.; Nagase, H.: The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta* 1803 (1), 2010. S. 55–71.
- Buhrmann, C.; Kraehe, P.; Lueders, C.; Shayan, P.; Goel, A.; Shakibaei, M.: Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: potential role of EMT. *PloS one* 9 (9), 2014. e107514.
- Bullock, A. N.; Fersht, A. R.: Rescuing the function of mutant p53. *Nature reviews. Cancer* 1 (1), 2001:S. 68–76.
- Burns, J.: Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry* 43 (3), 1975. S. 291–294.
- Cathcart, J.; Pulkoski-Gross, A.; Cao, J: Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes & Diseases* 2 ( 1), 2015:S. 26–34.
- Cawston, T. E.: Measurement of activity of collagenolytic MMP and inhibitors of MMPs using radiolabeled collagen substrate. *Nature protocols* 4 (3), 2009. S. 286–290.
- Chen, C.G.; Thuillier, D.; Chin, E.N.; Alliston, T.: Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 64 (10), 2012. S. 3278–3289.
- Chen, X.; Cho, D.-B.; Yang, P.-C.: Double staining immunohistochemistry. *North American journal of medical sciences* 2 (5), 2010. S. 241–245.
- Chlebowski, R. T.; Wactawski-Wende, J.; Ritenbaugh, C.; Hubbell, F. A.; Ascensao, J.; Rodabough, R. J.; Rosenberg, C. A.; Taylor, V. M.; Harris, R.; Chen, C.; Adams-Campbell, L. L.; White, E.: Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* 350 (10), 2004. S. 991–1004.
- Coussens, L. M.; Fingleton, B.; Matrisian, L. M.: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science (New York, N.Y.)* 295 (5564), 2002. S. 2387–2392.
- Creemers, L. B.; Jansen, I. D.; Docherty, A. J.; Reynolds, J. J.; Beertsen, W.; Everts, V.: Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 17 (1), 1998. S. 35–46.
- Curran, S.; Dundas, Sinclair R.; Buxton, Jenny; Leeman, Matthew F.; Ramsay, Robin; Murray, Graeme I.: Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (24), 2004. S. 8229–8234.
- Duffy, M. J.: Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 47 (4), 2001. S. 624–630.
- Egeblad, M.; Werb, Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2 (3), 2002. S. 161–174.

- el-IPH: Kolorektales Adenom, Lehrtexte Spezielle Pathologie, 2015. Online verfügbar unter [https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte\\_s/705/kolorektales-adenome](https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/705/kolorektales-adenome), zuletzt aktualisiert am 06.07.2015, zuletzt geprüft am 13.06.2017.
- Fang, Y. J.; Lu, Z. H.; Wang, G. Q.; Pan, Z. Z.; Zhou, Z. W.; Yun, J. P.; Yun, J. P.; Zhang, M. F.; Wan, D. S.: Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *International journal of colorectal disease* 24 (8), 2009. S. 875–884.
- Fedchenko, N.; Reifenrath, J.: Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagnostic pathology* 9, 2014. S. 221.
- Fitzgibbons, P. L.; Dillon, D. A.; Alsabeh, R.; Berman, M. A.; Hayes, D. F.; Hicks, D. G.; Hughes, K. S.; Nofech-Mozes, S.: Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine* 138 (5), 2014. S. 595–601.
- Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M.: The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123 (Pt 24), 2010. S. 4195–4200.
- Freije, J. M.; Diez-Itza, I.; Balbin, M.; Sanchez, L. M.; Blasco, R.; Tolivia, J.; Lopez-Otin, C.: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269 (24), 1994. S. 16766–16773.
- Fu, Z.; Shrubsole, M. J.; Smalley, W. E.; Wu, H.; Chen, Z.; Shyr, Y.; Ness, R. M.; Zheng, W.: Association of meat intake and meat-derived mutagen exposure with the risk of colorectal polyps by histologic type. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 4 (10), 2011. S. 1686–1697.
- Gallagher, S.; Winston, S. E.; Fuller, S. A.; Hurrell, J. G. R.: Immunoblotting and immunodetection. *Current protocols in cell biology* Chapter 6, 2011. Unit 6.2.
- Galon, J.; Costes, A.; Sanchez-Cabo, F.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Lagorce-Pagès, C.; Tosolini, M.; Camus, M.; Berger, A.; Wind, P.; Zinzindohoué, F.; Bruneval, P.; Cugnenc, P.-H.; Trajanoski, Z.; Fridman, W.-H.; Pagès, F.: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795), 2006. S. 1960–1964.
- Gialeli, C.; Theocharis, A. D.; Karamanos, N. K.: Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* 278 (1), 2011. S. 16–27.
- Giannandrea, M.; Parks, W.C.: Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms* 7 (2), 2014. S. 193–203.
- Gregor, D. H.: Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer. *Cancer* 28 (1), 1971. S. 131–134.
- Gross, J.; Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian Tissues. A Tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48 (6), 1962. S. 1014–1022.
- Grundmann, R. T.; Meyer, F.: Geschlechtsspezifische Einflüsse auf Inzidenz, Screening, Behandlung und Ergebnis des kolorektalen Karzinoms. *Zentralblatt für Chirurgie* 138 (4), 2013. S. 434–441.
- Haggar, F. A.; Boushey, R. P.: Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery* 22 (4), 2009. S. 191–197.

- Hannas, A. R.; Pereira, J. C.; Granjeiro, J. M.; Tjäderhane, L.: The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta odontologica Scandinavica* 65 (1), 2007.S. 1–13.
- Hattori, Y.; Nerusu, K.C.; Bhagavathula, N.; Brennan, M.; Hattori, N.; Murphy, H.S.; Su, L. D.; Wang, T. S.; Johnson, T. M.; Varani, J.: Vascular expression of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in basal cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology* 74 (3), 2003. S. 230–237.
- Hedderich, J.; Sachs, L. 2015: Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R. 15., überarb. u. erweiterte Aufl. Berlin: Springer Spektrum.S.180-186,604-607
- Hironaka, K.; Sakaida, I.; Matsumura, Y.; Kaino, S.; Miyamoto, K.; Okita, K.: Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications* 267 (1), 2000. S. 290–295.
- Hoesel, B.; Schmid, J. A.: The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer* 12, 2013. S. 86.
- Holinski-Feder E, Morak M: Hyperplastische Polypen, sessile serratierte Adenome, konventionelle Adenome: Molekulare Pathways und deren klinische Relevanz. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 8 (2), 2010, S.18-25.
- Illman, S. A.; Lohi, J.; Keski-Oja, J: Epilysin (MMP-28) - structure, expression and potential functions. *Experimental Dermatology* 17 (11), 2008. S. 897–907.
- Jass, J. R.: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50 (1), 2007. S. 113–130.
- Kalluri, R.: The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 16 (9), 2016. S. 582–598.
- Kalluri, R.; Zeisberg, M.: Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 6 (5), 2006. S. 392–401.
- Kanas, G. P.; Taylor, A.; Primrose, J. N.; Langeberg, W. J.; Kelsh, M- A.; Mowat, F. S; Alexander, D. D.; Choti, M. A.; Poston, G.: Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clinical epidemiology* 4, 2012.S. 283–301.
- Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z.: Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141 (1), 2010. S. 52–67.
- Knauper, V.; Will, H.; Lopez-Otin, C.; Smith, B.; Atkinson, S. J.; Stanton, H.; Hembry, R. M.; Murphy, G: Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 271 (29), 1996. S. 17124–17131.
- Konrad, G.; Katz, A.: Are medication restrictions before FOBT necessary?: practical advice based on a systematic review of the literature. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 58 (9), 2012. S. 939–948.
- Kudo, S.; Rubio, C. A.; Teixeira, C. R.; Kashida, H.; Kogure, E.: Pit pattern in colorectal neoplasia: endoscopic magnifying view. *Endoscopy* 33 (4), 2001. S. 367–373.
- Kudo, Y.; Iizuka, S.; Yoshida, M.; Tsunematsu, T.; Kondo, T.; Subarnbhesaj, A; Deraz, E. M.; Siriwardena, S. B. S. M.; Tahara, H.; Ishimaru, N.; Ogawa, I.;

Takata, T. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) directly and indirectly promotes tumor angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 287 (46), 2012. S. 38716–38728..

Langenskiöld, M.; Ivarsson, M.-L.; Holmdahl, L.; Falk, P.; Kabjorn-Gustafsson, C.; Angenete, E.: Intestinal mucosal MMP-1 - a prognostic factor in colon cancer. *Scandinavian journal of gastroenterology* 48 (5), 2013. S. 563–569.

Lee, G. H.; Malietzis, G.; Askari, A.; Bernardo, D.; Al-Hassi, H. O.; Clark, S. K.: Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? - a systematic review. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 41 (3), 2015. S. 300–308.

Leeman, M. F.; McKay, J. A.; Murray, G. I.: Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 55 (10), 2002a. S. 758–762.

Leeman, M. F.; Curran, S.; Murray, G. I.: The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37 (3), 2002b. S. 149–166.

Leung, W. K.; Lo, O. S. H.; Liu, K. S. H.; Tong, T.; But, D. Y. K.; Lam, F. Y. F.; Hsu, A. S. J.; Wong, S. Y.; Seto, W. K. W.; Hung, I. F. N.; Law, W. L.: Detection of colorectal adenoma by narrow band imaging (HQ190) vs. high-definition white light colonoscopy: a randomized controlled trial. *The American journal of gastroenterology* 109 (6), 2014. S. 855–863.

Li, C.-Y.; Yuan, P.; Lin, S.-S.; Song, C.-F.; Guan, W.-Y.; Yuan, L.; Lai, R.-B.; Gao, Y.; Wang, Y.: Matrix metalloproteinase 9 expression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (2), 2013. S. 735–741.

Ligi, D.; Mannello, F.: Do matrix metalloproteinases represent reliable circulating biomarkers in colorectal cancer? *British journal of cancer* 115 (6), 2016. S. 633–634.

Loberg, M.; Kalager, M.; Holme, O. Hoff, G.; Adami, H.-O.; Bretthauer, M.: Long-term colorectal-cancer mortality after adenoma removal. *The New England journal of medicine* 371 (9), 2014. S. 799–807.

Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).S. 62-65,736-737,

Lopez-Rivera, E.; Lizarbe, T. R.; Martinez-Moreno, M.; Lopez-Novoa, J. M.; Rodriguez-Barbero, A.; Rodrigo, J.; Fernandez, A. P.; Alvarez-Barrientos, A.; Lamas, S.; Zaragoza, C.: Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (10), 2005. S. 3685–3690.

Lubbers, H.; Mahlke, R.; Lankisch, P. G. ; Stolte, M.: Follow-up endoscopy in gastroenterology: when is it helpful? *Deutsches Arzteblatt international* 107 (3), 2010. S. 30–39.

Maass, N.; Schutz, F.; Fasching, P. A.; Fehm, T.; Janni, W.; Kummel, S.; Kolberg, H-C; Luftner, D.; Wallwiener, M.; Lux, M. P.: Breast Cancer Update 2014 - Focus on the Patient and the Tumour. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 75 (2), 2015. S. 170–182.

Mahmood, T.; Yang, P.-C.: Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 4 (9), 2012. S. 429–434.

Masaki, T.; Matsuoka, H.; Sugiyama, M.; Abe, N.; Goto, A.; Sakamoto, A.; Atomi, Y.: Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *British journal of cancer* 84 (10), 2001. S. 1317–1321.

Matsuyama, Y.; Takao, S.; Aikou, T.: Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *Journal of surgical oncology* 80 (2), 2002. S. 105–110.

McLoughlin, R. M.: Colorectal cancer screening. *WJG* 12 (42), 2006. S. 6747.

Mitchell, P. G.; Magna, H. A.; Reeves, L. M.; Lopresti-Morrow, L. L.; Yocum, S. A.; Rosner, P. J.; Geoghegan, K. F.; Hambor, J. E.: Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 97 (3), 1996. S. 761–768.

Mouw, J. K.; Ou, G.; Weaver, V. M.: Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (12), 2014. S. 771–785.

Munding, J.; Tannapfel, A.: Die Koloskopiefalle. Intervallkarzinome und übersehene Befunde – Neoplasien mit besonders aggressivem Wachstum. *Endosk heute* 22 (01), 2009. S. 22–29.

Munding, J.; Tannapfel, A.: Differenzierte Bewertung der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom. *Gastroenterologe* 8 (6), 2013. S. 495–503.

Murray, G. I.; Duncan, M. E.; O'Neil, P.; Melvin, W. T.; Fothergill, J. E.: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nature medicine* 2 (4), 1996. S. 461–462.

Nitsche, U.; Stögbauer, F.; Späth, C.; Haller, B.; Wilhelm, D.; Friess, H.; Bader, F. G.: Right Sided Colon Cancer as a Distinct Histopathological Subtype with Reduced Prognosis. *Digestive surgery* 33 (2), 2016. S. 157–163.

Onkologie, Leitlinienprogramm: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, zuletzt geprüft am 16.06.2017.

O'Sullivan, S.; Gilmer, J. F.; Medina, C.: Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: an update. *Mediators of inflammation*, 2015. S. 964131.

Overall, C. M.; Lopez-Otin, C.: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature reviews. Cancer* 2 (9), 2002. S. 657–672.

Papageorgis, P.; Cheng, K.; Ozturk, S.; Gong, Y.; Lambert, A.W.; Abdolmaleky, H. M.; Zhou, J.-R.; Thiagalingam, S.: Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer research* 71 (3), 2011. S. 998–1008.

Peipins, L. A.; Sandler, R. S.: Epidemiology of colorectal adenomas. *Epidemiologic reviews* 16 (2), 1994. S. 273–297.

Petersen, V. C.; Baxter, K. J.; Love, S. B.; Shepherd, N. A.: Identification of objective pathological prognostic determinants and models of prognosis in Dukes' B colon cancer. *Gut* 51 (1), 2002. S. 65–69.

- Rasanen, K.; Vaheri, A.: Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Experimental cell research* 316 (17), 2010. S. 2713–2722.
- Rath, T.; Roderfeld, M.; Graf, J.; Wagner, S.; Vehr, A.-K.; Dietrich, C.; Geier, A.; Roeb, E.: Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis* 12 (11), 2006, S. 1025–1035.
- Rath, T.; Roderfeld, M.; Halwe, J. M.; Tschuschner, A.; Roeb, E.; Graf, J.: Cellular sources of MMP-7, MMP-13 and MMP-28 in ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 45 (10), 2010:S. 1186–1196.
- Rath, T.; Stockle, J.; Roderfeld, M.; Tschuschner, A.; Graf, J.; Roeb, E.: Matrix metalloproteinase-13 is regulated by toll-like receptor-9 in colorectal cancer cells and mediates cellular migration. *Oncology letters* 2 (3), 2011: S. 483–488.
- Rath, T.; Tontini, G. E.; Nagel, A.; Vieth, M.; Zopf, S.; Gunther, C; Hoffman, A.; Neurath, M. F.; Neumann, H.: High-definition endoscopy with digital chromoendoscopy for histologic prediction of distal colorectal polyps. *BMC gastroenterology* 15, 2015. S. 145.
- Remmele, W.; Stegner, H. E.: Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe* 8 (3), 1987. S. 138–140.
- Robert-Koch-Institut: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. S.28–31.
- Roeb, E.; Dietrich, C. G.; Winograd, R.; Arndt, M.; Breuer, B.; Fass, J.; Schumpelick, V.; Matern, S.: Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 92 (10), 2001. S. 2680–2691.
- Roeb, E.; Matern, S.: Matrix-Metalloproteinasen und kolorektales Karzinom. *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* 98 (12), 2003. S. 763–770.
- Roy, H. K.; Bianchi, L. K.: Differences in colon adenomas and carcinomas among women and men: potential clinical implications. *JAMA* 302 (15), 2009. S. 1696–1697.
- Said, A. H.; Raufman, J.-P.; Xie, G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers* 6 (1), 2014:S. 366–375.
- Sakamoto, K.; Maeda, S.; Hikiba, Y.; Nakagawa, H.; Hayakawa, Y.; Shibata, W.; Yanai, A.; Ogura, K.; Omata, M.: Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (7), 2009. S. 2248–2258.
- Saltz, L. B.; Clarke, S.; Diaz-Rubio, E.; Scheithauer, W.; Figer, A.; Wong, R.; Koski, S.; Lichinitser, M.; Yang, T.-S.; Rivera, F.; Couture, F.; Sirzen, F.; Cassidy, J.: Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (12), 2008. S. 2013–2019.
- Santarelli, R. L.; Pierre, F.; Corpet, D. E.: Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 60 (2), 2008. S. 131–144.

- Sauer, Rolf 2003: Strahlentherapie und Onkologie. Mit 58 Tabellen. 4., überarb. Aufl. München, Jena: Urban und Fischer. S.395-399
- Schaffner, W.; Weissmann, C.: A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution.: *Analytical biochemistry* 56 (2), 1973. S. 502–514.
- Schmidt-Hansen, B.; Ornas, D.; Grigorian, M.; Klingelhofer, J.; Tulchinsky, E.; Lukanidin, E.; Ambartsumian, N.: Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 23 (32), 2004. S. 5487–5495.
- Schrödel, A.: Western-Blot Teil 1. Die Blotting-Technik. *Biol. Unserer Zeit* 40 (2), 2010. S. 78.
- Schwegmann, K.; Bettenworth, D.; Hermann, S.; Faust, A.; Poremba, C.; Foell, D., Schafers, M.; Domagk, D.; Lenz, P.: Detection of Early Murine Colorectal Cancer by MMP-2/-9-Guided Fluorescence Endoscopy. *Inflammatory bowel diseases* 22 (1), 2016. S. 82–91.
- Shi, M.; Yu, B.; Gao, H.; Mu, J.; Ji, C.: Matrix metalloproteinase 2 overexpression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Molecular biology reports* 40 (1), 2013. S.617–623.
- Shiozawa, J.; Ito, M.; Nakayama, T.; Nakashima, M.; Kohno, S.; Sekine, I.: Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 13 (9), 2000. S. 925–933.
- Stamenkovic, I.: Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 200 (4), 2003. S. 448–464.
- Strul, H.; Kariv, R.; Leshno, M.; Halak, A.; Jakubowicz, M.; Santo, M.; Umansky, M.; Shirin, H.; Degani, Y.; Revivo, M.; Halpern, Z.; Arber, N.: The prevalence rate and anatomic location of colorectal adenoma and cancer detected by colonoscopy in average-risk individuals aged 40-80 years. *The American journal of gastroenterology* 101 (2), 2006. S. 255–262.
- Sunami, E.; Tsuno, N.; Osada, T.; Saito, S.; Kitayama, J.; Tomozawa, S.; Tsuruo, T.; Shibata, Y.; Muto, T.; Nagawa, H.: MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The oncologist* 5 (2), 2000. S. 108–114.
- Tannapfel, A.; Aust, D.; Baretton, G. B.; Blaker, H.; Esposito, I.; Langner, C.; Vieth, M.; Wardelmann, E.; Kirchner, Th; Schirmacher, P.: Remove polyps and discard. Way or wrong way? *Der Pathologe* 36 (2), 2015. S. 182–185.
- Tannapfel, A.; Neid, M.; Aust, D.; Baretton, G.: The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Deutsches Ärzteblatt international* 107 (43), 2010. S. 760–766.
- Terzic, J.; Grivennikov, S.; Karin, E.; Karin, M.: Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138 (6), 2010. 2101-2114.e5.
- Tol, J.; Punt, C.J. A.: Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther* 32 (3), 2010. S. 437–453.
- Toll, A. D.; Fabius, D.; Hyslop, T.; Pequignot, E.; DiMarino, A. J.; Infantolino, A.; Palazzo, J. P.: Prognostic significance of high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 13 (4), 2011. S. 370–373.

- Toriseva, M.; Laato, M.; Carpen, O.; Ruohonen, S- T.; Savontaus, E.; Inada, M.; Krane, S. M.; Kahari, V.: MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS one* 7 (8), 2012. e42596.
- Uria, J. A.; Balbin, M.; Lopez, J. M.; Alvarez, J.; Vizoso, F.; Takigawa, M.; Lopez-Otin, C.: Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *The American journal of pathology* 153 (1), 1998. S. 91–101.
- Uria, J. A.; Stahle-Backdahl, M.; Seiki, M.; Fueyo, A.; Lopez-Otin, C.: Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer research* 57 (21), 1997. S. 4882–4888.
- Vaalamo, M.; Karjalainen-Lindsberg, M. L.; Puolakkainen, P.; Kere, J.; Saarialho-Kere, U.: Distinct expression profiles of stromelysin-2 (MMP-10), collagenase-3 (MMP-13), macrophage metalloelastase (MMP-12), and tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) in intestinal ulcerations. *The American journal of pathology* 152 (4), 1998. S. 1005–1014.
- van Cutsem, E.; Lang, I.; D'haens, G.; Moiseyenko, V.; Zaluski, J.; Folprecht, G.; Tejpar, S.; Kisker, O.; Stroh, C.; Rougier, P. : KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab. The CRYSTAL experience. *JCO* 26 (15\_suppl), 2008:S. 2.
- van der Geest, L. G. M.; Lam-Boer, J.; Koopman, M.; Verhoef, C.; Elferink, M. A. G.; Wilt, J. H. W.: Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clinical & experimental metastasis* 32 (5), 2015. S. 457–465.
- Vandenbroucke, R- E.; Libert, C.: Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature reviews. Drug discovery* 13 (12), 2014. S. 904–927.
- Vincenti, M. P.: The Matrix Metalloproteinase (MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Genes: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation, Signal Transduction and Cell-Type-Specific Expression. *Ian M. Clark (Hg.): Matrix metalloproteinase protocols, Bd. 151. Totowa, N.J.: Humana Press (Methods in molecular biology, 151), 2001. S. 121–148.*
- Visse, R.; Nagase, H.: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92 (8), 2003. S. 827–839.
- Vizoso, F. J.; Gonzalez, L. O.; Corte, M. D.; Corte, M. G.; Bongera, M.; Martinez, A.; Martin, A.; Andicoechea, A.; Gava, R. R. R.: Collagenase-3 (MMP-13) expression by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 41 (9), 2006. S. 1050–1055.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A. M.; Bos, J. L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 (9), 1988. S. 525–532.
- Walther, A.; Johnstone, E.; Swanton, C.; Midgley, R.; Tomlinson, I.; Kerr, D.: Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer* 9 (7), 2009. S. 489–499.
- Watanabe, N.; Ikeda, U.: Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* 6 (2), 2004. S. 112–120.

- Weis, S. M.; Cheresch, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine* 17 (11), 2011: S. 1359–1370.
- Wernicke, D.; Schulze-Westhoff, C.; Brauer, R.; Petrow, P.; Zacher, J.; Gay, S.; Gromnica-Ihle, E.: Stimulation of collagenase 3 expression in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis by contact with a three-dimensional collagen matrix or with normal cartilage when coimplanted in NOD/SCID mice. *Arthritis and rheumatism* 46 (1), 2002. S.64–74.
- West, N. R.; McCuaig, S.; Franchini, F.; Powrie, F.: Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature reviews. Immunology* 15 (10), 2015. S. 615–629.
- Xue, Q.; Cao, L.; Chen, X.-Y.; Zhao, J.; Gao, L. Li, S.-Z.; Fei, Z.: High expression of MMP9 in glioma affects cell proliferation and is associated with patient survival rates. *Oncology letters* 13 (3), 2017. S. 1325–1330.
- Yahagi, M.; Okabayashi, K.; Hasegawa, H.; Tsuruta, M.; Kitagawa, Y.: The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 20 (3), 2016. S. 648–655.
- Yamada, T.; Oshima, T.; Yoshihara, K.; Tamura, S.; Kanazawa, A.; Inagaki, D.; Yamamoto, N.; Sato, T.; Fujii, S.; Numata, K.; Kunisaki, C.; Shiozawa, M.; Morinaga, S.; Akaike, M.; Rino, Y.; Tanaka, K.; Masuda, M.; Imada, T.: Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis. *Anticancer Res* 30 (7), 2010. S. 2693–2699.
- Yan, C.; Boyd, D. D.: Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology* 211 (1), 2007. S. 19–26.
- Yang, B.; Gao, J.; Rao, Z.; Shen, Q. Clinicopathological significance and prognostic value of MMP-13 expression in colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 72 (6), 2012. S. 501–505.
- Yang, K.; Popova, N. V.; Yang, W. C.; Lozonschi, I.; Tadesse, S.; Kent, S.; Bancroft, L.; Matise, I.; Cormier, R. T.; Scherer, S. J.; Edelmann, W.; Lipkin, M.; Augenlicht, L.; Velcich, A.: Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer research* 68 (18), 2008. S. 7313–7322.
- Yoshida, N.; Yagi, N.; Yanagisawa, A.; Naito, Y.: Image-enhanced endoscopy for diagnosis of colorectal tumors in view of endoscopic treatment. *World journal of gastrointestinal endoscopy* 4 (12), 2012. S. 545–555.
- Yu, W.-H.; Woessner, J. F.: Heparan Sulfate Proteoglycans as Extracellular Docking Molecules for Matrilysin (Matrix Metalloproteinase 7). *Journal of Biological Chemistry* 275 (6), 2000. S. 4183–4191.
- Zamarron, B. F.; Chen, W.J.: Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 7 (5), 2011- S. 651–658.
- Zhang, S.-C.; Kern, M.: The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *International journal of oral science* 1 (4), 2009. S. 163–176.
- Zhou, S.; Buckhaults, P.; Zawel, L.; Bunz, F.; Riggins, G.; Dai, J. L.; Kern, S. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.: Targeted deletion of Smad4 shows it is required for transforming growth factor beta and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5), 1998. S. 2412–2416.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überlebensrate KRK in Abhängigkeit des Stadiums	8
Abbildung 2: Darstellung HE-Färbung eines low-grade und high-grade Adenoms	11
Abbildung 3: Adenom-Karzinom-Sequenz	14
Abbildung 4: Rolle von MMP im Tumorgewebe	21
Abbildung 5: Darstellung der Struktur von MMP-13	26
Abbildung 6: Rolle von MMP-13 im Rahmen der MMP-Aktivierungskaskade	27
Abbildung 7: Kaplan-Meyer-Kurve von MMP-13-positiven KRK	29
Abbildung 8: Prinzip der Immunhistochemischen Färbung	35
Abbildung 9: IRS(Immunreaktiver Score) entspricht Anzahl der positiven Zellen x Farbintensität	38
Abbildung 10: Referenzaufnahmen Farbintensität	39
Abbildung 11: Prinzip Western Blot	42
Abbildung 12: Ansteigende Expression von MMP-13 in der kolorektalen Adenom-Karzinom-Sequenz	50
Abbildung 13: High-grade Areal in gesundem Gewebe	51
Abbildung 14: IRS von MMP-13 in Abhängigkeit vom Dyplasiegrade des Gewebes	52
Abbildung 15: ROC-Kurve	53
Abbildung 16: Erfolgreiche Doppelfärbung	55
Abbildung 17: Negative Doppelfärbungen	55
Abbildung 18: Western Blot	56
Abbildung 19: MMP-13 in der Adenom-Karzinom-Sequenz	68

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM- Klassifikation	7
Tabelle 2:	UICC Stadien	8
Tabelle 3:	Unterschiede zwischen klassischen und serratierten Adenomen	12
Tabelle 4:	Empfehlungen zur Nachsorge nach koloskopischer Polypektomie	17
Tabelle 5:	Matrix-Metalloproteinasen, Übersicht, Nomenklatur und typische Substrate	19
Tabelle 6:	Übersicht über klinisch getestete MMP-Inhibitoren	24
Tabelle 7:	Rolle von MMP und TIMP im KRK	25
Tabelle 8:	Verwendete Geräte	30
Tabelle 9:	Verwendete Verbrauchsgegenstände	31
Tabelle 10:	Verwendete Chemikalien	33
Tabelle 11:	Kommerzielle Kits	33
Tabelle 12:	Verwendete Antikörper	34
Tabelle 13:	Lösungen IHC	37
Tabelle 14:	Verwendete Lösungen zur Proteinbestimmung	41
Tabelle 15:	Verwendete Lösungen Proteinseparation	44
Tabelle 16:	Verwendete Lösungen Proteintransfer	44
Tabelle 17:	Verwendete Lösungen zur Proteindetektion	46
Tabelle 18:	Verwendete Lösungen für den Strippingpuffer	47
Tabelle 19:	Demographische und klinische Daten der Kohorte, n=105	49

## 12 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>AP</b>	Adenomatöse Polypen
<b>APC</b>	Adenomatosis polyposis coli
<b>APS</b>	Ammoniumperoxidisulfat
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>AUC</b>	Area Under the Curve
<b>β-FGF</b>	Basic fibroblast growth factor
<b>BRAF</b>	Rapidly accelerated fibrosarcoma Isoform B
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ca.</b>	Circa
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CEA</b>	Carcinoembryonales Antigen
<b>CIMP</b>	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp
<b>CK</b>	Cytokeratin
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>DCC</b>	Deleted in colorectal cancer
<b>dest.</b>	Destilliert
<b>d.h.</b>	Das heißt
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EGF</b>	Epithelial growth factor
<b>et al.</b>	Et alii
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>Fa.</b>	Firma
<b>FAP</b>	Familiäre adenomatöse Polyposis
<b>Fas</b>	Fas death factor
<b>FOLFOX</b>	FOL: Folinsäure, F: 5-Fluorouracil, OX: Oxaliplatin
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Hour = Stunde
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HGIN</b>	High-grade intraepitheliale Neoplasie

## Abkürzungsverzeichnis

<b>HNPCC</b>	Hereditäres nonpolypöses Kolonkarzinom
<b>HRP</b>	Horseradish-peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
<b>IEN</b>	Intraepitheliale Neoplasie
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IHC</b>	Immunhistochemische Färbung
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IRS</b>	Immunreaktiver Score
<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>K-ras</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>KRK</b>	Kolorektales Karzinom
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>l</b>	Liter
<b>LGIN</b>	Low-grade intraepithelial neoplasia
<b>mA</b>	Milliampere
<b>max.</b>	Maximal
<b>M</b>	Molar
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>M/F</b>	Männer/Frauen
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mmol</b>	Millimol
<b>MMP</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MSI</b>	Mikrosatelliteninstabilität
<b>MSS</b>	Mikrosatellitenstabilität
<b>MT-MMP</b>	Membrane-type matrix metalloproteinase
<b>NF-κB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>No.</b>	Number = Nummer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat-buffered saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor

## Abkürzungsverzeichnis

<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride transfer membrane
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
<b>RT-PCR</b>	Real-time polymerase chain reaction
<b>S</b>	Standardabweichung
<b>s.</b>	Siehe
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>sec</b>	Sekunde
<b>SMAD</b>	Small mothers against decapentaplegic
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered saline with Tween20
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinases
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TRIS</b>	Tris(Hydroxy)aminomethan
<b>U</b>	Units
<b>u.a.</b>	Unter anderem
<b>UICC</b>	Union international contre le cancer
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth Factor
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor
<b>XELOX</b>	Kombination aus Capecitabin, Oxaliplatin
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel

## 13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Elke Roeb, Leiterin des Schwerpunkts Gastroenterologie des Zentrums für Innere Medizin der JLU Gießen für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die exzellente Betreuung und ihr großes Engagement.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der AG Roeb und den beteiligten Mitarbeitern der Pathologie der JLU Gießen, die maßgeblich am Gelingen dieses Projekts beteiligt waren. Insbesondere gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld für die Betreuung, seine Hilfe und sein offenes Ohr. Ich danke Frau Annette Tschuschner, die mich mit den in der Arbeit verwendeten Methoden vertraut gemacht hat. Herrn Dr. rer. nat. Yuri Churin danke ich für seine Unterstützung und das Einbringen neuer Ideen! Frau Dr. med. Diana Sheridan aus dem Institut für Pathologie danke ich für die Zusammenarbeit und ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die Mikroskopie.

Besonderer Dank gilt auch meinem Mann Alexander, für seine moralische und technische Unterstützung und Ermunterung!

Ich danke meiner Mutter und meiner Schwester für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Auch meinen Mitdoktoranden Alica, Katrin, Fabian, Tilmann, Franziska und Nora danke ich für jede Hilfe und die schöne gemeinsame Zeit.