

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W.T. Knoefel –

Einfluss der Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 auf die EMT in kolorektalen
Adenomen und Karzinomen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Georg Erhard Wilhelm Flügen

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. N.H. Stoecklein
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. S. Wesselborg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

- 2012 **Kroepil F & Fluegen G**, Totikov Z, Baldus SE, Vay C, Schauer M Topp SA, Esch JS, Knoefel WT, Stoecklein NH: Down-regulation of CDH1 is associated with expression of SNAI1 in colorectal adenomas.
PLoS One. 2012;7(9):e46665. doi: 10.1371/journal.pone.0046665.
- 2013 **Kroepil F & Fluegen G**, Vallböhmer D, Baldus SE, Dizdar L, Raffel AM, Hafner D, Stoecklein NH, Knoefel WT: Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters.
BMC Cancer. 2013 Mar 22;13:145. doi: 10.1186/1471-2407-13-145.

Vorträge:

- 2008 Aydin F, Totikov Z, Baldus SE, **Flügen G**, Seidschner S, Rehders A, Eisenberger CF, Knoefel WT, Stoecklein NH: Die Rolle der E-Cadherin Transkriptionsregulatoren SIP 1, Twist, und Snail bei Adenomen des Kolons. *125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin*
- 2008 Aydin F, **Flügen G**, Baldus SE, Eisenberger CF, Seidschner S, Matthaei H, Knoefel WT, Stoecklein NH: Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT): Untersuchungen von E-Cadherin und seinen Transkriptionsfaktoren Twist und Snail bei kolorektalen Adenomen. *2. Gemeinsamen Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaften der Deutschen Gesellschaft für Viszeralchirurgie – Berlin*
- 2008 Aydin F, Knoefel WT, Totikov Z, Baldus SE, **Flügen G**, Seidschner S, Rehders A, Eisenberger CF, Stoecklein NH: E-cadherin and its

transcription regulators Twist and Snail in human colorectal adenomas. *The Society of Pelvic Surgeons, Cairns, Australia*

2009 Aydin F, **Flügen G**, Baldus SE, Eisenberger CF, Schmelzle M, Seidschner S, Matthaei H, Knoefel WT, Stoecklein NH: Die Rolle der E-Cadherin Transkriptionsregulatoren Snail, Twist und SIP-1 bei Adenomen des Kolons. 126. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München*

2010 **Flügen G**, Stoecklein NH, Baldus SE, Hafner D, Topp SA, Schmelzle M, Knoefel WT, Aydin F: Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT): Die Rolle der E-Cadherin Transkriptionsregulatoren Snail, Twist1 und Twist2 bei Adenomen und Karzinomen des Kolons. 127. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin*

Posterpräsentationen:

2008 Aydin F, Totikov Z, Baldus SE, **Flügen G**, Seidschner S, Rehders A, Eisenberger CF, Knoefel WT, Stoecklein NH: E-Cadherin and ist transcription regulators Twist and Snail in human colorectal adenomas. 12. *Chirurgische Forschungstage Freiburg*

2009 **Flügen G**, Topp SA, Luca A, Baldus SE, Dhayat S, Knoefel WT, Stoecklein NH, Aydin F: Einfluss von Snail auf die E-Cadherin Expression und die Initiierung der EMT in Colorektalen Karzinomen. 13. *Chirurgische Forschungstage München*

2010 **Flügen G**, Kröpil F, Baldus SE, Topp SA, Schmelzle M, Knoefel WT, Stoecklein NH: Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT): Die Rolle der E-Cadherin Transkriptionsregulatoren Snail, Twist1 und Twist2 bei Adenomen und Karzinomen des Kolons. *Erster Doktorandenkongress der Medical Research School Düsseldorf*

- 2010 **Flügen G**, Kröpil F, Baldus SE, Topp SA, Schmelzle M, Knoefel WT, Stoecklein NH: Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT): Die Rolle der E-Cadherin Transkriptionsregulatoren Snail, Twist1 und Twist2 bei Adenomen und Karzinomen des Kolons. *Viszeralmedizin 2010 - 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie (DGAV), Stuttgart*
- 2012 **Flügen G**, Kroepil F, Stoecklein N H, Baldus S E, Dizdar L, Raffel A, Hafner D, Vallboehmer D, Knoefel W T: Die Snail1 Expression zeigt keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben beim kolorektalen Karzinom. *179. Jahrestagung Vereinigung Niederrheinisch-Westfälischer Chirurgen, Düsseldorf*
- 2013 **Flügen G**, Kroepil F, Stoecklein N H, Baldus S E, Dizdar L, Raffel A, Hafner D, Vallboehmer D, Knoefel W T: Die Snail1 Expression zeigt keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben beim kolorektalen Karzinom. *130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München*

Zusammenfassung

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) ist ein entwicklungsgeschichtlich stark erhaltenes Zellprogramm, durch das sessile epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften, wie Motilität und Invasivität erlangen. Die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 werden nicht nur mit der EMT, sondern auch mit dem damit häufig verbundenen Verlust von E-Cadherin, einem epithelialen Zelladhäsionsmolekül, in Verbindung gebracht.

Diese Arbeit geht der Frage nach, ob diese Transkriptionsfaktoren schon in kolorektalen Adenomen nachweisbar sind, und ob ein hemmender Einfluss auf die E-Cadherin Expression in kolorektalen Adenomen oder kolorektalen Karzinomen nachweisbar ist. Dazu wurden 41 kolorektale Adenome und 251 kolorektale Karzinome (CRC) untersucht.

Mit Hilfe einer qRT-PCR (quantitativen real-time PCR) wurden die Adenome auf ihren Gehalt an SNAI1/Snail1, TWIST1/Twist1, CDH1/E-Cadherin und CDH2/N-Cadherin mRNA (Transkriptionsebene) untersucht. Außerdem wurde eine immunhistochemische Färbung (IHC) derselben Adenome angefertigt, um die Expression der Proteine Snail1 und E-Cadherin zu untersuchen (Translationsebene). Mit Hilfe von Tissue Micro Arrays wurden die 251 CRC in einer immunhistochemischen Färbung auf die Expression von Snail1, E-Cadherin und Ki-67, einem Proliferationsmarker, untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit den erhobenen Überlebensdaten korreliert.

In den Adenomen fand sich SNAI1 und CDH1 mRNA in mehr als der Hälfte der Proben. TWIST1 mRNA war nur in weniger als der Hälfte der Adenome nachweisbar. In der untersuchten kolorektalen Normalmukosa fand sich hingegen keine mRNA von SNAI1, TWIST1 oder CDH2. Ein signifikanter CDH1-Verlust in kolorektalen Adenomen im Vergleich zur Normalmukosa wurde festgestellt ($p=0,035$). Außerdem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Verlust von CDH1 mRNA und dem Vorhandensein von SNAI1 mRNA ($p=0,004$), sowie der Co-Expression von SNAI1 und TWIST1 mRNA ($p=0,003$) in kolorektalen Adenomen. Auch in der IHC bestätigte sich der Einfluss von Snail1 auf den Verlust von E-Cadherin in kolorektalen Adenomen.

In einem nächsten Schritt wurden die 251 CRC untersucht und es konnte kein Einfluss von Snail1 auf die Expression von E-Cadherin festgestellt werden. Zwischen Snail1 positiven und Ki-67 positiven CRC zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation ($p=0,001$). In der Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens zeigten die Faktoren Snail1, E-Cadherin und Ki-67 jedoch keinen signifikanten Einfluss.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass SNAI1/Snail1 schon in den Vorstufen maligner kolorektaler Tumore exprimiert wird und dort einen Einfluss auf den Verlust von CDH1/E-Cadherin zu haben scheint. Auch TWIST1 konnte schon in Adenomen nachgewiesen werden, hat aber offenbar keinen Einfluss auf die CDH1 Expression. Im Gegensatz zu den Adenomen zeigte sich in den CRC kein Einfluss von Snail1 auf den E-Cadherin Verlust. Es liegt die Vermutung nahe, dass der E-Cadherin Verlust in kolorektalen Karzinomen durch andere Signalwege (z.B. β -Cathenin/WNT-Signalweg) bedingt sein könnte. Die klinische Relevanz der festgestellten Expression von EMT-Initiatoren in benignen Vorläufern muss, ebenso wie deren Einfluss auf die maligne Progression dieser Läsionen, noch in prospektiven Studien weiter untersucht werden.

INHALTSVERZEICHNIS

	Zusammenfassung	I
	Inhaltsverzeichnis	II
1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1	Inzidenz, Prävalenz und Metastasierung	1
1.1.2	Adenom-Karzinom Sequenz	3
1.1.3	Stadieneinteilung nach UICC und TNM	4
1.1.4	Therapie des kolorektalen Karzinoms	5
1.2	Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)	7
1.2.1	Die EMT in der Entwicklung	7
1.2.2	EMT in der Tumorbiologie	8
1.3	Schlüsselproteine der EMT	10
1.3.1	E-Cadherin	10
1.3.2	N-Cadherin	11
1.3.3	Snail1	12
1.3.4	Twist1	13
1.4	Die EMT im kolorektalen Karzinom	15
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Reagenzien und Chemikalien	19
3.1.2	Geräte und Materialien	20
3.2	Patientenkollektiv	21
3.3	Die quantitative real-time PCR	24
3.3.1	Probengewinnung für die qRT PCR	24
3.3.2	RNA-Extraktion	25
3.3.3	cDNA Synthese	26

3.3.4	Durchführung der quantitativen real-time PCR	26
3.4	Immunhistochemische Färbungen	33
3.4.1	ABC-Methode	33
3.4.2	Auswertung der Färbungen	37
3.5	Statistische Auswertung	39
3.5.1	Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis Test	39
3.5.2	Spearman-Korrelation	40
3.5.3	Chi-Square Test	40
3.5.4	Kaplan-Meier und Log-Rank Test	40
3.5.5	Cox-Regression	41
3.5.6	Boxplots	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Adenome	42
4.1.1	Transkriptionsebene - qRT PCR	42
4.1.2	E-Cadherin Expression in Adenomen, Karzinomen und Normalmukosa	42
4.1.3	Korrelation von CDH1 mit SNAI1 und TWIST1	43
4.1.4	Einfluss der Co-Expression von SNAI1 und TWIST1	44
4.1.5	Korrelation von CDH1 und CDH2	45
4.1.6	Einfluss von SNAI1 und TWIST1 auf die CDH2 Expression	46
4.1.7	Translationsebene - Immunhistochemische Färbung	47
4.1.8	Korrelation der PCR Ergebnisse mit der Färbung	48
4.2	Kolorektale Karzinome	52
4.2.1	Immunhistochemie der Tissue Microarray's (TMA)	52
4.2.2	Korrelation von E-Cadherin mit Snail1	58
4.2.3	Korrelation von Snail1 mit Ki-67	59
4.2.4	Korrelation von E-Cadherin mit Ki-67	59
4.2.5	Einfluss histopathologischer Marker auf das Färbeverhalten	60
4.2.6	Rolle der Lokalisation	63
4.2.7	Überlebensanalysen	64
5	Diskussion	68

– Inhaltsverzeichnis –

6	Ausblick	79
7	Abkürzungsverzeichnis	81
8	Abbildungsverzeichnis	84
9	Tabellenverzeichnis	89
10	Literaturverzeichnis	91

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Inzidenz, Prävalenz und Metastasierung

Maligne Erkrankungen sind in den westlichen Industrieländern ein weit verbreitetes Phänomen. Da sie in der Regel eine Erkrankung des höheren Lebensalters sind, wird ihre Bedeutung in den kommenden Jahren und Jahrzehnten aufgrund der demographischen Entwicklung weiter zunehmen. Das kolorektale Karzinom (CRC) stellt dabei weltweit eine der häufigsten tumorbedingten Erkrankungen dar. Es ist für ca. 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr verantwortlich, davon ca. 104.000 in Westeuropa [1, 2]. Hier ist das kolorektale Karzinom mit einer Inzidenz von ca. 36 pro 100.000 Einwohner eine der häufigsten Krebserkrankungen [2]. Im Jahr 2002 wies es die vierthöchste Inzidenz bei Männern und die dritthöchste bei Frauen auf. Da die Prognose der Patienten – insbesondere in frühen Tumorstadien - jedoch relativ gut ist, weist es die zweithöchste Prävalenz (ca. 2,8 Millionen Erkrankte im Jahr 2002) auf und wird nur von der des Mammakarzinoms übertroffen. Das Lebenszeitrisiko eines Deutschen, an Darmkrebs zu erkranken, beträgt ca. 6%, das Risiko daran zu versterben, 2,5-3% [3]. Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland. Bei einem Durchschnittsalter von 65 Jahren bei Erstdiagnose [4] ist der Großteil der Patienten mit kolorektalem Karzinom über 50 Jahre alt. Mit einem Verhältnis von 1,2:1 haben Männer ein leicht erhöhtes Risiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken [2, 3].

Ein im Frühstadium diagnostiziertes CRC ist durch vollständige operative Entfernung des Primärtumors kurativ zu behandeln. Das Hauptproblem der betroffenen Patienten ist jedoch die Metastasierung. Durch unkontrolliertes Wachstum und Invasion abführender Lymph- oder Blutgefäße kommt es zur systemischen Disseminierung. Diese systemische Erkrankung ist letztlich die wichtigste krebsbedingte Todesursache und bis heute klinisch kaum heilbar [5]. Sie erfordert zusätzlich zur operativen Therapie verschiedene aufwendige

Therapiekonzepte (u.a. kombinierte Radio-Chemo-Therapie, Antikörpertherapie), die einen möglichen letalen Ausgang letztlich nicht immer verhindern können [6]. Die Metastasenbildung ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess [7]. Zunächst müssen epitheliale Tumorzellen die Fähigkeit erlangen, sich vom Zellverband zu lösen. Sie müssen mesenchymale Eigenschaften, wie Motilität und Invasivität, erlangen, aus dem Gewebe auswandern und schließlich durch Angio- und/oder Lymphinvasion in die systemische Zirkulation gelangen [8, 9]. Dazu benötigen Sie die Fähigkeit, am Endothel zu binden und die Endothelbarriere zu überwinden (Penetrationsfähigkeit). Falls sie im Blutkreislauf überleben, muss andernorts eine erneute Endotheladhäsion, gefolgt von der Extravasation, erfolgen. Schließlich müssen die Zellen unter neuen Gewebebedingungen proliferieren, um eine Makrometastase bilden zu können [10, 11]. Der wichtigste Schritt für Tumorzellen epithelialen Ursprungs ist dabei das Erlangen der mesenchymalen Eigenschaften Motilität und Invasivität. Dies geschieht offenbar über ein komplexes Zellprogramm namens Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT). Am Ort der Extravasation ermöglicht das Gegenstück, die Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET), die Bildung von Metastasen, die in ihrem Aufbau und Phänotyp dem Primärtumor entsprechen (**Abbildung 1**).

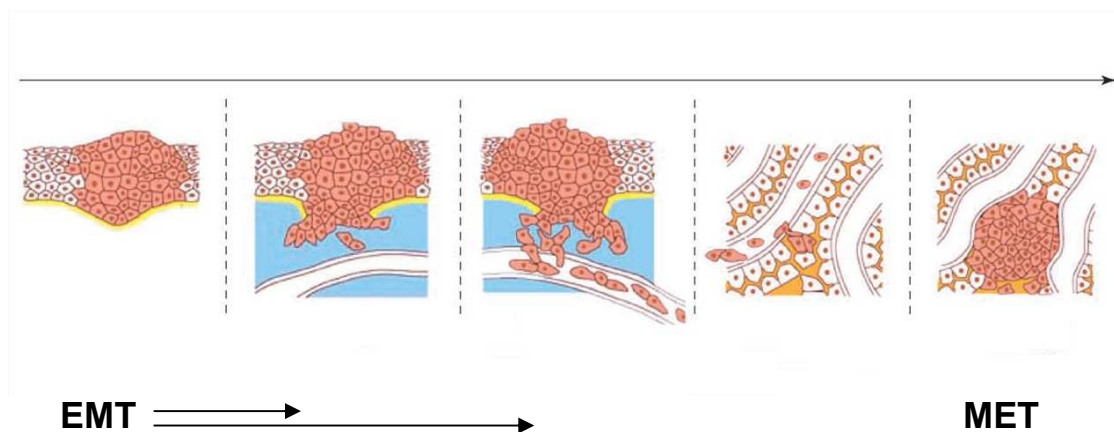


Abb. 1: Vorgang der Metastasierung. Rote Zellen entsprechen Tumorgewebe. Im Primärtumor (ganz links) durchlaufen Zellen die EMT. Dies ermöglicht die Invasion von umgebendem Gewebe (blau) und die Intravasation in abführende Blut- und Lymphgefäße. Am Ort der Extravasation können die Zellen eine MET durchlaufen und Makrometastasen (ganz rechts) bilden. Modifiziert nach Huber et al, 2005 [11].

1.1.2 Adenom-Karzinom Sequenz

Adenome sind benigne Tumore des Darmes, welche jedoch ein erhöhtes Malignitätsrisiko aufweisen. Aus diesen benignen, hyperplastischen Schleimhautwucherungen können maligne und invasive kolorektale Karzinome entstehen. Die frühzeitige Erkennung und Entfernung dieser Präkanzerosen ist von entscheidender Bedeutung für die Prävention, da die potenzielle Progredienz zum malignen Tumor nur so aufgehalten werden kann [12, 13]. Die aufwendige, sehr teure und langjährige Therapie eines Tumors und einer systemischen Metastasierung können durch diese Präventivmassnahmen verhindert werden.

Das 1990 von Fearon und Vogelstein [14] erweiterte Modell der Adenom-Karzinom Sequenz spielt auch in der heutigen Forschung noch eine wichtige Rolle. Das Modell basiert auf der Feststellung, dass das Risiko für ein Karzinom bei Patienten mit bekannten Adenomen um ein Vielfaches erhöht ist. Die Gruppe um Vogelstein konnte zeigen, dass eine Reihe von Mutationen, die in einem Großteil der kolorektalen Adenome vorkommen, zur Hemmung der Apoptose und ungehemmter Proliferation führen. Dies ermöglicht den Zellen das Erlangen vieler weiterer Mutationen, die zur malignen Entartung führen. Die Hauptakteure im Vogelstein Modell sind das APC-Protein, das ras-Protein, sowie die Proteine c-myc und p53 [14, 15]. Das APC-Protein spielt auch im gut erforschten Wnt-Signalweg [16] eine große Rolle, da es normalerweise das Protein β -Catenin abbaut. Wird der Abbau von β -Catenin durch einen Defekt des APC-Gens oder durch Wnt-Signalwirkung gehemmt, so kann es im Zellkern akkumulieren. Dort führt β -Catenin über die Induktion von verschiedenen proliferationsfördernden Genen, wie zum Beispiel dem MYC-Gen, zur unkontrollierten Zellteilung. Wenn noch weitere Mutationen hinzukommen, zum Beispiel im RAS-Gen, kann auf diese Weise aus hyperproliferierendem Epithel ein Adenom und schließlich daraus ein malignes Karzinom entstehen (**Abbildung 2**). Als Zeitspanne, die die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom benötigt, werden 5-15 Jahre angenommen. Dabei steigt das Risiko zur Entartung mit der Größe des Adenoms [14]. Die These nach Fearon und Vogelstein, die Mutationen fände immer in einer vorgegebenen Reihenfolge statt, wird heute kontrovers diskutiert [17]. Auf der Grundlage dieses Modells sind jedoch viele weitere Akteure der Karzinogenese entdeckt worden

[18], auch wenn noch Vieles in diesem komplizierten Netz verschiedener sich beeinflussender Signalwege unklar ist.

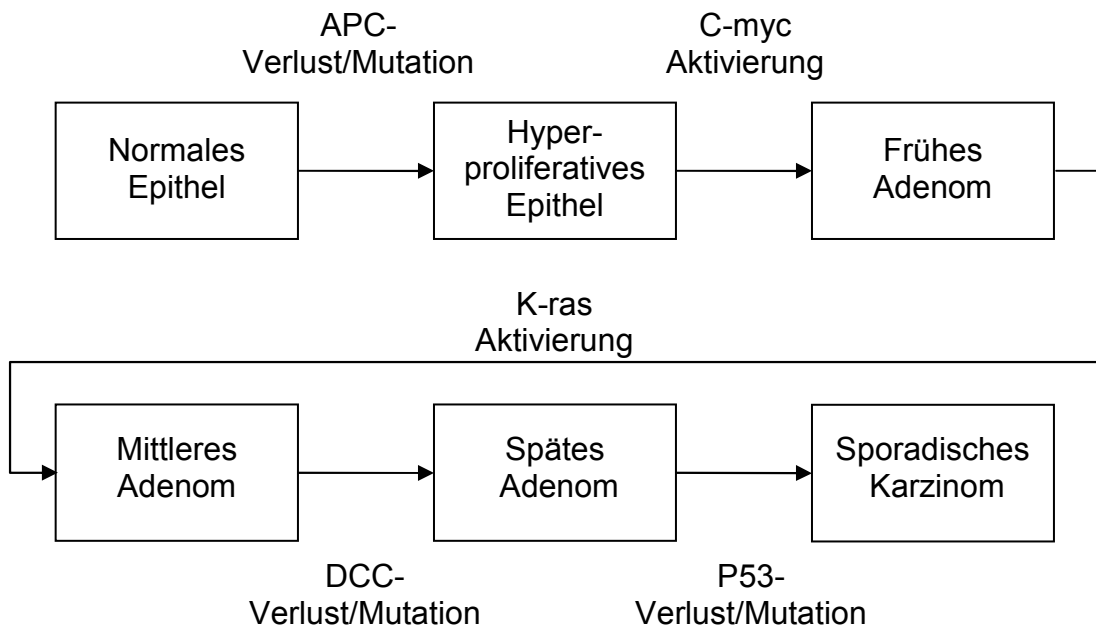


Abb. 2: Modell der Adenom-Karzinom Sequenz des kolorektalen Karzinoms.
Modifiziert nach Kullmann F, 2003 [19].

1.1.3 Stadieneinteilung nach UICC und TNM

Die TNM Klassifikation ermöglicht die Stadieneinteilung von kolorektalen Karzinomen. Dabei steht die T-Kategorie für die Eindringtiefe des Karzinoms in die Kolon- oder Rektumwand, oder dessen Einwachsen in benachbarte Organe. Die N-Kategorie bezieht sich auf das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen, wobei deren Anzahl für die Prognose entscheidend ist. Mit der M-Kategorie wird das Vorhandensein von Fernmetastasen kodiert. Ergänzend gibt das Grading (G) den Differenzierungsgrad der Tumorzellen an. Das TNM-System ist wichtig für die Abschätzung der Prognose sowie die Therapieplanung. Die Operabilität, die Indikation für eine Chemotherapie oder der Zugang zu Studien hängen vom TNM-Status ab. Auf Grund der einheitlichen Kodierung ist auch ein internationaler Vergleich möglich [20, 21] (**Tabelle 1**).

Nach den Vorgaben der *Union for International Cancer Control* (UICC) werden auf Grundlage des TNM-Systems klinische Stadien des kolorektalen Karzinoms

definiert. Diese UICC Stadien sollen die in der Klinik benutzte Duke's Klassifikation ablösen. Besonders wichtig ist die Unterscheidung zwischen Stadium II und Stadium III, da die Prognose und Therapie in hohem Maße vom Lymphknotenstatus abhängen [20, 22].

TNM-Klassifikation		UICC Stadium	Klassifikation nach Dukes
Tis	Carcinoma in situ	-	-
T1	Muscularis propria nicht befallen	I	A
T2	Muscularis propria befallen		
T3	Subserosa befallen	II	B
T4	Befall angrenzender Organe oder Penetration des viszeralen Peritoneum		
N1	1-3 regionäre Lymphknoten befallen	III	C
N2	>3 regionäre Lymphknoten befallen		
M1	Fernmetastasen	IV	D

Tabelle 1: Klassifikation nach TNM und Dukes, Stadien nach UICC, 7th Edition (2009).

1.1.4 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms besteht in einer möglichst kompletten Resektion (R0-Resektion) des Tumors, wobei das Resektionsausmaß maßgeblich von der Lymphdrainage des betroffenen Kolonbereichs abhängt. Die Lymphdrainage folgt dabei der arteriellen Versorgung, was zu einer Erweiterung des Resektionsausmaßes führen kann [21, 23] (**Tabelle 2**). Der Tumor wird mit dem entsprechenden Lymphabflussweg und eventuell invadierten Nachbarorganen *en-bloc* reseziert. Die Kontinuität des Darmes wird - wenn möglich - primär wieder hergestellt. Sollte dies, zum Beispiel bei tiefen Rektumkarzinomen oder bei Notfalloperationen, nicht möglich sein, so kann ein protektives oder ein endständiges Stoma angelegt werden. Bei Patienten mit

einzelnen Fernmetastasen können - bei strenger Indikationsstellung - diese ebenfalls mit reseziert werden. Auch bei kurativ nicht operablen, weil weit fortgeschrittenen, Tumoren ist eine Operationsindikation gegeben. Durch die, wenn auch nicht vollständige, operative Entfernung des Tumors (R1-Resektion) können Komplikationen wie Ileus, Blutungen mit Anämie und Schmerzen verhindert werden [24].

Zusätzlich zur kurativen Operation hat sich im Falle nodal-positiver Kolonkarzinome (UICC Stadium III) eine adjuvante Chemotherapie zur Verringerung der Rezidiv- und Metastasierungsrate als nützlich erwiesen [21]. Dabei sollen schon disseminierte Tumorzellen im ganzen Körper durch diese systemische Therapie abgetötet und damit die spätere Bildung von Metastasen verhindert werden. Bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom führt eine palliative Chemotherapie zu einer Verlängerung der Überlebenszeit [23]. Beim Rektumkarzinom kann schon im UICC Stadium II eine adjuvante Radio-Chemo-Therapie durchgeführt werden, da sie die ansonsten hohe Rate an lokalen Rezidiven verringert [25].

Momentan wird beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom eine neoadjuvante Radio-Chemo-Therapie empfohlen, da die Lokalrezidivrate verbessert und häufiger eine kontinenzerhaltende Operation ermöglicht wird [25, 26]. Ziel dabei ist ein so genanntes *down-staging*, also das Verringern der Tumormasse.

Neue Ansätze gibt es auch in der Immuntherapie, in der spezielle Antikörper gegen tumor-spezifische Strukturen eingesetzt werden. Diese sollen das Wachstum oder die Neoangiogenese der Tumore hemmen. Dabei konnten zum Beispiel mit Cetuximab, einem Antikörper gegen den EGF-Rezeptor [27], und Bevacizumab, einem Antikörper gegen VEGF [28], schon erste Erfolge erzielt werden. Es wird jedoch immer offensichtlicher, dass in Zukunft ein individueller Therapieansatz, gerichtet nach den im Einzelfall vorliegenden Mutationen, für die optimale Therapie ausschlaggebend sein wird. [29].

Tumorlokalisation	Regeloperation/ Kolonresektion	Lymphabfluss/ Arterielle Versorgung
Zökum und Colon ascendens	Hemikolektomie rechts	A. ileocolica A. colica dextra
Rechte Kolonflexur und prox. Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie rechts	A. ileocolica A. colica dextra A. colica media A. gastroepiploica dextra
Colon transversum	Transversumresektion	A. colica media
Linke Kolonflexur	Erweiterte Hemikolektomie links	A. colica media A. colica sinistra
Colon descendens und Proximales Sigma	Hemikolektomie links	A. colica sinistra
mittleres und distales Sigma	Sigmaresektion	A. mesenterica inferior

Tabelle 2: Resektionverfahren des Kolonkarzinoms in Abhängigkeit der Lokalisation.
Modifiziert nach *Duale Reihe Chirurgie, 3. Auflage, 2008.*

1.2 Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

1.2.1 Die EMT in der Entwicklung

In der Gastrulation und Organogenese müssen sich epitheliale Zellen aus ihrem Zellverband lösen und mesenchymale Gewebsschichten durchwandern, um Gewebe und Organe zu bilden. Dazu müssen die Zellen Mobilität und Invasivität, also die Eigenschaften zur Bewegung und zum Durchdringen und Zersetzen von extrazellulären Matrixbestandteilen, erlangen [30]. Die Zellen müssen die Zell-Zell-Verbindungen und die Zell-Matrix-Verbindungen, die den epithelialen Zellverband zusammenhalten, lösen. Die Polarität, die durch die Barrierefunktion des Epithels bedingt und die typisch für epitheliale Zellen ist, geht dabei verloren. Die Morphologie der Zellen ändert sich, sie werden Fibroblastenähnlich und bilden

Zellausläufer aus. Viele der dazu benötigten Proteine sind normalerweise nicht in epithelialen Zellen exprimiert, sondern typisch für mesenchymale Zellen [30]. Daher heißt das Zellprogramm, welches den epithelialen Zellen diesen Wechsel zu mesenchymalen Eigenschaften erlaubt, Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT). Nicht nur in der embryonalen Entwicklung wird dieses Zellprogramm physiologischerweise aktiviert, auch in der Wundheilung kommt es zum Einsatz. Damit die Zellen an ihrem Bestimmungsort wieder ein funktionierendes Epithel aufbauen können, müssen sie in der Lage sein, die Änderungen der EMT rückgängig zu machen. Dieser Vorgang, bei dem die phänotypisch mesenchymalen Zellen wieder epitheliale Eigenschaften erlangen, wird dementsprechend Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) genannt. Dieses Konzept der reversiblen Änderung des Phänotyps von epithelial zu mesenchymal und zurück wurde von Trelstad et al sowie Hay et al in der Gastrulation von Hühnerembryos erstmalig postuliert [31-33]. In den letzten 40 Jahren wurde dieses Zellprogramm weiter erforscht, da seine Schlüsselrolle nicht nur in der Embryologie, sondern auch in der Wundheilung und Tumorprogression, und neuerdings auch in der Stammzellenforschung, immer deutlicher wurde.

1.2.2 EMT in der Tumorbilogie

Der für die Progression von Karzinomen wichtigste Schritt, die Metastasierung, ist ein noch immer nicht vollkommen verstandener, sehr komplexer Vorgang. Dabei müssen ausdifferenzierte epitheliale Zellen, ähnlich wie ihre embryonalen Vorläufer, den Schritt von sessilen hin zu mobilen und invasiven Zellen vollbringen. In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass aggressive Tumorzellen im Vergleich zu weniger aggressiven Tumorzellen Änderungen im Expressionsprofil und im Phänotyp aufweisen, die einer EMT entsprechen [34-36]. Der erste Induktor einer EMT in vitro wurde in den 90er Jahren entdeckt und als *scatter factor* bezeichnet. Dieser Faktor, später als hepatocyte growth factor (HGF) identifiziert, führte bei epithelialen immortalisierten Zellen zu einer Änderung des Phänotyps und zur Auflösung des Zellverbands (engl. to scatter = auseinanderjagen) [34]. Viele weitere Wachstumsfaktoren wurden als Induktoren einer EMT identifiziert. Die Wachstumsfaktoren wirken dabei über Rezeptor-

Tyrosinkinassen (RTK) und ein ras genanntes G-Protein. Zellen die eine EMT durchlaufen hatten, zeigten eine Expression von verschiedenen, sonst nur in embryonalen Zellen vorkommenden Proteinen sowie den Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin. Die *in vitro* Einleitung einer EMT in weniger aggressiven Zelllinien führte zu einer Zunahme der Invasivität und einem Verlust von E-Cadherin. Auch zeigte sich *in vivo*, dass Tumore, die wenig E-Cadherin exprimieren, mit einer schlechteren Prognose und erhöhter Metastasierung assoziiert sind [37-39]. Die Erforschung der E-Cadherin Regulation führte zur Entdeckung weiterer EMT-Induktoren, viele davon Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine, wie zum Beispiel Snail1 und Twist1, sind entwicklungsbiologisch hoch konserviert und binden über verschiedene Mechanismen an E-Box-Motive auf dem Promotor des CDH1 Gens. So wird die Aktivität dieses Gen herab reguliert und weniger E-Cadherin gebildet (**Abbildung 3**).

Diese transkriptionellen Regulatoren der EMT lassen sich in humanen Tumoren und embryonalem Gewebe nachweisen, nicht jedoch im adulten Normalgewebe. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ihre Expression in Tumoren mit einer schlechten Prognose korrelieren kann [40, 41]. Durch die EMT erlangen die Tumorzellen offenbar mesenchymale Eigenschaften wie Mobilität und Invasivität. Diese ermöglichen ihnen die Ablösung vom Tumorzellverband und die Bildung von Metastasen im Organismus (**Abbildung 1**).

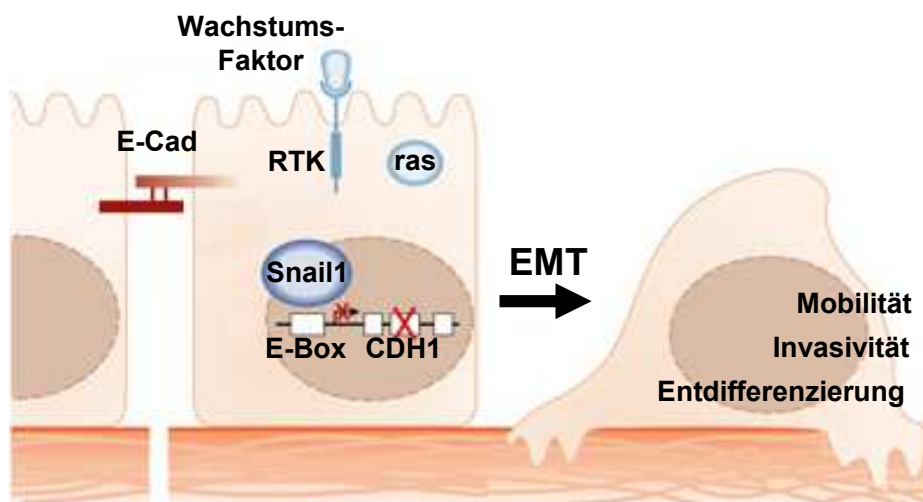


Abb. 3: Induktion der EMT. Verlust der epithelialen Polarität und der Expression von E-Cadherin (E-Cad) durch die EMT führt zu einem motilen, invasiven, fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Transkriptionsfaktoren wie Snail1 und Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, TGF β)

können diese EMT in Tumorzellen auslösen und zu einem E-Cadherin Verlust führen. Modifiziert nach Birchmeier W, 2005 [42].

1.3 Schlüsselproteine der EMT

1.3.1 E-Cadherin

Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist ein Molekül der Gruppe der Ca^{2+} -abhängigen Adhäsionsmoleküle (Cadherine vom engl. „calcium-dependent adhesion“). Das CDH1 Gen codiert dieses Protein. Es wird von allen epithelialen Zellen des Menschen exprimiert und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Mit Hilfe der extrazellulären Domäne bildet E-Cadherin normalerweise mit E-Cadherinen einen homodimeren Komplex. Selten sind jedoch auch heterodimere Komplexe mit anderen Cadherinen zu beobachten [43]. Über diese Adhäsionskomplexe werden die Zellen im Zellverband verankert. Das E-Cadherin ist im Inneren der Zelle über α - und β -Catenine, sowie p120 mit dem Aktinskelett verbunden (**Abbildung 4**).

Durch die Herabregulation von E-Cadherin in der EMT werden diese Adhäsionskomplexe abgebaut, was den Zellen das Lösen aus dem Zellverband ermöglicht. Außerdem ist die Auflösung dieser Komplexe mit der dadurch folgenden Freisetzung von β -Catenin, einem wichtigen Protein des proliferationsfördernden Wnt-Signalwegs, für die Tumorprogression von weiterer Bedeutung [44].

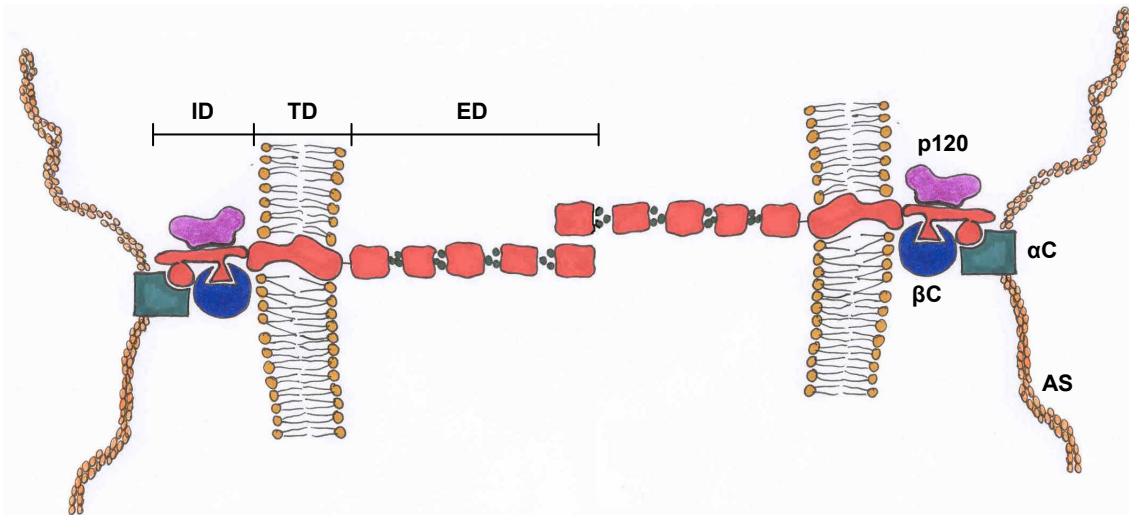


Abb. 4: Aufbau von E-Cadherin. Adhäsionskomplex zwischen zwei Zellen bestehend aus zwei E-Cadherin Molekülen (rot), je aus einer extrazellulären (ED), einer transmembranären (TD) und einer intrazellulären (ID) Domäne. Die ID ist über α - (α C) und β - Catenin (β C) sowie p120 mit dem Aktinskelett (AS) der Zelle verbunden. Modifiziert nach Pećina-Šlaus N, 2003 [44].

1.3.2 N-Cadherin

N-Cadherin gehört, wie das schon beschriebene E-Cadherin, zur Gruppe der Cadherine, die über ihre Extrazellulardomäne die Verbindung von Zellen ermöglicht. Das entsprechende Gen wird CDH2 genannt. N-Cadherin wird, im Gegensatz zu E-Cadherin, normalerweise nur in mesenchymalen Zellen, insbesondere in Nervenzellen (daher der Name) und in Muskelzellen, exprimiert. In der embryonalen Entwicklung führt die EMT zu einem so genannten Cadherin-Switch, also dem Wechsel von E- zu N-Cadherin. Auch in Tumoren kann dieser Wechsel der Zelladhäsionsmoleküle gefunden werden [45]. Die Expression von N-Cadherin scheint dabei den mobilen Tumorzellen die reversible Bindung an mesenchymale Zellen zu ermöglichen [30, 46]. Dies erleichtert die Invasion des umliegenden Gewebes.

1.3.3 Snail1

Im Menschen wurden zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie identifiziert, Snail1 (SNAI1-Gen) und Snail2 (auch Slug; SNAI2-Gen). Diese Proteine gehören zur Familie der Zink-Finger Proteine, die über zinkhaltige Schleifen an spezifische DNA-Abschnitte binden und so als Transkriptionsfaktor wirken können. In dieser Arbeit habe ich mich mit dem Vorkommen von Snail1 in kolorektalen Adenomen und Karzinomen beschäftigt.

Snail1 ist in der Gastrulation von Wirbeltieren nötig, damit die Zellen eine EMT durchlaufen können. Snail1 negative Mäuseembryos versterben während der Gastrulation, da die Zellen keine EMT durchlaufen, immobil bleiben und sich somit auch keine neuen Gewebe bilden können [47]. Das Snail1 Protein beinhaltet vier der Zink-Finger, die an spezifische E-Box-Motive in Promotor-Regionen auf der DNA binden. Dort wirken sie als transkriptionelle Repressoren. Die entsprechenden Gene werden somit nicht mehr abgelesen und die von ihnen kodierten Proteine nicht mehr exprimiert (**Abbildung 5**). Außerdem wurden eine *destruction box* [48] und ein nukleäres Export-Signal [49] im Snail1 Protein identifiziert. Die Phosphorylierung dieser beiden Regionen führt erst zur Entfernung von Snail1 aus dem Nukleus und damit zur funktionellen Inaktivierung, gefolgt von dessen Degradierung in Proteasomen des Zytoplasmas. Proteine, welche die Phosphorylierung und damit die zelluläre Lokalisation von Snail1 regulieren, sind die Kinasen GSK-3 β und Pak1 sowie der Zink-Transporter LIV1 [48-51].

Snail1 kann seine Funktion als transkriptioneller Repressor also nur wahrnehmen, wenn es im Nukleus lokalisiert ist. Dort führt es über die Unterdrückung der E-Cadherin Expression sowie vieler anderer für den epithelialen Phänotyp wichtigen Gene (u.a. Claudine, Integrine, Zytokeratine) zur Induktion einer EMT [52]. Snail1 konnte in verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen werden. Die Expression von Snail1 wurde wiederholt mit einer schlechten Prognose, aggressivem Wachstum und Metastasierung assoziiert [53, 54]. In verschiedenen Studien wurde eine inverse Korrelation zwischen der Snail1 und der E-Cadherin Expression festgestellt [52, 55, 56].

Neben der Funktion als EMT-Induktor greift Snail1 zudem in den Zellzyklus ein. Über eine Reduktion von Cyklin D2 führt Snail1 zum Zellzyklus-Arrest in der G1

Phase [57]. Gleichzeitig kann Snail1 die Expression von p53 über Bindung an dessen Promotor hemmen und so eine Apoptose verhindern [58]. Dies kann sowohl in der embryonalen Entwicklung, als auch in der Metastasierung zu einem Überlebensvorteil für Zellen führen, die eine EMT durchlaufen haben [59]. Die Apoptoseresistenz stellt ein großes Problem für die Krebstherapie dar, da viele Chemotherapeutika auf die Apoptoseeinleitung in Krebszellen abzielen.

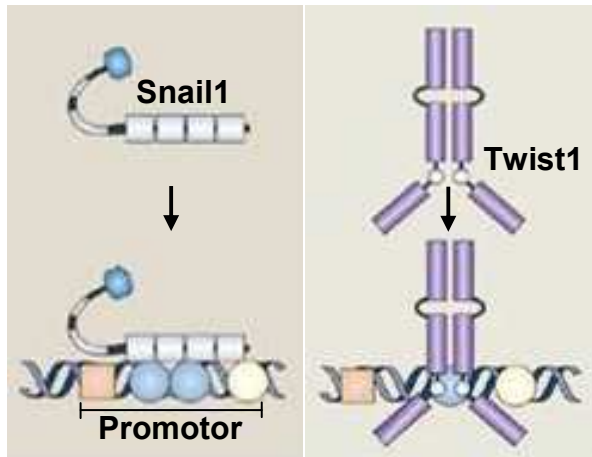


Abb. 5: Aufbau Snail1 und Twist1. Schematische Darstellung eines Snail1 Proteins (links) sowie eines Twist1 Homodimers (rechts) und der jeweiligen Bindung an E-Box-Motive (blau) in der Promotor-Region eines Gens. Modifiziert nach Peinado et al 2007 [59].

1.3.4 Twist1

Twist1 gehört zur Familie der basic-helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. bHLH-Proteine binden als Homo- oder Heterodimere über eine basic-domain genannte Bindungsstelle an die DNA und üben so ihre Funktion als transkriptioneller Aktivator oder Repressor aus (**Abbildung 5**). Im Menschen sind zwei Twist-Proteine, Twist1 und Twist2, bekannt. In dieser Arbeit habe ich mich nur mit der Expression von Twist1, codiert durch das TWIST1 Gen, in kolorektalen Adenomen beschäftigt.

Twist1 ist - wie Snail1 - schon in der Embryonalphase für die Gastrulation nötig, um eine EMT einzuleiten. Twist1 negative Mäuseembryos versterben am 11. Tag *post conceptionem*, da die Neuralleiste sich nicht regelhaft entwickelt und das Neuralrohr sich nicht schließen kann [60].

Die Expression von Twist1 führt zu einem Cadherin-Switch, also zur Expression von N-Cadherin und dem Verlust von E-Cadherin [61].

Über die genauen Steuerungsmechanismen von Twist1 ist noch relativ wenig bekannt, auch wenn einige Signalwege, wie der TGF β - und Notch-Signalweg,

Einfluss auf die Funktion von Twist1 zu haben scheinen. Die Homo- oder Heterodimerisierung sowie die DNA-Bindung von Twist1 wird über die Phosphorylierung bestimmter Sequenzen durch die Kinase p38 und MAPKAPK2 gesteuert. Durch Notch-abhängigen nukleären Export und die Phosphorylierung durch die Kinasen p42 und p44 wird Twist1 inaktiviert und im Zytoplasma abgebaut [59].

Die Expression von Twist1 ist mit einer verringerten E-Cadherin Expression assoziiert. Dabei ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht bekannt. Twist1 kann zwar an ähnliche E-Box-Regionen wie Snail1 binden, scheint aber eine sehr viel geringere Affinität zu diesen zu haben. Die Heterodimerisierung mit anderen helix-loop-helix Faktoren scheint die Wirkung von Twist1 zu beeinflussen. Durch die gewebespezifische Expression von Co-Faktoren in verschiedenen Geweben könnte Twist1 unterschiedliche Funktionen haben. Auch eine indirekte Beeinflussung der E-Cadherin Expression über die Twist1 assoziierte Aktivierung anderer Faktoren wie FoxC2, welches die Translokation von E-Cadherin ins Zytoplasma und dessen Abbau bewirkt, wurde postuliert [62]. In Zellkulturversuchen konnte Twist1 als Induktor der EMT identifiziert werden. Seine Funktion scheint besonders wichtig für die Intravasation und Metastasierung zu sein [41, 63].

Außer der Aktivierung der EMT beeinflusst Twist1 auch den Zellzyklus; durch die Herabregulation von p53 führt es zur Hemmung der Apoptose. Eine inaktivierende Twist1 Mutation wurde als Ursache des seltenen, autosomal dominanten Saethre-Chatzen Syndrom identifiziert [64]. Bei diesem Kraniosynosthose-Syndrom führt eine überschießende Apoptose in der Schädelentwicklung zur verfrühten Verknöcherung der Suturen und damit zur Fehlbildung des Schädels. Auch andere Knochen, wie die kleinen Hand- und Fußknochen, können betroffen sein (Syndaktylie). Diese Erkrankung unterstreicht die wichtige apoptosehemmende Wirkung von Twist1, die für mobile Zellen nach Durchlaufen der EMT einen Überlebensvorteil bedeutet. In Studien konnte dieser Apoptoseschutz durch Twist1 mit der Resistenz gegen mitosehemmende Chemotherapeutika in Verbindung gebracht werden [65, 66].

1.4 Die EMT im kolorektalen Karzinom

Der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin gilt in epithelialen Tumoren als das wichtigste Kennzeichen der EMT. Die Deregulation oder abnorme intrazelluläre Lokalisation dieses Zelladhäsionsmoleküls korreliert dabei mit der Entdifferenzierung, dem Verlust der Polarität, der Invasion und der Metastasierung [61, 67, 68]. Auch in kolorektalen Karzinomen korreliert die E-Cadherin Expression negativ mit dem Grading und der Metastasierung [38, 69]. Je weniger E-Cadherin ein kolorektales Karzinom exprimiert, desto entdifferenzierter sind die Tumorzellen und desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für Metastasen. Die Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom mit E-Cadherin Verlust war in Studien - verglichen mit E-Cadherin positiven Tumoren - signifikant schlechter [37-39, 69].

Der Verlust von E-Cadherin im kolorektalen Karzinom ist schon in verschiedenen Studien untersucht worden. Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die zu diesem Verlust führen können. Zu diesen Mechanismen gehört die Mutation des E-Cadherin Gens (CDH1) [70], die Mutation des β -Catenin Gens (CTNNB1) und damit die Aktivierung des Wnt-Signalwegs [71], die Promotor-Hypermethylierung [72] und die Aktivierung verschiedener transkriptioneller Repressoren, wie Snail1 und Twist1 [73].

Die Mutationsrate des CDH1 Gens in kolorektalen Karzinomen ist sehr gering [70], Efstathiou et al. konnten in kolorektalen Zelllinien nur in 7% inaktivierende Mutationen feststellen [74].

Beim kolorektalen Karzinom scheint die Beeinflussung von β -Catenin, einem Protein des Wnt-Signalwegs, eine Schlüsselrolle für die EMT zu spielen [75]. Die Interaktion der beiden membranassoziierten Proteine β -Catenin und E-Cadherin ist für den Aufbau epithelialer Zellverbände von großer Bedeutung. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zur Translokation des membrangebundenen β -Catenins in den Zellkern, wo es als Komplex mit verschiedenen DNA-Bindungsproteinen als Transkriptionsaktivator fungiert. Durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, darunter Snail1, führt der Wnt-Signalweg so zu einer EMT in kolorektalen Zelllinien [76]. Der direkte Einfluss von nukleärem β -Catenin auf die Induktion einer EMT konnte zunächst bei der Gastrulation des Seeigels, aber auch in humanen Zellsystemen nachgewiesen werden [76].

Auch die Promotor-Hypermethylierung konnte bei kolorektalen Karzinomen mit dem Verlust von E-Cadherin in Verbindung gebracht werden [72, 77]. Es zeigte sich jedoch bei Garinis et al [72] auch eine Methylierung des Promotors in normalem, tumornahem Kolongewebe.

In kolorektalen Zelllinien konnten die Faktoren Snail1 und Twist1 und ihr Einfluss auf die Herabregulation des Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin nachgewiesen werden [73, 78]. Snail1 ist ein für die Metastasierung wichtiger Transkriptionsfaktor, da es nicht nur eine EMT induziert und E-Cadherin unterdrückt, sondern direkt Signalwege für Proliferation und Motilität steuert. Unter anderem konnte der Einfluss auf die Expression von MMP-2, sowie auf p21, Cyclin D2 und CDK4 nachgewiesen werden [57, 79]. Snail1 kann so indirekt über die Hemmung pro-apoptotischer Enzyme die Zerstörung mutierter Zellen hemmen und zu einer malignen Entartung beitragen [57, 80]. In kolorektalen Karzinomen konnte eine Assoziation zwischen Snail1 Expression und Suppression von E-Cadherin beobachtet werden [81]. Eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Metastasen bei Snail1-positiven Tumoren konnten auch in verschiedenen anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden [59]. Cano et al zeigten, dass durch die Expression von Snail1 und den Verlust von E-Cadherin die Invasivität und Motilität von murinen und humanen Tumorzellen in vitro gesteigert werden konnte [78].

Die Arbeitsgruppe von Robert Weinberg konnte im Jahre 2004 an einem murinen Brustkrebsmodell erstmals die Bedeutung von Twist1 bei der Metastasierung aufzeigen [63]. Dabei fiel auf, dass Twist1 in hoch metastatischen Zelllinien herauf reguliert war. Die Inhibition von Twist1 durch RNAi führte bei den metastatischen Zelllinien zu einer extremen Reduktion der Tumorzell dissemination und Metastasierung. In normalen epithelialen Zellen führte eine Twist1-Überexpression nur zu subtilen Veränderungen bei Migration und Proliferation, es kam aber zur EMT dieser Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf einen wichtigen Einfluss von Twist1 in der Metastasierung und der Induktion einer EMT hin. Auch Twist1 nimmt - wie Snail1 - Einfluss auf Signalwege der Proliferation. So führt die Twist1 Expression in humanen Zelllinien zur Überwindung der Seneszenz durch Hemmung der p53 und Rb Proteine [82]. Die Seneszenz ist ein weiteres Sicherheitsprogramm der Zelle, welches bei Mutationen die Zellteilung verhindern kann. Twist1 ermöglicht so die Progression maligner Tumore.

Ob Snail1 und Twist1 auch einen Einfluss auf die Entartung benigner kolorektaler Vorläuferzellen haben, ist bislang allerdings nicht hinreichend untersucht worden.

2 Fragestellung

Die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 sind in ihrer Wirkung in verschiedenen humanen Tumoren schon erforscht worden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass diese Faktoren auch in kolorektalen Karzinomen einen Einfluss auf die Metastasierung und damit die Prognose haben könnten. Die Bedeutung dieser Faktoren in kolorektalen Karzinomen ist allerdings in der Literatur nicht hinlänglich geklärt. Besonders zwischen der Transkriptions- und Translationsebene gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Den größten Einfluss scheinen diese beiden Transkriptionsfaktoren auf den Verlust von E-Cadherin zu haben, welcher eng mit der EMT verbunden ist. Auch die Progression maligner Tumore scheint von Snail1 und Twist1 positiv beeinflusst zu werden. Daher stellte sich die Frage, ob diese Faktoren nicht schon früh in der Karzinomentstehung, vielleicht sogar schon in prä-malignen Stadien, für die Entstehung invasiver Karzinome eine Rolle spielen könnten.

Durch diese Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Werden die Transkriptionsfaktoren Snail1 und Twist1 schon in kolorektalen Adenomen exprimiert?
- Und wenn ja, zeigt sich dort bereits ein Einfluss auf den Verlust von E-Cadherin?
- Werden die beiden Faktoren auch in kolorektalen Karzinomen exprimiert?
- Gibt es auch dort einen Zusammenhang zwischen den Faktoren Snail1 und Twist1 und dem Verlust von E-Cadherin?
- Zeigt sich ein Einfluss auf die Proliferation der Tumore?
- Weisen die Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf das Outcome bei Patienten mit kolorektalem Karzinom auf?
- Könnten sie so als mögliche Prognosemarker Verwendung finden?
- Zeigt sich ein Unterschied auf Translations- und Transkriptionsebene, sowohl in Adenomen als auch in Karzinomen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

ABC-Kit (Vectastain, Mouse IgG: PK-4002, Rabbit-IgG: PK-4001)
AB-Serum (Biotest, 805135)
DAB + Chromogen (DAKO, K3468)
dNTPs, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche Diagnostics, 11581295001)
E-Cadherin-Antikörper (DAKO, M3612, NCH-38, mouse monoclonal)
E-Cadherin Primer und Sonde (Eurofins MWG)
Entellan[®] (Merck, 1.07961.0100)
Eosin G (Merck, 1.15935.0100)
Ethanol 100% (Merck, 1.00983.2511)
GAPDH Primer und Sonde (Eurofins MWG)
Glycerin 99% (Sigma, 5516)
H₂O₂ (Merck, 8597.1000.304)
Hämalaun nach Mayer (Merck, 1.09249.2500)
Hämatoxylin Lösung nach Gill III (Merck, 1.05174.1000)
Human Reference RNA (Stratagene, QPCR Human Reference Total RNA)
iQ[™] Supermix (50U/ml iTaq DNA Polymerase, 0,4mM dNTPs) (BioRad, #170-8862)
Isopropanol (2-Propanol, Merck, 1.09634.2511)
Ki-67-Antikörper (DAKO, M7240, MIB-1, mouse monoclonal)
Mouse IgG1 (MOPC-21, Sigma, M5284)
Nukleasefreies Wasser (Gibco, UltraPure[™] RNase/DNase free)
PBS (Gibco, 14190-169, pH 7,4)
Peroxidase (Vector laboratories, PK4001/PK4002)
Protector RNase Inhibitor 40U/μl (Roche Diagnostics, 03 335 402 001)
Rabbit Immunoglobulin Fraction (DAKO, X0903)

Random Hexamer Primer (Roche Diagnostics, 11 034 731 001)
Snail1-Antikörper (AbCam, ab17732, rabbit polyclonal)
Snail1 Primer und Sonde (Eurofins MWG)
Target Retrieval Solution, 10x (DAKO, S1699)
Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/μl (Roche Diagnostics, 03 531 317 001)
Transcriptor RT Reaction Buffer, 5x (250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH approx. 8.5, Roche)
TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, #15596-018)
Twist1 Primer und Sonde (Eurofins MWG)
Xylol (Merck, 1.08685.2500)

3.1.2 Geräte und Materialien

Cryoschneider (SLEEMainz, MHR-Controller, 22778)
Deckgläschen (Menzel-Glaser)
DyadDisciple Chromo 4 (BioRad)
Fettstift (DAKO)
Gefrierschrank (Thermo electron corporation, Forma 905)
Kamera (Leica, DFC 280, 49658)
Kanülen, steril (Braun, Sterican[®] Gr. 18, 26G x 1")
Mikroskop (Leica, DMIL, 49775)
Mikrotom (Leica, SM2000R, 50749)
Objektträger (Engelbrecht)
PCR-Folie (Roche, LightCycler[®] 480 Sealing Foil)
PCR-Platte (weiß) (BioRad, Microseal[®] PCR-Plates[™] white)
Photometer (Eppendorf, BioPhotometer)
Pipettenspitzen (Eppendorf VWR)
Plastikküvetten, DNA-, Protein-, RNase-frei (Eppendorf, UVette[®] 220-1660ml)
Plastikpipetten (International 631-0801)
SPSS Version 18 (SPSS Inc., Chicago, USA)
Thermoblock (StarLab, Dry Bath System, N4200-4002)
Thermomixer (Eppendorf, Thermomixer comfort, No 5355)
Vortexer (VELP.Scientifica, 2x³)

Wärmeschrank (Memmert, 38146)

Wasserbad (Färbung) (Memmert, 52636)

Wasserbad (Schnitte) (Leica, HI 1210, 50750)

Zentrifuge (Hettich, Universal 32R, Typ1610)

3.2 Patientenkollektiv

Das in der Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst 35 Patienten mit kolorektalem Adenom sowie 251 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität zugelassen (Aktenzeichen 3821).

Die Patienten mit kolorektalem Adenom unterzogen sich alle zwischen 2002 und 2007 einer Koloskopie in der Universitätsklinik Düsseldorf. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Adenome abgetragen und im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf paraffiniert und histopathologisch ausgewertet. Die Proben wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie zufällig ausgewählt. Das Kollektiv bestand aus 37% Frauen und 63% Männern, das Alter lag zwischen 41 und 97 Jahren, mit einem Median von 71 und einem mittleren Alter von 69 Jahren. Insgesamt wurden 41 Adenome abgetragen. Die Adenome waren in 29% als high grade und in 71% als low grade klassifiziert (**Tabelle 3**). Keiner der Patienten hatte bekannte Vorerkrankungen, die das Entstehen kolorektaler Adenome begünstigen (z.B. HNPCC, FAP). Zusätzlich wurde kolorektales Normalgewebe und kolorektales Karzinomgewebe gefärbt, welches ebenfalls aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf stammt.

Das Kollektiv der kolorektalen Karzinome umfasste Patienten, die zwischen Juli 1996 und Mai 2005 in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf eine Tumorsektion in kurativer Intention erfuhren. Die Proben wurden im Institut für Pathologie paraffiniert und histopathologisch ausgewertet und anhand dieser aus dem Archiv ausgewählt. Das Kollektiv bestand aus 41% (103/251) Frauen und 59% (148/251) Männern. Das Alter bei Operation lag zwischen 32 und 95 Jahren, mit einem Median von 70 und einem Mittelwert von 69 Jahren. Nur Patienten mit R0-Resektion und M0-Status zum Zeitpunkt der Operation wurden in die Studie eingeschlossen (**Tabelle 4**).

<u>Merkmal</u>	<u>Menge</u>	
	absolut	in Prozent
Geschlecht		
männlich	22	63
weiblich	13	37
Grading		
high grade	12	29
low grade	29	71
Histologie		
tubulär	27	66
tubulo-villös	14	34
Durchmesser		
Maximal	8,0 cm	
Minimal	0,2 cm	
Mittelwert	1,6 cm	

Tabelle 3: Charakteristika der 35 Adenom-Patienten mit insgesamt 41 Adenomen

<u>Merkmal</u>	<u>Patientenzahl</u>	
	absolut	in Prozent
Geschlecht		
männlich	148	59
weiblich	103	41
T-Kategorie		
I	8	3
II	64	25
III	153	61
IV	26	10
N-Kategorie		
0	146	58
I	64	25
II	41	16
G-Kategorie		
I	2	1
II	209	83
III	40	16
IV	0	0
UICC-Stadium		
I	62	25
II	84	33
III	105	42

Tabelle 4: Einteilung der TMA-Patienten nach pTNM- und UICC-Kriterien [83]

Aus den Proben dieses Kollektivs wurde schon vor dieser Arbeit im chirurgischen Forschungslabor der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie ein *Tissue Micro Array* (TMA) hergestellt. Diese Technik gestattet es, viele Proben von einem großen Kollektiv effizient und zeitsparend zu untersuchen [84]. Aus den Proben wurden mittels Hohlzylinder aus bestimmten Regionen ausgestanzt und in einen vorgestanzten Paraffinblock überführt, wobei jeweils Gewebeprobe von 20 Patienten auf einen TMA-Block verbracht wurden. Pro Patient wurden jeweils zwei Zylinder aus dem Tumorzentrum, zwei Zylinder aus der Invasionsfront und jeweils ein Zylinder aus der Normalmukosa und ggf. vorhandenen Lymphknotenmetastase entnommen. Durch die doppelte Entnahme aus dem Tumorzentrum und der Invasionsfront konnte die Heterogenität des Tumors berücksichtigt werden. Die Vollständigkeit war abhängig von dem Vorhandensein und der Aufbereitung des Gewebes nach der Operation. **Abbildung 6** zeigt die Aufsicht und den Aufbau eines TMA-Blocks.

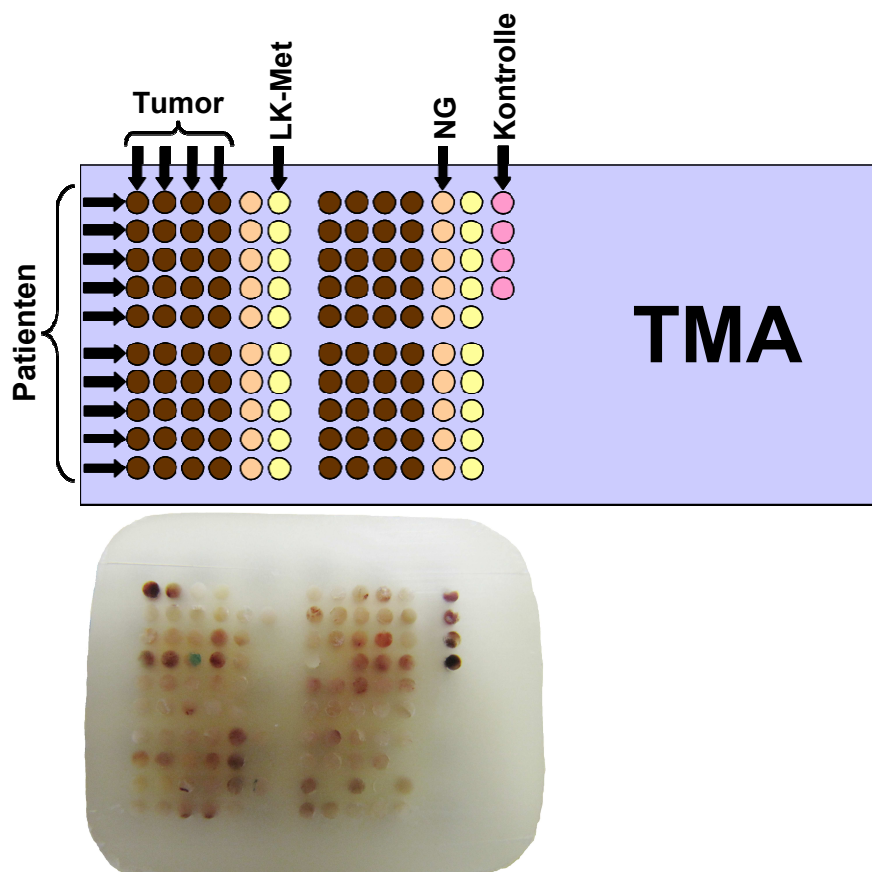


Abb. 6: Aufbau des TMA. Skizze: Jeweils zwei Patienten pro Zeile, insgesamt 20 Patienten pro TMA. Die ersten vier Spalten enthalten Tumorgewebe (je zwei vom Tumorzentrum, zwei aus der Invasionsfront), dann eine Stanze Normalgewebe (NG) und

eine Stanze Lymphknoten-Metastase (LK Met). Die Kontrolle besteht aus Milz- und Plazenta-Gewebe. Foto: Aufsicht auf einen TMA-Block.

3.3 Die quantitative real-time PCR

3.3.1 Probengewinnung für die qRT PCR

Zur Durchführung einer quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) musste zuerst die messenger RNA (mRNA) aus dem Probengewebe gewonnen werden. Diese wurde dann mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in homologe cDNA (complementary DNA) umgeschrieben, mit welcher die PCR Reaktion erst möglich ist.

Zur Gewinnung von mRNA wurde das Gewebe entparaffiniert. Dazu wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 10 Schnitte á 5µm von jedem paraffinierten Adenom gefertigt und auf Objektträger gezogen. Diese wurden für 30 min bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert, um die Schnitte sicher mit den Objektträgern zu verbinden. Zur Entparaffinierung wurden die Proben zwei Mal für fünf Minuten in Xylol verbracht, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe (je 30 sec 100%, 95% und 70% Alkohol) und dann 30 sec in Aqua Dest. gespült. Danach wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit Gill's Hämatoxylin gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Nach zweimaligem Spülen in Aqua Dest. (jeweils 15 sec) wurden die Schnitte in einer Lösung aus Aqua Dest. und Glycerin (3%) kurz aufgehoben.

Von jedem Adenom wurde ein Schnitt statt mit Gill's Hämatoxylin mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, mit Entellan eingedeckelt und die relevanten Areale wurden unter dem Mikroskop identifiziert und markiert.

Mit Hilfe dieser Markierung konnten nun die relevanten Adenomanteile der übrigen Schnitte mittels einer sterilen 26G Kanüle unter dem Mikroskop manuell mikrodissiziert werden.

3.3.2 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde das von neun Objekträgern gewonnene Material in 1000µl TRIzol Reagent gegeben. Das TRIzol schützt die RNA vor dem Abbau durch RNAsen, wobei es gleichzeitig zur Desintegration von Zellen und Zellbestandteilen beiträgt [85, 86]. Die Lösung wurde 15 Sekunden im Vortexer durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200µl Chloroform zugesetzt und erneut 15 Sekunden gevortext, gefolgt von nochmals 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde bei 4°C zentrifugiert (1000rpm), wobei sich eine obere, wässrige Phase absetzte. Diese wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Diese wässrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, erneut gevortext und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 4°C und 1200rpm zentrifugiert, dabei entstand ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde abgenommen und entsorgt, das Pellet mit 500 µl Ethanol 75% re-suspendiert und erneut für 5 Minuten bei 4°C und 1200rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand erneut vorsichtig abgenommen, bis das Pellet nicht mehr mit Ethanol bedeckt war. Das Pellet wurde im Reaktionsgefäß mit offenem Deckel bei 42°C in einen Thermoblock für ca. 10 Minuten getrocknet. Das trockene Pellet wurde mit 30µl nukleasefreiem Wasser für 10 Minuten bei 50°C im Thermomixer re-suspendiert.

Die Quantität und Qualität der RNA wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem UV-Spektrometer bestimmt. Dazu wurden 5µl der RNA-Lösung mit 95µl nukleasenfreiem Wasser verdünnt (1:20). Die Extinktion wurde in einer RNase-freien Plastikkuvette gegen destilliertes Wasser gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration kann aus der Extinktion bei 260nm (E260) mit folgender Formel errechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{E260} \times 40\text{ng/}\mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich über die Ermittlung des Quotienten E260/E280 beurteilen. Ein Quotient von über 1,9 entspricht reiner

RNA. Werte unter 1,6 weisen auf Proteinverunreinigungen hin. Nur Proben mit Werten von 1,6 und höher wurden verwendet.

3.3.3 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde auf Eis in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pro Probe folgender Mastermix zusammen pipettiert:

- 4,0 µL Transcriptor RT Reaction Buffer
- 0,5 µL Protector RNase Inhibitor 40 U/µL
- 2,0 µL dNTP-Mix, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- 2,0 µL Random Hexamer Primer (1:10 in H₂O, aus Original verdünnt)
- 0,5 µL Reverse Transkriptase 20 U/µl

Diesem Mastermix wurden 11 µl RNA-Lösung mit insgesamt maximal 2 µg RNA zugesetzt. Wenn die Konzentration der RNA-Lösung höher als 180 ng/µl war (und die Gesamtmenge in 11 µl somit höher als 2 µg), wurde diese mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die cDNA-Synthese-Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Primer anlegen konnten. Danach folgte der Syntheseschritt für 30 Minuten bei 55°C im Thermoblock. Zum Inaktivieren der Reversen Transkriptase wurde die Lösung für 5 Minuten auf 85°C erwärmt und danach erneut auf Eis gestellt. Die Proben wurden nach dem Abkühlen bei -20°C im Gefrierschrank gelagert, bis sie für die qRT-PCR gebraucht wurden.

3.3.4 Durchführung der quantitativen real-time PCR

In der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) wird die Menge der in der Probe vorhandenen spezifischen cDNA durch Fluoreszenz gemessen. Bei dieser Methode sind zwei Oligonukleotidprimer, die das zu amplifizierende cDNA-Fragment einrahmen, so angeordnet, dass die cDNA-Synthese zwischen ihnen verläuft. Die verwendeten Primer für GAPDH, E-Cadherin, Snail1, N-Cadherin und Twist1 entstammen der Literatur [56]. Alle Primer wurden mit Hilfe der Blast

Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf Intronüberspannung geprüft, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten. Als Fluorophor wird ein drittes Oligonukleotid, das an eine spezifische Sequenz zwischen den Primern auf der cDNA bindet, zugesetzt. An diese sogenannte TaqMan-Sonde sind zwei Moleküle gebunden, am 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein-phosphoramidit) und am 3'-Ende ein Unterdrücker (*quencher*) der Fluoreszenz (TAMRA, Rhodamin). Durch die enge räumliche Nähe auf der Sonde wird die Fluoreszenz des FAM durch TAMRA unterdrückt. Für die Sequenz der Primer und Sonden siehe **Tabelle 5**. Wenn die Polymerase in der Replikationsphase mit Hilfe ihrer 5'-3'-Exonuklease die Sonde in kleine Stücke zerteilt, lösen sich FAM und TAMRA voneinander und die messbare Fluoreszenz in der Probe nimmt proportional zu jeder Kopie des spezifischen cDNA-Fragments zu. Durch mehrfache Wiederholung von Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* (Primer- und Sondenbindung) und Replikation (Kettenverlängerung) steigt die Fluoreszenz langsam an. Wenn die *Templates* (cDNA Einzelstränge), die Primer und die Polymerase in optimalem Verhältnis zueinander stehen, so dass die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens nahezu 100% ist, wird eine Phase des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz erreicht. Der Zyklus (*Cycle*), bei dem die gemessene Fluoreszenzkurve in eine exponentielle Kurve übergeht und somit den gesetzten Grenzwert (*threshold*) überschreitet, wird als C_t -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet (**Abbildung 7**). Dieser Wert ist abhängig von der zu Anfang in der Probe enthaltenen Menge an Kopien der spezifischen cDNA. Somit kann über den C_t -Wert ein Rückschluss auf die Menge der cDNA-Kopien eines bestimmten Genproduktes in der Ausgangsprobe gezogen werden.

Sequenz

E-Cadherin

vorwärts 5' - GAA CAG CAC GTA CAC AGC CCT - 3'
rückwärts 5' - GCA GAA GTG TCC CTG TTC CAG - 3'
Sonde 5' - ATC ATA GCT ACA GAC AAT GGT TCT CCA GTT GCT - 3'

Snail1

vorwärts 5' - TGC AGG ACT CTA ATC CAG AGT TTA CC - 3'
rückwärts 5' - GTG GGA TGG CTG CCA GC - 3'
Sonde 5' - TCC AGC AGC CCT ACG ACC AGG CC - 3'

Twist1

vorwärts 5' - TGT CCG CGT CCC ACT AGC - 3'
rückwärts 5' - TGT CCA TTT TCT CCT TCT CTG GA - 3'
Sonde 5' - TCA GCA GGG CCG GAG ACC TAG ATG T - 3'

N-Cadherin

vorwärts 5' - GAC GGT TCG CCA TCC AGA C - 3'
rückwärts 5' - TCG ATT GGT TTG ACC ACG G - 3'
Sonde 5' - ACC CAA ACA GCA ACG ACG GGT TAG TC - 3'

GAPDH

vorwärts 5' - CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA - 3'
rückwärts 5' - GCC ATC ACG CCA CAG TTT C - 3'
Sonde 5' - CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC TCC - 3'

Tabelle 5: Primer- und SONDENSEQUENZEN nach Rosivatz et al [56, 61] für die qRT PCR.

Es wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Unter dem Abzug wurden pro Ansatz folgender Mastermix in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis zusammen pipettiert:

12,5 µl iQ™ Supermix (50 U/ml iTaq Polymerase und 0,4 mM je dNTP)

1,25 µl Primerkonzentrat (10 µM forward, 10 µM rearward, 4 µM Sonde)

In die Reaktionskammern einer 96-Well PCR-Platte (weiß) wurden jeweils 13,75 µl des Mastermix und 11,25 µl cDNA Lösung pipettiert und gut durchmischt. Als Negativ-Kontrolle wurden je Primerpaar und PCR zwei Reaktionskammern mit 11,25 µl nukleasefreiem Wasser statt cDNA Lösung gefüllt. Die Platte wurde mit Hilfe von PCR-Folie verschlossen, bei 1000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und in den DyadDisciple Chromo 4 eingesetzt.

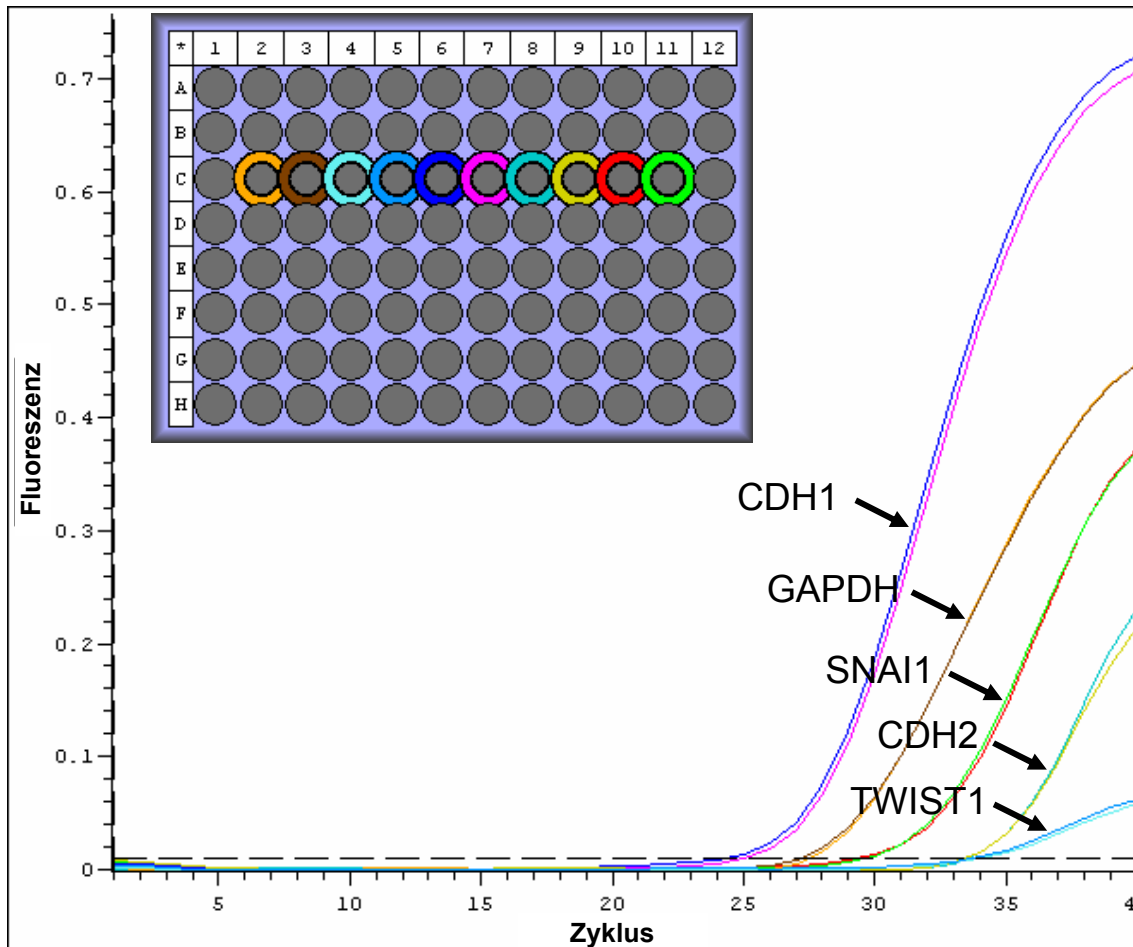


Abb. 7: Kurven der qRT PCR für ein Adenom. Inlay: 96-Well PCR-Platte. Die Kurven zeigen für das jeweilige Gen-Produkt (CDH1, GAPDH, SNAI1, CDH2 und TWIST1) die Zunahme der Fluoreszenz (y-Achse) im Verlauf der PCR-Zyklen (x-Achse, „Zyklus“). Die gestrichelte Linie parallel zur x-Achse entspricht dem Grenzwert, welcher für jedes Gen-Produkt individuell bestimmt wurde. Wenn eine Senkrechte durch den Schnittpunkt von Grenzwert und Kurve gelegt wird, so entspricht der Schnittpunkt dieser Senkrechten mit der x-Achse dem Ct-Wert. Die Farben der Kurven entsprechen den Farben im Inlay. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das Protokoll für die qRT-PCR lautete wie folgt:

- | | | |
|-----------|-----------------------------------------|--------|
| Schritt 1 | 95°C | 10 min |
| Schritt 2 | 95°C | 15 sec |
| Schritt 3 | 60°C | 1 min |
| Schritt 4 | Auslesen | |
| Schritt 5 | Gehe zu Schritt 2 für 39 weitere Zyklen | |

Ende

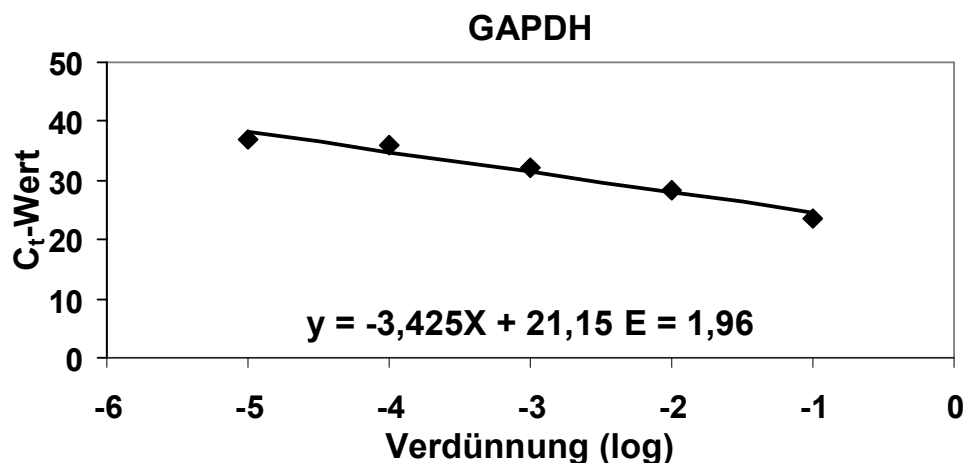
Eine Schmelzkurvenanalyse ist bei der Verwendung von Sonden nicht nötig, da eine eventuelle Primerdimerisierung keinen Einfluss auf die Zunahme der Fluoreszenz hat.

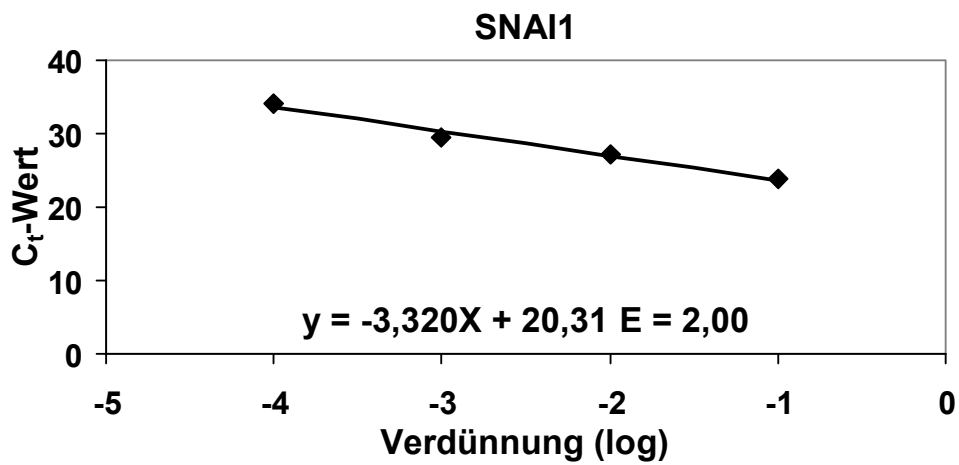
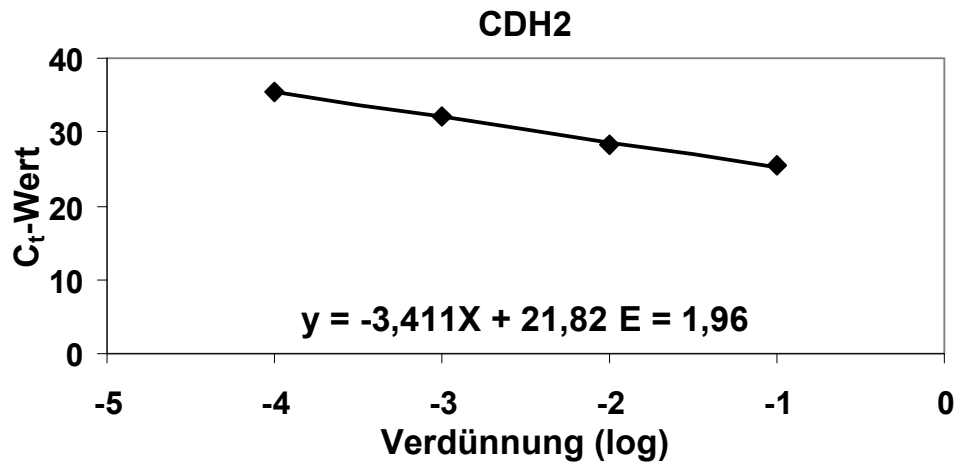
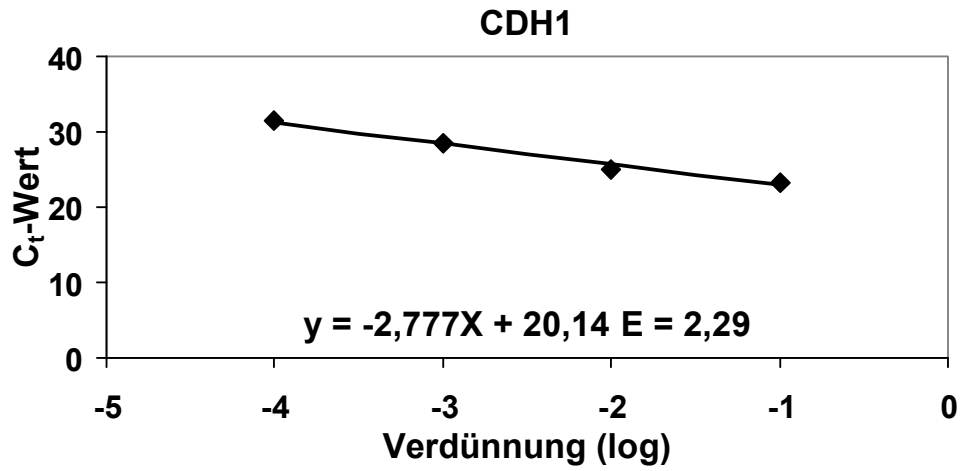
Um Variationen in der eingesetzten cDNA Menge auszugleichen, wurde GAPDH (Protein: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) als Referenzgen mitbestimmt. Die C_t -Werte wurden dann mit Hilfe des Wertes von GAPDH und der folgenden Formel normalisiert:

$$\Delta C_t\text{-Wert} = C_t\text{Zielgen} - C_t\text{Referenzgen}$$

Die normalisierten Werte werden als ΔC_t -Werte bezeichnet. Da auf diese Weise auch negative Werte entstehen, wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode die n-fache Menge der Ausgangs-RNA im Vergleich zu einer Referenz (Human Reference RNA, Stragtagene) berechnet. Dazu wurden Verdünnungskurven erstellt, um die Effizienz der Primer errechnen zu können. In diesen Verdünnungskurven wird eine bekannte Menge cDNA in absteigender Konzentration in einer PCR gefahren. Die C_t -Werte wurden dann als Gerade gegen den Logarithmus der Ausgangskonzentration aufgetragen (**Abbildung 8**). Aus der Geradengleichung ($y=mx+c$) kann die Steigung m der Geraden errechnet werden. Mit dieser Steigung der Geraden kann durch die folgende Formel die Effizienz E der Reaktion errechnet werden. Diese sollte bei ca. 2,0 liegen (entspricht einer Effizienz von 100%).

$$\text{Effizienz} = 10^{-(1/\text{Steigung})}$$





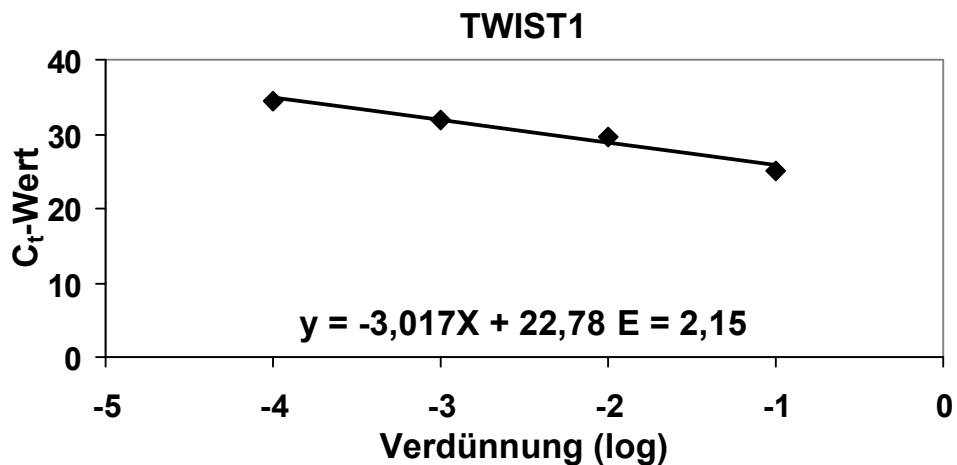


Abb. 8: Effizienzgeraden für die Primer von GAPDH, CDH1, CDH2, SNAI1 und TWIST1. Aufgetragen ist der C_t-Wert gegen den Logarithmus der Verdünnung der Probe. Aus der Geradengleichung ($y = mx + c$) lässt sich die Steigung m errechnen. Durch Einsetzen dieser in die Gleichung $E = 10^{-1/m}$ lässt sich die Effizienz (E) der PCR errechnen.

Mit Hilfe der Effizienz und der folgenden Formel konnte nun die n-fache Menge der Ziel-RNA im Vergleich zu einer Referenz (Human Reference RNA, Stratagene) errechnet werden [87]. Diesen Wert nennt man Ratio.

$$\text{Ratio} = \text{Effizienz}^{-(\Delta C_t(\text{Zielgen Probe}) - \Delta C_t(\text{Zielgen Referenz}))}$$

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Ergebnisse werden als Ratio ($\Delta\Delta C_t$ -Wert) angegeben.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 ABC-Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten immunhistochemischen Färbungen wurden alle nach der ABC-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode bindet ein spezifischer (primärer) Antikörper an ein Antigen und wird mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, einer Avidin-Biotin-Brücke und einer chemischen Reaktion sichtbar gemacht (**Abbildung 9**). Der sekundäre Antikörper, welcher ein Biotin-Molekül trägt, bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Das Biotin weist eine sehr hohe Affinität zu den vier Bindungsstellen eines Avidin-Moleküls auf. Von diesen vier Bindungsstellen des Avidin bindet eine an das Biotin am sekundären Antikörper. An jede der drei übrigen Bindungsstellen des Avidin lagert sich ein Komplex aus Biotin und daran gebundener Peroxidase an (ABC-Methode = Avidin-Biotin-Complex-Methode). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des farblosen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbstoff. Durch diese Reaktion wird die spezifische Bindung des primären Antikörpers erst sichtbar.

Alle Proben dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Mikrotoms von Paraffinblöcken geschnitten. Die Blöcke wurden vor dem Schneiden für 30 Minuten bei -20°C gelagert, um das Paraffin hart werden zu lassen. Die Schnitte wurden in ein 20 °C warmes Wasserbad (Aqua Dest.) zum vollständigen Entfalten übertragen und von dort auf Objektträger aufgezogen. Um eine sichere Adhäsion an die Objektträger zu gewährleisten, wurden die Schnitte dann für 20 Minuten bei 70°C und darauf bei 56°C über Nacht in einem Wärmeofen gelagert.

Für die ABC-Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Daraufhin wurden die Schnitte in einer *Retrieval* Lösung im Wasserbad bei 95°C für 30 Minuten erhitzt. Die *Retrieval* Lösung demaskiert die durch die Formalinfixierung eventuell noch quervernetzten Proteinstrukturen (Epitope), damit der primäre Antikörper daran binden kann. Nach Abkühlen der Schnitte für 20 Minuten auf Raumtemperatur (RT) wurde die in allen Geweben in geringer Menge vorkommende endogene Peroxidase mit

Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 0,3%) inaktiviert. Dadurch wurde eine unspezifische Hintergrundfärbung minimiert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur, wenn nicht anders beschrieben. Durch das Inkubieren mit Blockingserum (*diluted normal serum*, Vectastain) wurde die unspezifische Bindung von Antikörpern minimiert, bevor der primäre Antikörper auf die Schnitte aufgetragen wurde. Der spezifische primäre Antikörper wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf den Schnitten belassen, dann wurden diese zweimal für 5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der sekundäre, Biotin-beladene Antikörper aufgetragen, welcher ebenfalls 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurde das ABC-Reagenz (ABC-Kit, Vectastain) hinzugegeben, welches den Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex enthält. Über eine freie Bindungsstelle am Avidin bindet dieser Komplex an das Biotin am sekundären Antikörper. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde DAB-Substrat (DAB und DAB-Puffer) aufgetragen, welches von der nun an den Antikörper-Komplex gebundenen Peroxidase zu einem braunen Farbstoff oxidiert wurde. Daraufhin wurden mit Leitungswasser gespült, es erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun und die Schnitte wurden mit Entellan[®] eingedeckelt.

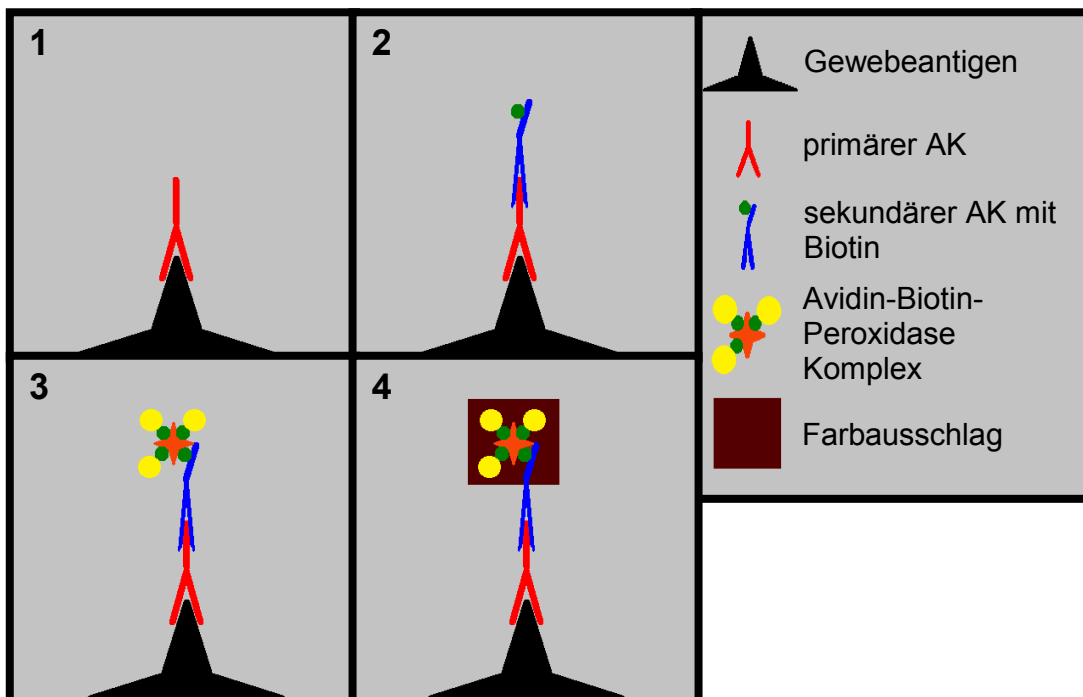


Abb. 9: Schema der ABC-Färbung. Bild 1: Der primäre Antikörper bindet an ein spezifisches Antigen. Bild 2: Der sekundäre, Biotin-beladene Antikörper bindet an den Fc-

Teil des primären Antikörpers. Bild 3: Der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex bindet an das Biotin des sekundären Antikörpers. Bild 4: Nach Zugabe des DAB-Substrates wird DAB durch die Peroxidase zu braunem Farbstoff oxidiert.

Die ABC-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Entparaffinierung:

Xylol	3x10 Minuten
99,5% Ethanol	2x 5 Minuten
96% Ethanol	2x 5 Minuten
80% Ethanol	2x 5 Minuten
70% Ethanol	1x 5 Minuten
Aqua Dest.	1x 5 Minuten

Epitope Retrieval:

<i>Retrieval Solution</i> (1:10 in Aqua Dest.)	30 Minuten bei 95°C
<i>Retrieval Solution</i>	20 Minuten auf RT
Waschen mit PBS	5 Minuten
Waschen mit Aqua Dest.	5 Minuten

Blocken der Endogenen Peroxidase:

0,3% H ₂ O ₂ (in PBS)	30 Minuten
Waschen mit PBS	2x 5 Minuten

Blocken unspezifischer AK:

<i>diluted normal serum</i> (3Tr/10ml PBS)	20 Minuten
--------------------------------------------	------------

Erster Antikörper:

primärer AK (in 10% AB-Serum)	30 Minuten
Waschen mit PBS	2x 5 Minuten

Zweiter Antikörper:

sekundärer AK (1Tr/10ml PBS)	30 Minuten
Waschen mit PBS	2x 5 Minuten

ABC-Reaktion:

Vectastain ABC-Reagenz	30 Minuten
Waschen mit PBS	2x 5 Minuten

Färbereaktion:

DAB-Substrat (1Tr DAB/1ml DAB-Puffer)	10 Minuten abgedunkelt
Waschen mit Leitungswasser	2x 5 Minuten

Gegenfärben:

Mayers Hämalan	15 Sekunden
Waschen mit Leitungswasser, fließend	20 Minuten

Eindeckeln:

Aqua Dest.	1 Minute
70% Ethanol	1 Minute
80% Ethnaol	1 Minute
99,5% Ethanol	1 Minute
Xylol	2x 1 Minute
Eindeckeln mit Entellan®	

Die optimale Konzentration der Antikörper gegen E-Cadherin, Ki-67 und Snail1 wurde durch Versuchsfärbungen mit Konzentrationen von 2ng/μl, 1ng/μl, 0,5ng/μl und 0,25ng/μl mit kolorektalem Karzinomgewebe definiert. Für E-Cadherin lieferte die Konzentration von 2ng/μl dabei die besten Ergebnisse. Bei Ki-67 und Snail1 war das Färbeergebnis bei jeweils 1ng/μl am besten. Diese Konzentrationen wurden für alle weiteren Färbungen verwendet. Zur Negativ-Kontrolle wurde statt dem primären Antikörper bei der Snail1 Färbung ein unspezifischer *Rabbit* Antikörper, bei der E-Cadherin und der Ki-67 Färbung ein unspezifischer *Mouse* Antikörper verwendet. Für die Konzentrationen der Antikörper siehe **Tabelle 6**.

<u>Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>
E-Cadherin (NCH-38)	2 μg/ml	DAKO
Snail1 (Ab17732)	1 μg/ml	AbCam
Ki-67 (MIB-1)	1 μg/ml	DAKO
Mouse (MOPC-21)	2 μg/ml	Sigma
Rabbit-IgG (X0903)	1 μg/ml	DAKO

Tabelle 6: Konzentrationen der für die Färbungen verwendeten Antikörper

3.4.2 Auswertung der Färbungen

Die Auswertung der Adenom- und TMA-Schnitte erfolgte unabhängig durch zwei Auswerter (G.F. & F.K.). Die Ergebnisse stimmten zu >90% überein, bei den fraglichen Schnitten wurde durch gemeinsame Re-evaluation ein Konsens erreicht.

Bei der Evaluation der immunhistochemischen Färbungen wurde für Snail1 und Ki-67 nur nukleäre Färbung, für E-Cadherin nur membranäre Färbung berücksichtigt. Die in einem hohen Prozentsatz vorkommende zytoplasmatische Snail1 Färbung wurde unberücksichtigt gelassen. Die Snail1 und E-Cadherin Färbungen wurden in 10% Schritten, die Ki-67 Färbung in 5% Schritten ausgewertet. Alle Färbungen wurden doppelt ausgeführt, um Abweichungen im Färbeverhalten und Unterschiede während dem Färbungsprozess zu eliminieren. Bei jeder Färbung wurde pro Probe eine Negativ-Kontrolle mit unspezifischem Antikörpern je nach Primärantikörper durchgeführt (MOPC-21 für E-Cadherin und Ki-67, X0903 für Snail1).

Für die weitere Auswertung der Rohdaten der Snail1 und der E-Cadherin Färbungen wurden zwei verschiedene Scoring Systeme verwendet. Mit Hilfe dieser wurden die Proben je in zwei Gruppen entsprechend ihrem Färbeverhalten eingeteilt.

Für den Immunreaktivitäts-Score (IRS), auch Remmele Score genannt [88], wurde die Färbeintensität (SI, „staining intensity“) in vier Gruppen eingeteilt: 0 (negativ), 1 (schwache Färbung), 2 (mittlere Färbung), 3 (starke Färbung). Die Anzahl positiver Zellen wurde als „Prozentzahl positiver Zellen“ (PP) in fünf Gruppen eingeteilt: 0 (keine), 1 ($\leq 10\%$), 2 (11-50%), 3 (51-80%), 4 ($> 80\%$). Durch Multiplizieren beider Werte (SI x PP) erhält man den IRS, der von 0 bis 12 reicht. Dabei wurde ein IRS von 0-2 als negativ, einen IRS von ≥ 3 als positiv gewertet [88] (**Tabelle 7**).

Der zweite verwendete Score ist ein semiquantitativer Score nach Blechschmidt et al. für die Auswertung von E-Cadherin Färbungen [89]. Die Färbeintensität wurde wie beim IRS in die Stufen 0 bis 3 eingeteilt. Bei E-Cadherin Färbung von weniger

als 20% der Zielzellen in Intensitätsstufe 3 wird das Gewebe als herab reguliert gegenüber dem Normalgewebe gewertet.

Für die Snail1 Färbung stellte sich der IRS sowohl in den TMA als auch in den Adenomen als geeignet heraus, zwischen vorhandener und nicht vorhandener Expression zu unterscheiden.

Für die Auswertung der E-Cadherin Färbung wurde sowohl der semiquantitative Score nach Blechschmidt et al. [89] als auch der IRS verwendet. Durch den Blechschmidt Score konnte bei den Adenomen eine gute Differenzierung zwischen erhaltener und herab regulierter E-Cadherin Expression im Vergleich zum Normalgewebe erreicht werden. Zunächst wurden auch die Rohdaten der E-Cadherin TMA Färbung mit dem Blechschmidt Score ausgewertet. Dieser Score stellte sich allerdings als nicht sinnvoll heraus, da in den Karzinomen nicht zwischen normaler und nicht normaler E-Cadherin Expression, sondern zwischen überhaupt vorhandener und nicht vorhandener E-Cadherin Expression unterscheiden werden sollte. Hierzu wurde erneut - wie bei der Snail1 Färbung - der IRS Score verwendet.

Für die Auswertung der Ki-67 Färbung wurde nur die „Prozentzahl positiver Zellen“ in Stufen von 5% (0-100%) berücksichtigt, nicht jedoch die Färbeintensität. Die Zellen befanden sich entweder in einer Teilungsphase und waren somit positiv gefärbt, oder sie befanden sich in einer Ruhephase und exprimierten das Ki-67 Antigen nicht. Nach der gängigen Literatur [90] wurden $\leq 10\%$ positiver Zellen als normale, 11-25% positive Zellen als leicht erhöhte und $> 25\%$ positive Zellen als stark erhöhte Proliferation gewertet **Tabelle 8**.

prozent positiver Zellen (PP)

keine	0
1-10%	1
11-50%	2
51-80%	3
> 80%	4

Tabelle 7: Auswertung der Färbung nach IRS (Remmele Score). Der Score ist das Produkt von PP und SI und liegt zwischen 0 und 12. Ein Score von 0-2 wurden als negativ gewertet, ein Score ≥ 3 als positiv.

Färbeintensität (SI)

negativ	0
schwach	1
mittel	2
stark	3

<u>positive Zellen</u>	<u>Proliferation</u>	<i>Tabelle 8: Auswertung der Ki-67 Färbung. Die Anzahl positiver Zellen wurde in 5% Schritten ausgewertet. Als normal galten Werte $\leq 10\%$. Werte von 11% - 25% wurde als erhöhte Proliferation, Werte $> 25\%$ als stark erhöhte Proliferation gewertet.</i>
1-10%	normal	
11-25%	erhöht	
$> 25\%$	stark erhöht	

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS Version 18. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $<0,05$ gewertet; p-Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als Trend gewertet. Alle Mediane und die entsprechenden Konfidenzintervalle (CI) wurden mittels SPSS Bootstrapping[®] berechnet [91].

3.5.1 Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis Test

Als nichtparametrischen Test bei zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet, um Verteilungsunterschiede zwischen zwei Gruppen zu untersuchen. Dieser Test gibt eine Aussage darüber, ob die Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen, oder nicht. Der Test gibt an, ob die Nullhypothese („Beide Proben entstammen derselben Gruppe“) widerlegt wird (p-Wert $<0,05$) oder nicht (p-Wert $>0,05$). Für den Mann-Whitney-U Test ist keine Normalverteilung nötig [92].

Um mehr als zwei unabhängige Stichproben auf die Verteilung in Gruppen zu untersuchen, wurde der Kruskal-Wallis-Test (k unabhängige Stichproben) verwendet. Auch dieser gibt nur Auskunft über das Ablehnen oder Zustimmung zu o.g. Nullhypothese.

3.5.2 Spearman-Korrelation

Die Korrelation zwischen zwei oder mehr Werten wurde mit Hilfe des Spearman-Test errechnet. Dabei zeigt ein signifikanter p-Wert einen Zusammenhang zwischen den beiden betroffenen Variablen an [92]. Der Korrelationskoeffizient, welcher zwischen -1 und 1 liegt, gibt die Art des Zusammenhangs an. Ist die Korrelation vollkommen, so ist der Korrelationskoeffizient entweder 1 oder -1. Ist der Korrelationskoeffizient positiv, so verhält sich die Korrelation linear positiv: Wenn der eine Wert steigt, steigt auch der andere Wert, und umgekehrt. Ist der Korrelationskoeffizient negativ, so verhält sich die Korrelation linear negativ: Fällt der eine Wert, so steigt der andere, und umgekehrt.

3.5.3 Chi-Square Test

Mit Hilfe des Chi-Square Test kann bei zwei (dichotomisierten) Variablen ein Wahrscheinlichkeitswert für das Ablehnen der Nullhypothese angegeben werden. Dabei besagt die Nullhypothese, dass die Variablen in keinem Zusammenhang stehen [92]. Bei einem p-Wert $<0,05$ besteht also zwischen den beiden getesteten Variablen mit signifikanter Wahrscheinlichkeit ein Zusammenhang, die Nullhypothese wird abgelehnt.

3.5.4 Kaplan-Meier und Log-Rank Test

Für die Analyse des Gesamtüberlebens (*overall survival*) wurde die Kaplan Meier Methode angewandt. Dabei wird das Überleben über die Zeit aufgetragen. Die Kurve gibt die zu jedem Zeitpunkt bestehende Überlebenswahrscheinlichkeit der Gruppe an. Tritt ein Ereignis (in dieser Arbeit der Tod eines Patienten) ein, so verringert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Kurve sinkt ab. Auch zensierte Werte können vorkommen, wenn der Status eines Patienten ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr bekannt ist. Diese Patienten werden dann auf der Kurve markiert und scheiden aus der Gesamtheit ab diesem Zeitpunkt aus. Die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt dadurch nicht. Auch Patienten, die bis zum

Ende des Beobachtungszeitraumes noch leben, werden am Ende zensiert. Für die Kaplan-Meier Methode wird eine Variable in verschiedene Gruppen eingeteilt, um einen Überlebensunterschied zu untersuchen [92]. Durch den Log-Rank-Test wird die Signifikanz des Einflusses dieser Gruppen auf das Überleben berechnet. Der Log-Rank-Test ist ein nichtparametrischer Test, setzt also keine Normalverteilung voraus [92].

3.5.5 Cox-Regression

Die Cox-Regression macht eine Aussage über den Einfluss mehrerer Variablen auf das Überleben. Dabei erlaubt die Cox-Regression auch die Aussage über die Steigerung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis eintritt, wenn sich die Ausprägung einer Variablen ändert. Mit dieser *Hazard Ratio* (HR) kann man vorhersagen, um wie viel wahrscheinlicher ein Ereignis (hier der Tod) beim Wechsel von einer Gruppe in die andere eintritt [92]. Das Basisrisiko, das ein Ereignis eintritt, ist dabei 1,0. Bei einem *Hazard Ratio* von 1,5 für eine Variable (z.B. T-Kategorie) beträgt der Risikozuwachs 50% beim Wechsel von einer Gruppe in die andere (z.B. von T1 zu T2, von T2 zu T3, usw.).

3.5.6 Boxplots

Bei allen Boxplots im Ergebnisteil entspricht die Region in der Box der 25. bis 75. Perzentile. Die horizontale Linie entspricht jeweils dem Median, die *whiskers* schließen die 5. bis 95. Perzentile ein. Ausreißer jenseits dieser Perzentilen werden durch Punkte gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Adenome

4.1.1 Transkriptionsebene - qRT PCR

Mit Hilfe der qRT PCR (quantitative real-time PCR, siehe Material und Methoden) wurden Proben von kolorektalen Adenomen (n=41), kolorektaler Normalmukosa (n=10) und kolorektalen Karzinomen (n=10) auf das Vorhandensein von mRNA der Transkriptionsfaktoren SNAI1/Snail1 und TWIST1/Twist1 und der Zelladhäsionsmoleküle CDH1/E-Cadherin und CDH2/N-Cadherin untersucht.

In den kolorektalen Adenomen konnte in 78% die mRNA von SNAI1 und in 42% die mRNA von TWIST1 nachgewiesen werden (SNAI1: n=32/41; MW $\Delta\Delta C_t$ 3,6 \pm 8,6; TWIST1: n=17/41; MW $\Delta\Delta C_t$ 0,08 \pm 0,09). Die mRNA von CDH1 war in 95%, die von CDH2 in 42% der Adenome nachweisbar (CDH1: n=39/41; MW $\Delta\Delta C_t$ 5,2 \pm 7,9; CDH2: n=17/41; MW $\Delta\Delta C_t$ 0,2 \pm 0,18).

In gesunder Schleimhaut des Kolons konnte SNAI1, TWIST1 und CDH2 mRNA nicht nachweisen werden. Dagegen war in 100% der Normalmukosen CDH1 mRNA nachweisbar (n=10/10; MW $\Delta\Delta C_t$ 19,8 \pm 41,9). Auch in den kolorektalen Karzinomen konnte in 100% CDH1 mRNA nachgewiesen werden (n=10/10; MW $\Delta\Delta C_t$ 4,7 \pm 4,3).

4.1.2 E-Cadherin Expression in Adenomen, Karzinomen und Normalmukosa

Beim Vergleich der Expressionshöhe der CDH1 mRNA zwischen Adenomen, Normalmukosa und Karzinomen konnte ein Unterschied festgestellt werden. In Adenomen war die Expression im Vergleich zur Normalmukosa signifikant (p=0,035) verringert (Adenome: Median $\Delta\Delta C_t$ 2,42; CI [1,13;4,23]; Normalmukosa: Median $\Delta\Delta C_t$ 5,4; CI [2,26;14,5]). Auch die Karzinome wiesen eine verringerte

Menge an CDH1 mRNA im Vergleich zum Normalgewebe auf, unterschieden sich jedoch in dieser Hinsicht nicht nennenswert von den Adenomen (Karzinome: Median $\Delta\Delta C_t$ 3,21; CI [1,58;9,11]) **Abbildung 10**.

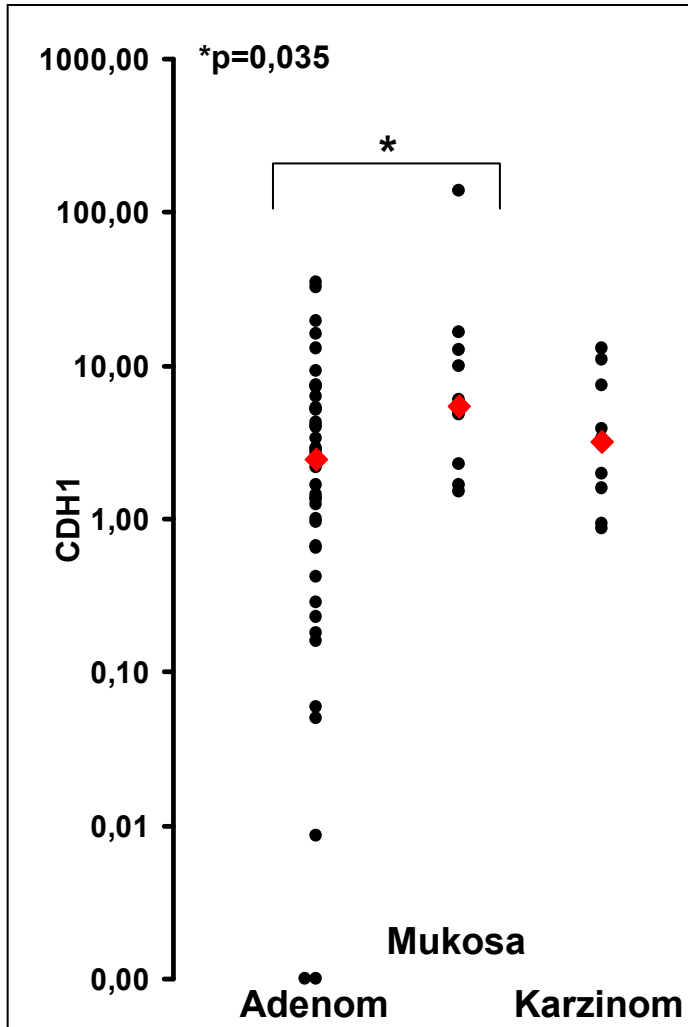


Abb. 10: Vergleich der relativen CDH1 mRNA Expression (in $\Delta\Delta C_t$ Werten, y-Achse) zwischen kolorektaler Normalmukosa, Adenom- und Karzinomgewebe. Dabei fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Adenomgewebe und Normalmukosa ($p=0,035$). Jeder Punkt entspricht einer Probe, Median in rot.

4.1.3 Korrelation von CDH1 mit SNAI1 und TWIST1

Als nächstes wurde untersucht, ob bei den Adenomen eine Korrelation zwischen der Expressionshöhe der CDH1 mRNA und dem Vorhandensein der Transkriptionsregulatoren SNAI1 und TWIST1 feststellbar war.

Tatsächlich konnte in SNAI1 negativen Adenomen eine signifikant ($p=0,004$) höhere Expression der CDH1 mRNA im Vergleich mit SNAI1 positiven Adenomen festgestellt werden (SNAI1 negativ: 22%, $n=9/41$; Median $\Delta\Delta C_t$ 7,38; CI [2,83;16,02]; SNAI1 positiv: 78%, $n=32/41$; Median $\Delta\Delta C_t$ 1,35; CI [0,64;2,9])

(Abbildung 11). In TWIST1 negativen Adenomen betrug der Median der CDH1 mRNA 3,12 $\Delta\Delta C_t$, während dieser in den TWIST1 positiven Adenomen 1,33 $\Delta\Delta C_t$ betrug, der Mann-Whitney-U Test ergab aber keinen signifikanten Unterschied ($p=0,29$) zwischen den beiden Gruppen (TWIST1 negativ: 59%, $n=24/41$; CI [1,17;7,35]; TWIST1 positiv: 41%, $n=17/41$; CI [0,64;5,12]) **(Abbildung 11).**

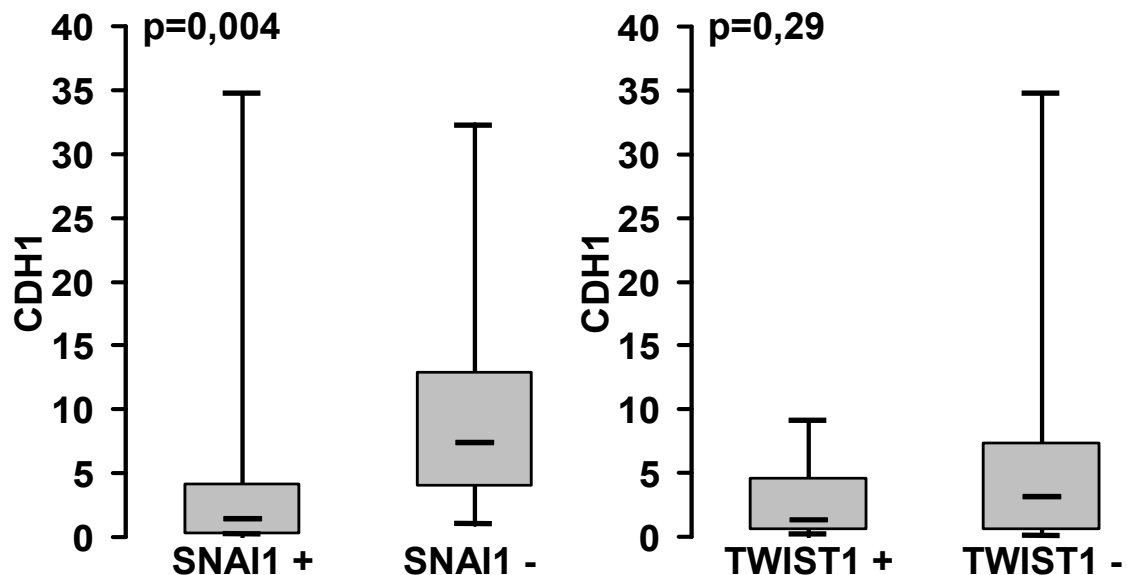


Abb. 11: Relative CDH1 mRNA Expression (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in SNAI1 positiven und negativen Adenomen (links) und TWIST1 positiven und negativen Adenomen (rechts) (p-Wert nach Mann-Whitney-U Test).

4.1.4 Einfluss der Co-Expression von SNAI1 und TWIST1

Weiterhin wurde untersucht, ob die Co-Expression dieser Transkriptionsfaktoren in Adenomen einen Einfluss auf die Expressionshöhe der CDH1 mRNA hat.

In 31% ($n=13/41$) der Adenome konnte sowohl SNAI1 als auch TWIST1 mRNA festgestellt und im Vergleich zu den 15% ($n=6/41$) der SNAI1 und TWIST1 negativen Adenome eine signifikant geringere ($p=0,003$) CDH1 mRNA Expression gefunden werden (CDH1 in SNAI1 und TWIST1 positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 1,29; CI [0,32;4,59]; CDH1 in SNAI1 und TWIST1 negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 10,14; CI [5,15;24,14]) **(Abbildung 12).**

Die Transkriptionsfaktoren SNAI1 und TWIST1 korrelierten also auf Ebene der mRNA (Transkriptionsebene) mit einem verringerten Gehalt an CDH1 mRNA. Dieser Effekt wurde durch Co-Expression dieser Faktoren noch verstärkt.

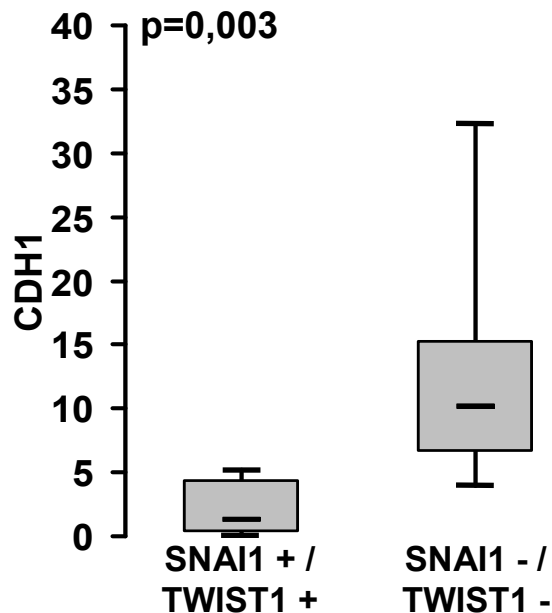


Abb. 12: Relative CDH1 mRNA Expression (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in Adenomen mit und ohne Co-Expression von SNAI1 und TWIST1 ($p=0,003$, Mann-Whitney-U Test).

4.1.5 Korrelation von CDH1 und CDH2

Es fand sich keine signifikante Korrelation ($p=0,241$) zwischen der CDH1 und der CDH2 Expression auf mRNA Ebene. In allen 17 Adenomen, die CDH2 positiv waren, konnte auch CDH1 mRNA gefunden werden. Auch gab es keinen signifikanten Expressionsunterschied der CDH1 mRNA zwischen CDH2 positiven und negativen Adenomen (CDH1 in CDH2 positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 1,70; CI [0,28;3,33]; CDH1 in CDH2 negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 3,44; CI [1,23;5,73]) (**Abbildung 13**).

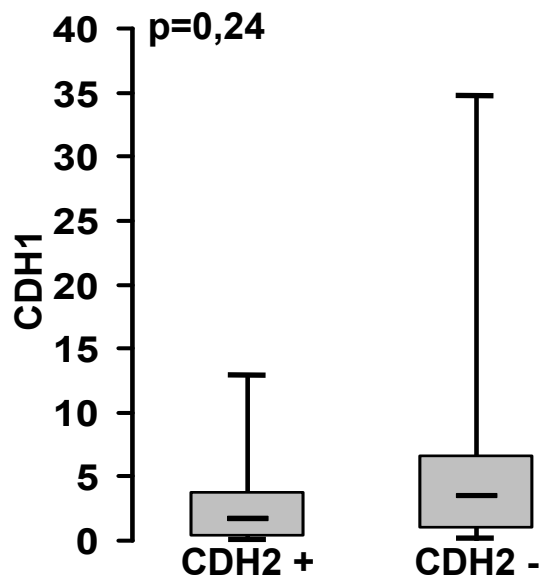


Abb. 13: Relative Expression der CDH1 mRNA (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in CDH2 positiven und negativen Adenomen ($p=0,241$, Mann-Whitney-U Test).

4.1.6 Einfluss von SNAI1 und TWIST1 auf die CDH2 Expression

Auch die Expression von SNAI1 und TWIST1 zeigte keinen Einfluss auf die CDH2 Expression. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p=0,778$) in der CDH2 mRNA Expression zwischen SNAI1 positiven und negativen Adenomen festgestellt werden (CDH2 in SNAI1 positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,00; CI [0,00;0,08]; CDH2 in SNAI1 negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,00; CI [0,00;0,18]). Auch zwischen TWIST1 positiven und negativen Adenomen fand sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,878$) (CDH2 in TWIST1 positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,00; CI [0,0;0,1]; CDH2 in TWIST1 negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,00; CI [0,0;0,11]) (Abbildung 14).

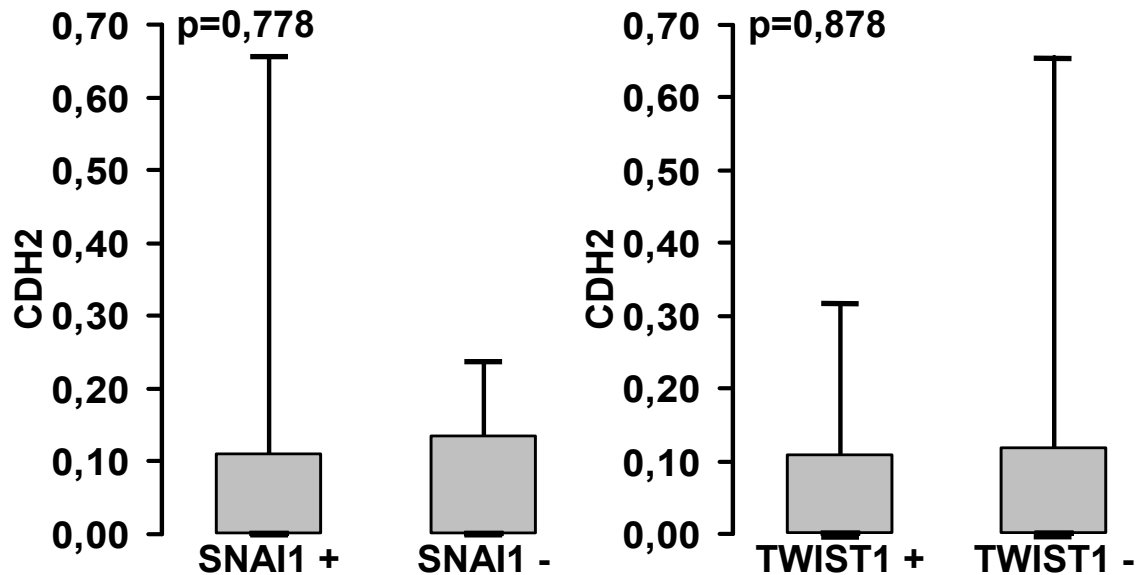


Abb. 14: Relative CDH2 mRNA Expression (als $\Delta\Delta C_T$ -Wert, y-Achse) in SNAI1 positiven und negativen Adenomen (links) und TWIST1 positiven und negativen Adenomen (rechts) (p-Werte nach Mann-Whitney-U Test).

4.1.7 Translationsebene - Immunhistochemische Färbung

Da ein Unterschied zwischen der Menge an mRNA in einer Zelle und dem tatsächlich exprimierten Protein bestehen kann, wurden nun die Ergebnisse der Untersuchungen auf Transkriptionsebene (mRNA) auch auf Translationsebene (Proteine) validiert. Dazu wurde eine Snail1 und E-Cadherin spezifische immunhistochemische Färbung von 40 der oben untersuchten Adenome angefertigt. Bei den Adenomen zeigten 43% (n=17/40) eine positive membranäre E-Cadherin Färbung, in 57% (n=23/40) war die E-Cadherin Färbung herab reguliert oder fehlte ganz (**Abbildungen 15 und 16**).

In 68% (n=27/40) der Adenome fand sich eine positive nukleäre Snail1 Färbung. In 32% (n=13/40) der Adenome war die Snail1 Färbung negativ. Eine zytoplasmatische Färbung wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt (**Abbildung 17**).

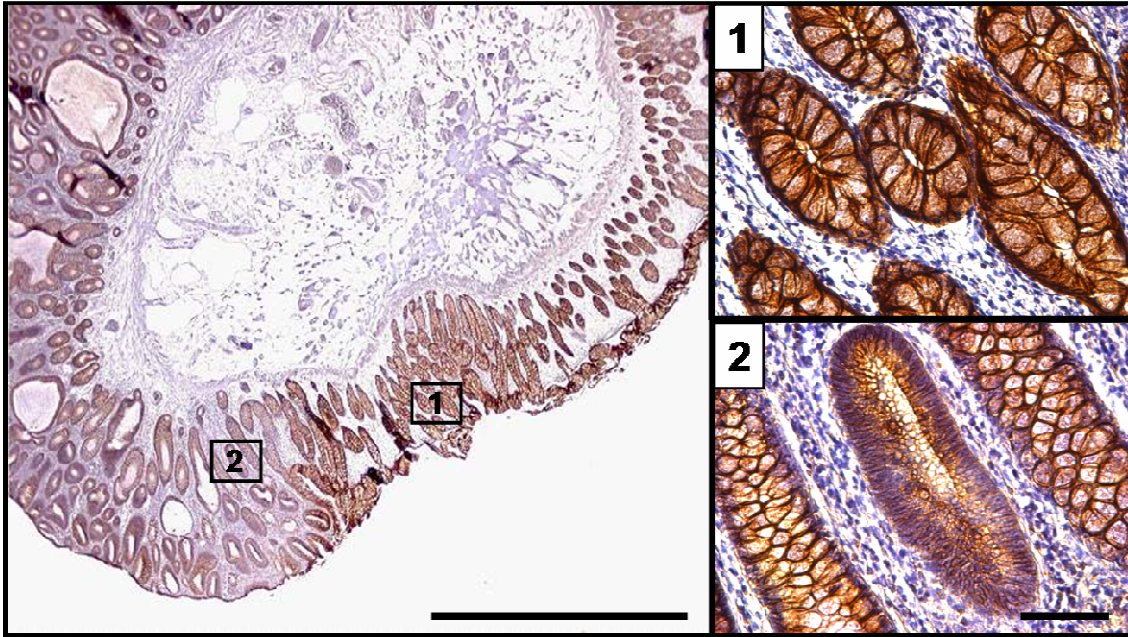


Abb. 15: E-Cadherin im Adenom. Übersicht (40x) eines E-Cadherin gefärbten Adenoms mit Anteilen normaler Mukosa. Fenster (1): Vergrößerung der normalen Mukosa (400x) mit stark positiver membranärer E-Cadherin Färbung. Fenster (2): Vergrößerung eines Adenomanteils (400x) mit schwacher membranärer E-Cadherin Färbung. Maßstab: 1mm (40x) bzw. 100 μ m (400x).

4.1.8 Korrelation der PCR Ergebnisse mit der Färbung

Die Korrelation der Ergebnisse der qRT PCR und der Immunhistochemie ergab eine signifikante Übereinstimmung. Die in der Immunhistochemie E-Cadherin positiven Adenome wiesen auch eine signifikant ($p=0,003$) höhere CDH1 Expression auf mRNA-Ebene auf, als die in der Immunhistochemie negativen Adenome (CDH1 mRNA der in der Färbung positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 5,25; CI [3,33;7,38]; CDH1 der in der Färbung negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 1,13; CI [0,53;1,66]) (**Abbildung 18a**).

Auch die in der Immunhistochemie Snail1 positiven Adenome wiesen in der qRT PCR signifikant ($p=0,001$) höhere SNAI1 mRNA Level auf, als die immunhistochemisch negativen Adenome (SNAI1 mRNA der in der Färbung positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,82; CI [0,36;1,7]; SNAI1 mRNA der in der Färbung negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 0,001; CI [0,001;0,07]) (**Abbildung 18b**).

Die in der Immunhistochemie Snail1 positiven Adenome wiesen auch in der qRT PCR eine signifikant ($p=0,02$) geringere CDH1 mRNA Expression auf, als die in der Immunhistochemie Snail1 negativen Adenome (CDH1 mRNA der in der Färbung Snail positiven: Median $\Delta\Delta C_t$ 1,34; CI [0,66;3,7]; CDH1 mRNA der in der Färbung Snail negativen: Median $\Delta\Delta C_t$ 7,38 CI [1,66;16,02]) (**Abbildung 18c**).

Des Weiteren zeigte sich, dass 87% ($n=20/23$) von den in der Färbung E-Cadherin negativen Adenomen in der qRT PCR SNAI1 positiv waren. Nur 13% ($n=3/23$) dieser Adenome waren in der qRT PCR SNAI1 negativ (**Abbildung 19, rechts**).

Bei den in der Immunhistochemie E-Cadherin positiven Adenomen konnte dieser Unterschied in der SNAI1 mRNA Verteilung nicht festgestellt werden (Chi-Square, $p=0,096$) (**Abbildung 19, links**).

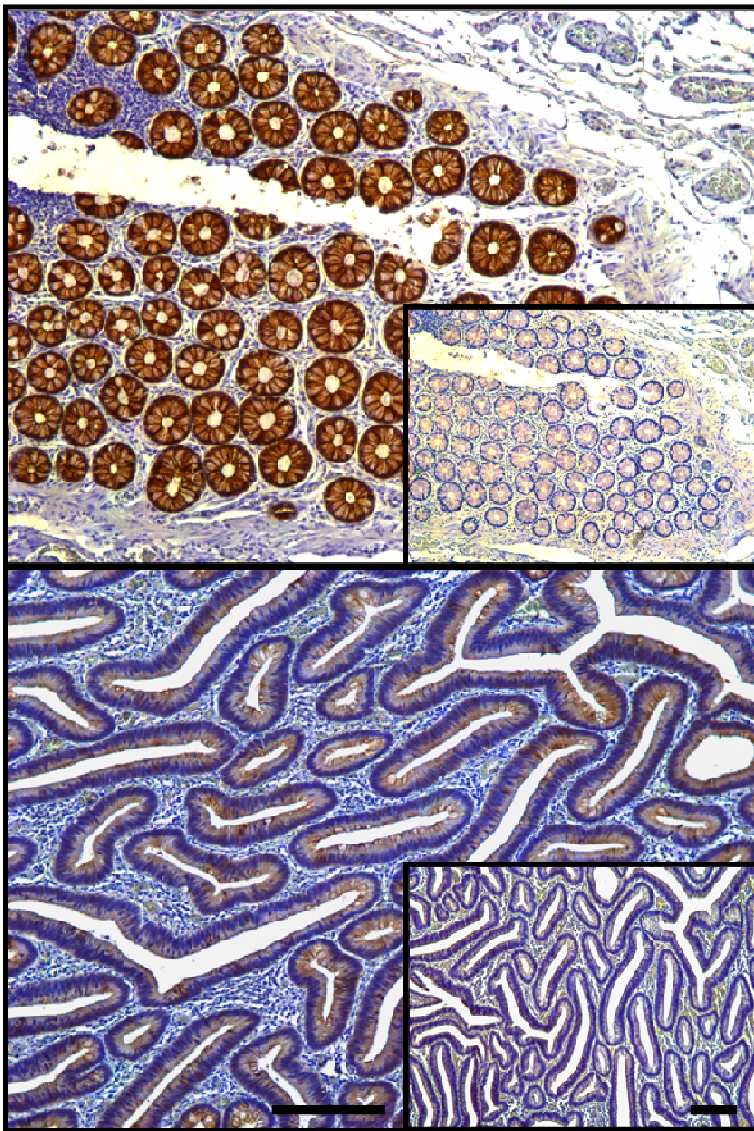


Abb. 16: E-Cadherin Färbung (100x), oben: stark E-Cadherin positive Normalmukosa, unten: schwach E-Cadherin positives Adenomgewebe. Fenster: jeweils Negativ-Kontrolle der Antikörper. Maßstab: 100µm.

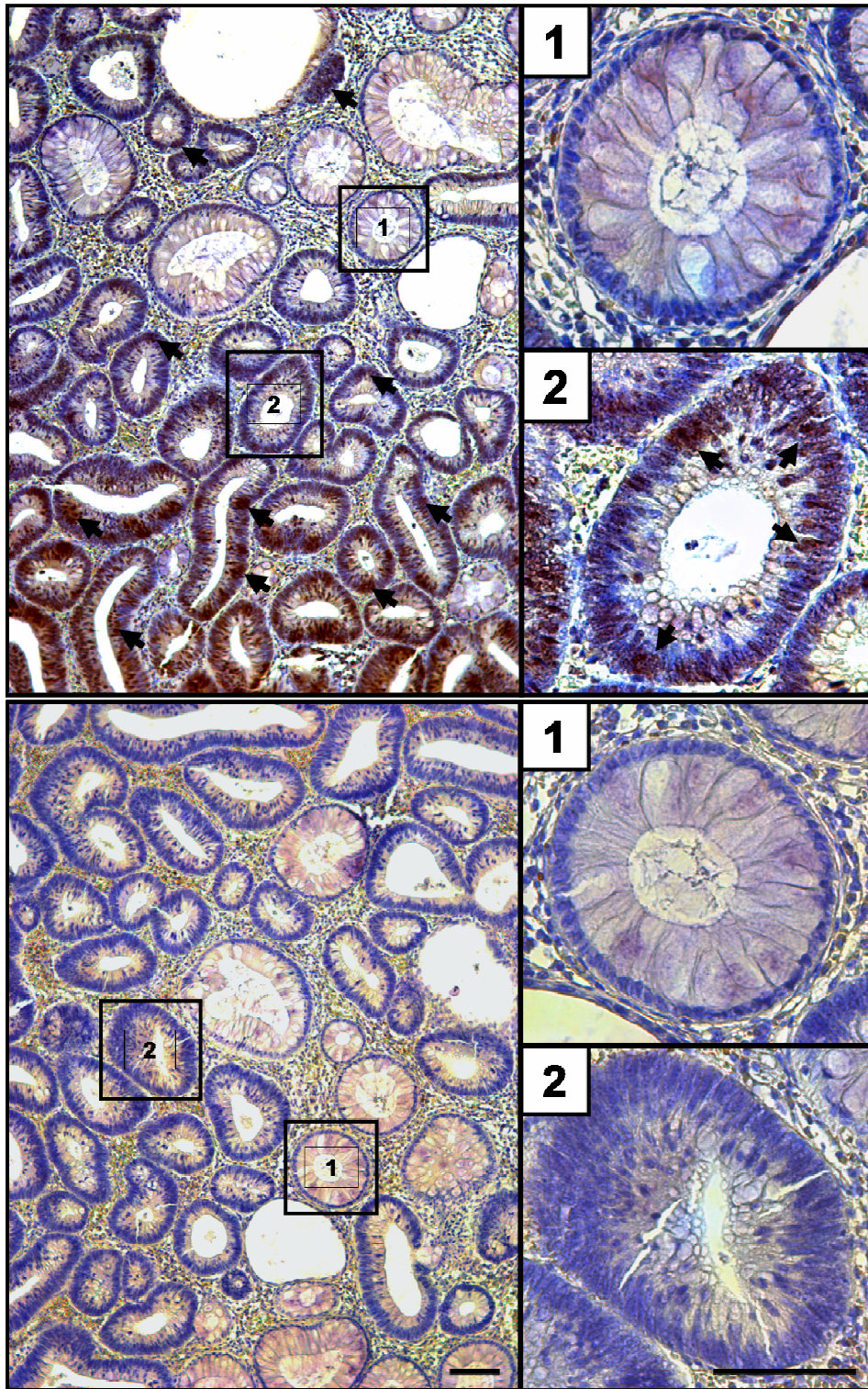


Abb. 17: Snail1 Färbung (oben) und Negativ-Kontrolle (unten) eines Adenoms (100x). Fenster: Vergrößerung Snail1 negativer (1) bzw. positiver (2) Anteile des Adenoms (400x). Pfeile zeigen Snail1 positive Zellkerne an. Maßstab: 100µm.

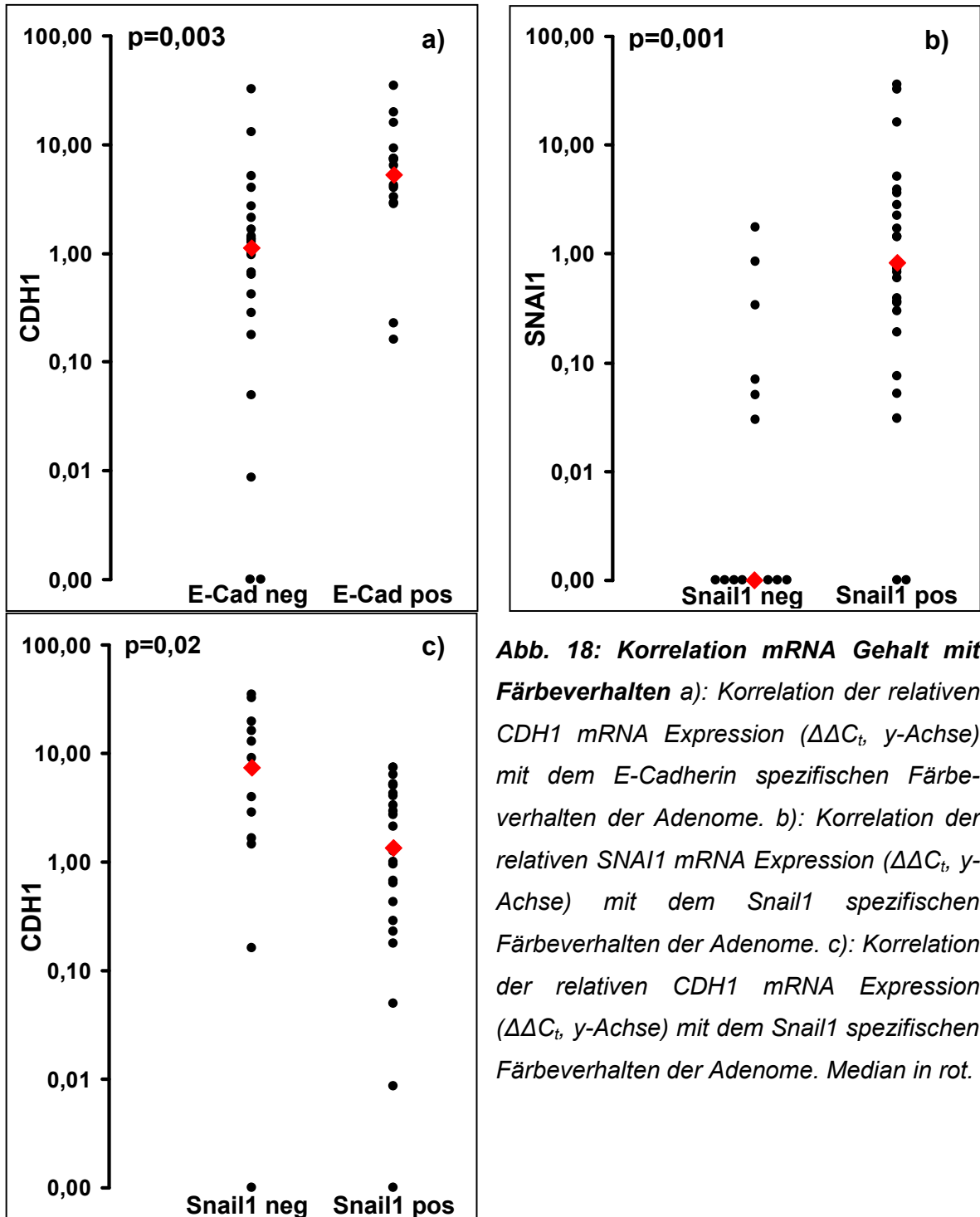


Abb. 18: Korrelation mRNA Gehalt mit Färbeverhalten a): Korrelation der relativen CDH1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem E-Cadherin spezifischen Färbeverhalten der Adenome. b): Korrelation der relativen SNAI1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem Snail1 spezifischen Färbeverhalten der Adenome. c): Korrelation der relativen CDH1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem Snail1 spezifischen Färbeverhalten der Adenome. Median in rot.

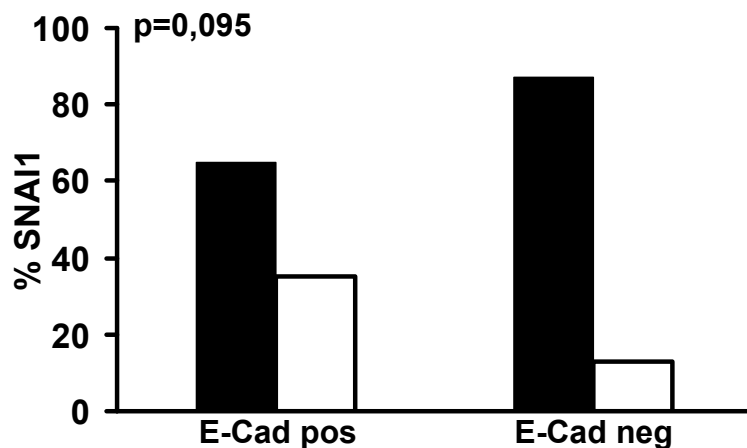


Abb. 19: Korrelation SNAI1 PCR mit E-Cadherin Färbung. Anteil (%) der in der PCR SNAI1 positiven (schwarz) oder negativen (weiß) Adenome an den in der Immunhistochemie E-Cadherin positiven oder negativen Adenomen.

Auch auf Proteinebene (Translationsebene) weist Snail1 einen negativen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in Adenomen auf. Dieser Einfluss in Adenomen wurde nun auch in kolorektalen Karzinomen untersucht.

4.2 Kolorektale Karzinome

4.2.1 Immunhistochemie der Tissue Microarray's (TMA)

Dazu wurde eine spezifische immunhistochemische Färbung der schon bekannten Proteine Snail1 und E-Cadherin sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 von Gewebeproben von 251 Patienten mit kolorektalem Karzinom angefertigt. Hierfür wurde ein schon bestehender TMA verwendet, auf welchem Tumorgewebe des Tumorzentrums sowie des Invasionsrandes, Normalgewebe und Lymphknotenmetastasen aufgebracht waren (siehe Material und Methoden) (**Abbildungen 20-23**).

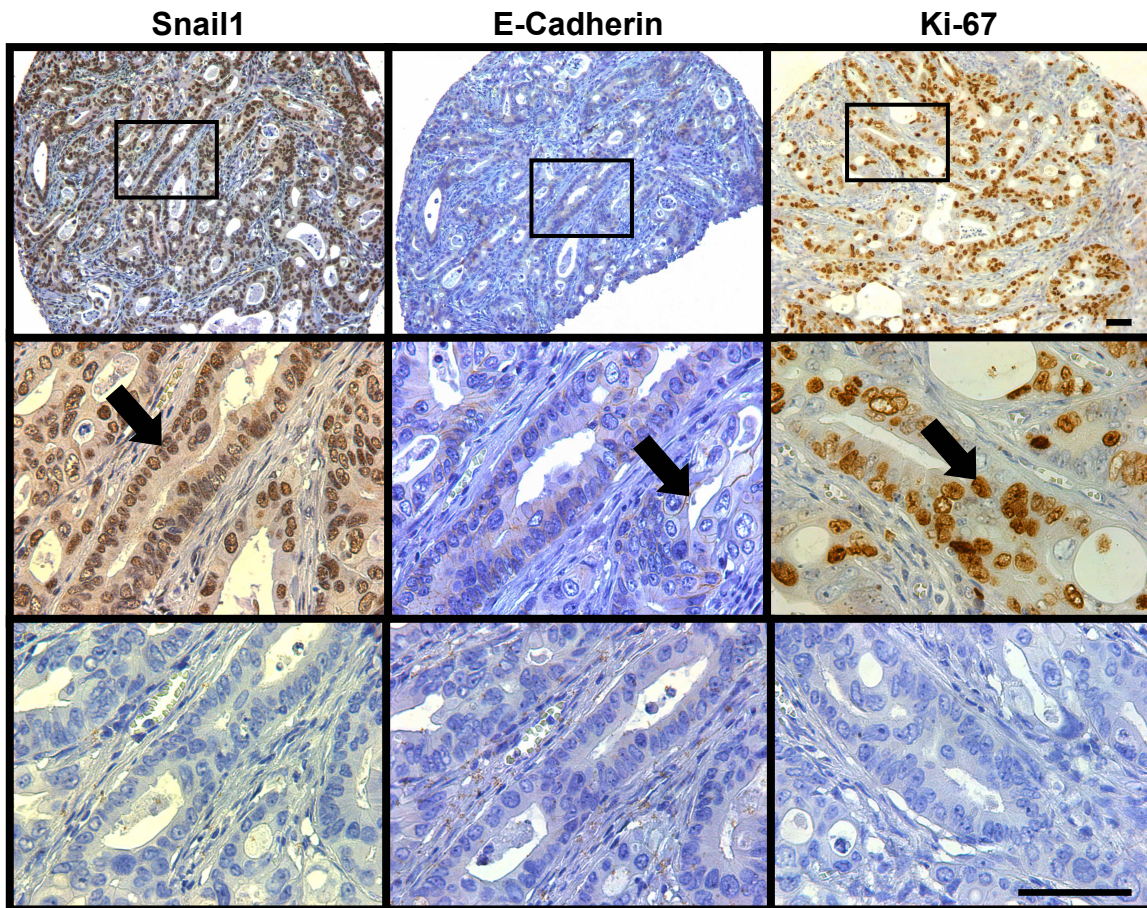


Abb. 20: TMA kolorektale Karzinome, Tumorzentrum. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100 μ m.

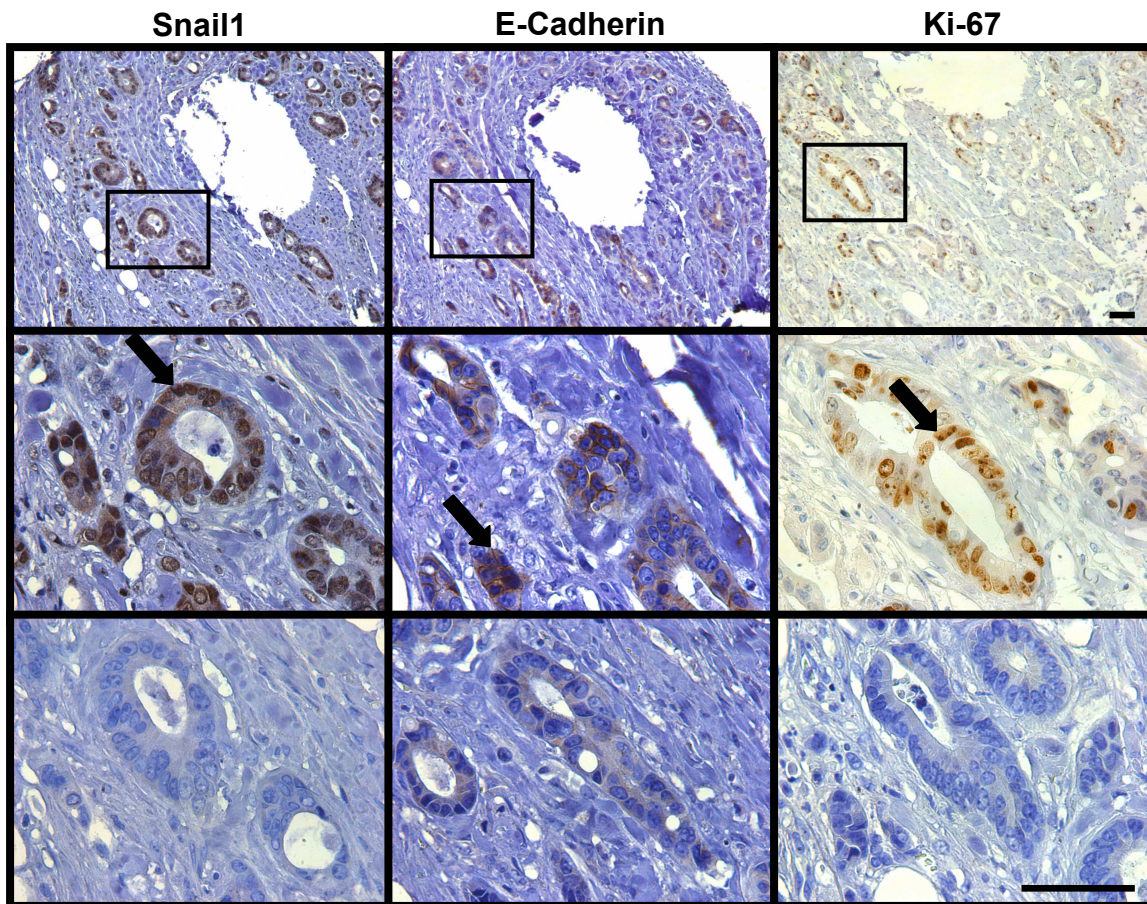


Abb. 21: TMA kolorektale Karzinome, Invasionsfront. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100 μ m.

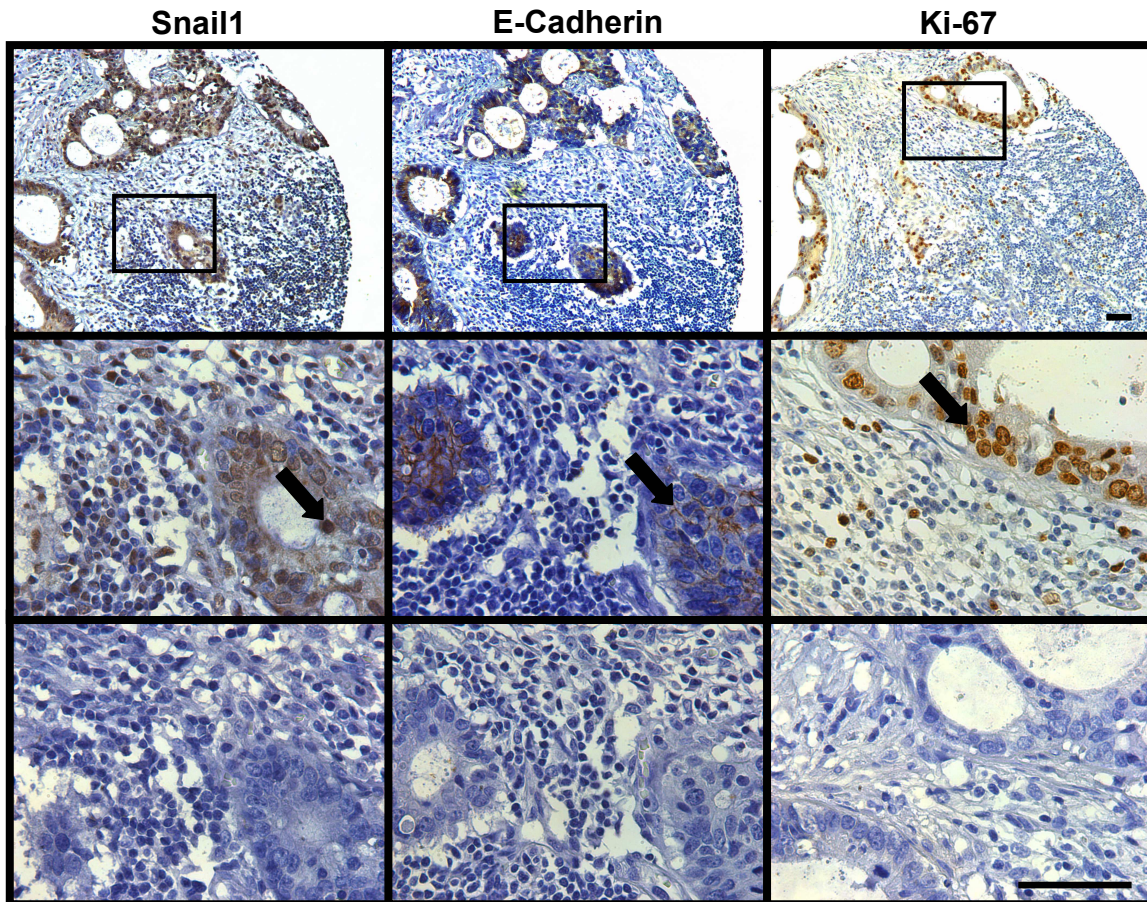


Abb. 22: TMA kolorektale Karzinome, Lymphknotenmetastase. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100 μ m.

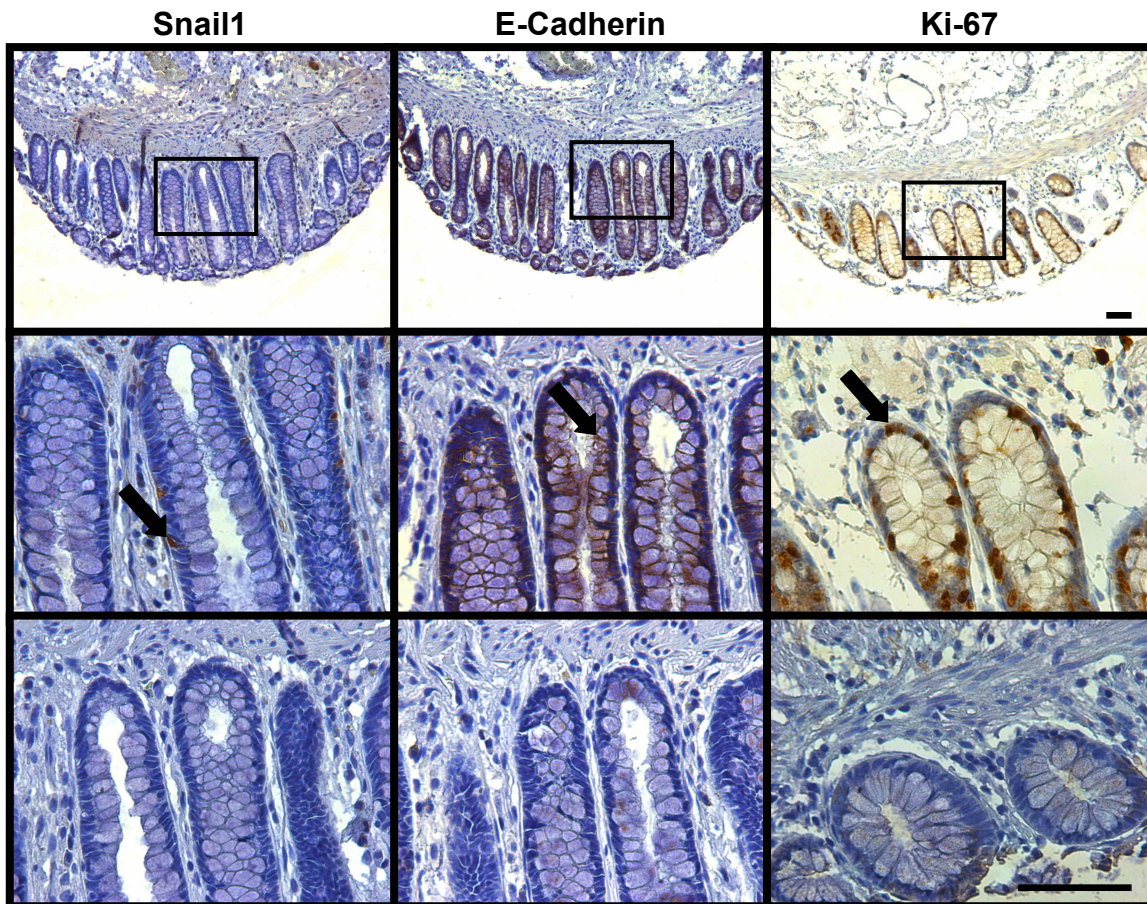


Abb. 23: TMA kolorektale Karzinome, Normalgewebe. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100 μ m.

Bei 76% (n=191/251) der Tumore konnte eine nukleäre Snail1 Färbung nachweisen werden, während 24% (n=60/251) der Tumore Snail1 negativ waren. In 61% (n=153/250) war die E-Cadherin Färbung positiv, in 39% (n=97/250) der Tumore war sie negativ. Bei 13% (n=33/250) der Tumore war die E-Cadherin Expression nach dem Blechschmidt Score erhalten. Bei 90% (n=225/250) der Tumore konnte eine positive Ki-67 Färbung festgestellt werden, während 10% (n=25/250) der Tumore Ki-67 negativ waren (**Tabelle 9**).

		Patienten	Snail1 positiv	E-Cadherin positiv	Ki-67 positiv
Gewebe:					
	Tumor	251	191/251 (76%)	153/250 (61%)	225/250 (90%)
	LK-Met	47	30/43 (70%)	20/42 (48%)	23/39 (59%)
TNM:					
T	1	8/251 (3%)	6/8 (75%)	4/8 (50%)	6/8 (75%)
	2	64/251 (26%)	54/64 (84%)	43/64 (67%)	61/64 (95%)
	3	153/251 (62%)	113/153 (74%)	91/152 (60%)	137/152 (90%)
	4	26/252 (10%)	18/26 (69%)	15/26 (58%)	21/26 (81%)
N	0	146/251 (58%)	116/146 (80%)	93/145 (64%)	131/146 (90%)
	1	64/251 (26%)	45/64 (70%)	38/64 (59%)	59/63 (94%)
	2	41/251 (16%)	31/41 (76%)	22/41 (54%)	35/41 (85%)
M	0	251/251 (100%)	191/251 (76%)	153/250 (61%)	225/250 (90%)
	1	0/251 (0%)	0/251 (0%)	0/250 (0%)	0/250 (0%)
G	1	2/251 (1%)	2/2 (100%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
	2	209/251 (83%)	156/209 (75%)	132/208 (63%)	190/209 (91%)
	3	40/251 (16%)	33/40 (83%)	20/40 (50%)	34/39 (87%)
Geschlecht:					
	weiblich	103/251 (41%)	77/103 (75 %)	54/103 (52%)	93/103 (90%)
	männlich	148/251 (59%)	114/148 (77%)	99/147 (67%)	132/147 (90%)
Alter bei Diagnose:					
	≤ 65 J	80/251 (32%)	62/80 (78%)	48/80 (60%)	77/80 (96%)
	> 65 J	171/251 (68%)	129/171 (75%)	105/170 (62%)	148/170 (87%)

Tabelle 9: Aufschlüsselung der histopathologischen Merkmale und des Färbeverhaltens des TMA-Patientenkollektiv.

4.2.2 Korrelation von E-Cadherin mit Snail1

Es konnte keine Korrelation zwischen Snail1 positiven Tumoren und dem Verlust von E-Cadherin festgestellt werden ($p=0,85$) (**Abbildung 24**). Auch bei der Untersuchung der Tumorkompartimente Invasionsfront und Tumorzentrum wurde keine Korrelation zwischen positiver Snail1 Färbung und Verlust der E-Cadherin Expression festgestellt ($p=0,13$, $p=0,14$).

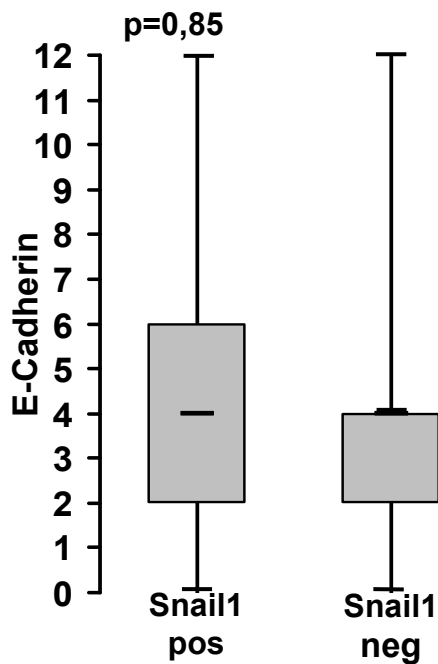


Abb. 24: Boxplots des E-Cadherin Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) bei Snail1 positiven und Snail1 negativen Tumoren.

Snail1 positive Tumore korrelierten zwar signifikant mit Snail1 positiven Lymphknotenmetastasen ($p=0,03$), innerhalb dieser fand sich allerdings keine Korrelation zwischen positiver Snail1 Färbung und dem Verlust von E-Cadherin ($p=0,53$).

4.2.3 Korrelation von Snail1 mit Ki-67

Zwischen positiver Snail1 Färbung und positiver Ki-67 Färbung im gesamten Tumor wurde eine hoch signifikante Korrelation ($p=0,001$) festgestellt (**Abbildung 25**). Auch bei der Untersuchung des Tumorzentrums und der Invasionsfront fand sich diese signifikante Korrelation zwischen Snail1 und Ki-67 ($p=0,0036$, $p<0,0001$).

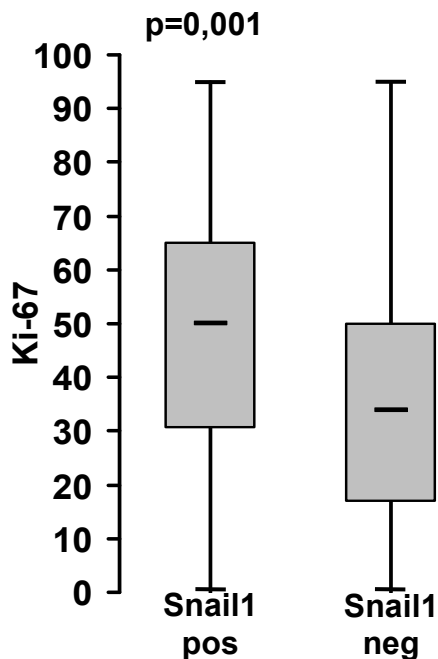


Abb. 25: Boxplots der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) bei Snail1 positiven und Snail1 negativen Tumoren.

4.2.4 Korrelation von E-Cadherin mit Ki-67

Die E-Cadherin Färbung korrelierte in den Tumoren nicht mit Ki-67 ($p=0,15$). Jedoch zeigte sich im Normalgewebe eine signifikante inverse Korrelation zwischen E-Cadherin und Ki-67 ($p=0,03$). E-Cadherin positives Normalgewebe korrelierte mit Ki-67 negativem Normalgewebe (**Abbildung 26**).

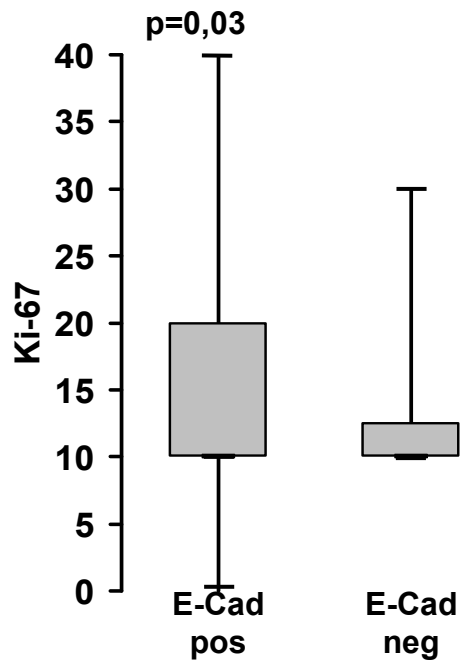


Abb. 26: Boxplot der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) bei E-Cadherin positiven und E-Cadherin negativen Tumoren.

4.2.5 Einfluss histopathologischer Marker auf das Färbeverhalten

Kleine Tumore (T1+T2) waren im Vergleich zu fortgeschrittenen Tumoren (T3+T4) öfter Snail1 positiv ($p=0,077$) (**Abbildung 27a**). Während die kleinen Tumore in 83% ($n=60/72$) Snail1 positiv waren, waren nur 73% ($n=131/179$) der fortgeschrittenen Tumore Snail1 positiv.

Bei der Untersuchung dieses Zusammenhangs in den Tumorkompartimenten fand sich ein signifikanter Unterschied im Tumorzentrum zwischen kleinen (T1+T2) und fortgeschrittenen (T3+T4) Tumoren ($p=0,048$). Eine positive Snail1 Färbung im Tumorzentrum konnte in 72% ($n=50/69$) der kleinen und nur in 64% ($n=109/170$) der fortgeschrittenen Tumore festgestellt werden. In der Invasionsfront fand sich jedoch nur einen Trend zwischen Snail1 positiven kleinen (T1+T2) und fortgeschrittenen (T3+T4) Tumoren ($p=0,066$) (**Abbildung 27b, 27c**). Dieser Zusammenhang zwischen Snail1 Färbung und T-Kategorie konnte auch im Kruskal-Wallis-Test für das Tumorzentrum ($p=0,03$) und die Invasionsfront ($p=0,19$) nachgewiesen werden.

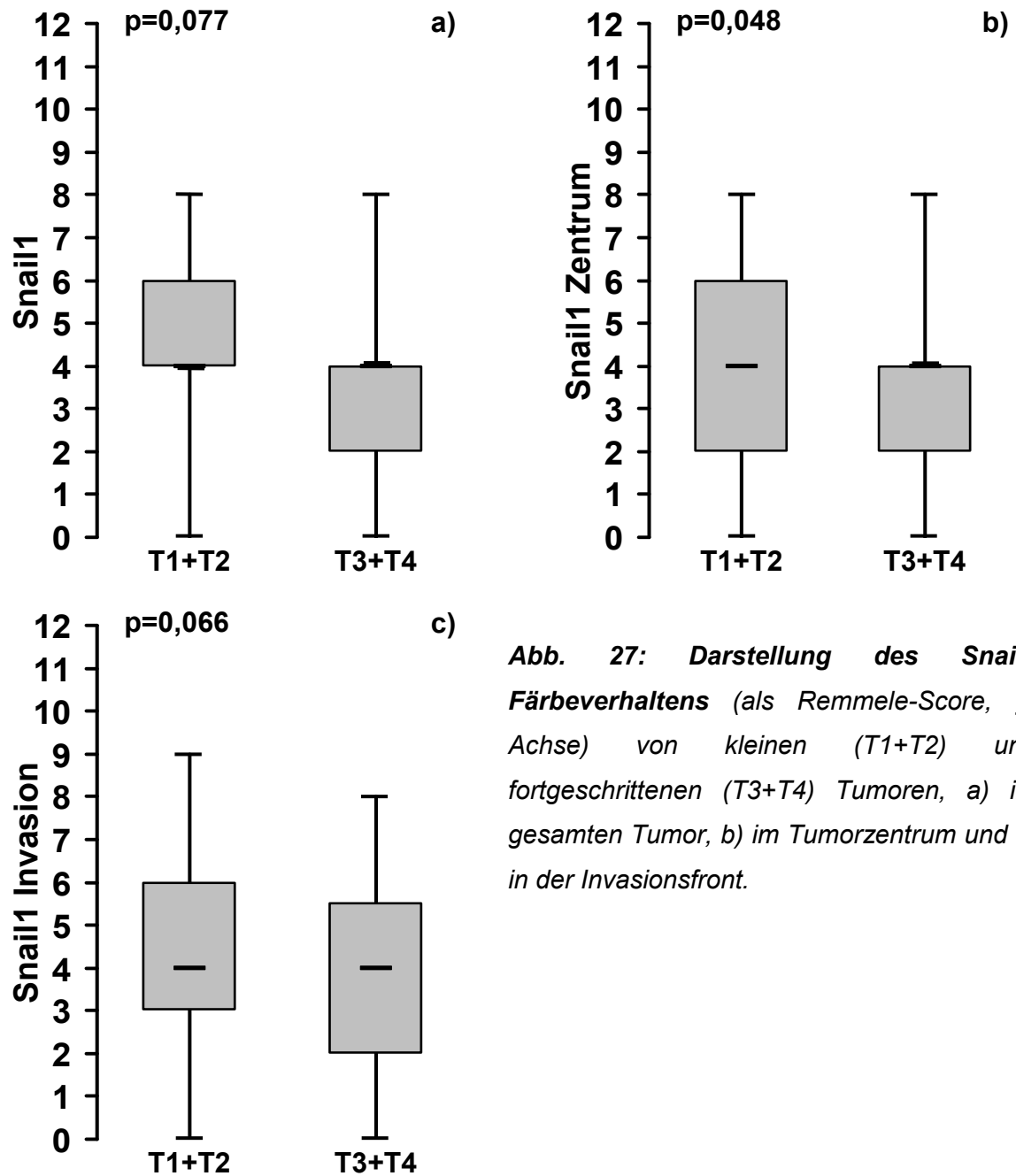


Abb. 27: Darstellung des Snail1 Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) von kleinen (T1+T2) und fortgeschrittenen (T3+T4) Tumoren, a) im gesamten Tumor, b) im Tumorzentrum und c) in der Invasionsfront.

Im Hinblick auf die N-Kategorie und das Tumorigradung (G) konnte keine Korrelation zur Snail1 Färbung festgestellt werden. Sowohl zwischen Lymphknotenmetastasen positiven (N1+N2) und Lymphknotenmetastasen negativen (N0), als auch zwischen *low grade* (G1+G2) und *high grade* (G3+G4) Tumoren ließ sich kein signifikanter Verteilungsunterschied der Snail1 positiven Tumoren feststellen ($p=0,42$, $p=0,17$).

Kleine Tumore (T1+T2) waren im Vergleich zu fortgeschrittenen Tumoren (T3+T4) signifikant öfter Ki-67 positiv ($p=0,038$). Bei den kleinen Tumoren (T1+T2) waren

93% (n=67/72) positiv für Ki-67, bei den fortgeschrittenen (T3+T4) waren es 89% (n=158/178). Im Kruskal-Wallis-Test konnte eine signifikante Differenz in der Verteilung der Ki-67 positiven Tumore hinsichtlich der T-Kategorien gezeigt werden ($p=0,014$) (**Abbildung 28**). Bei der getrennten Untersuchung der Tumorkompartimente mittels Kruskal-Wallis Test fand sich im Tumorzentrum ein signifikanter Verteilungsunterschied mit häufiger positiver Ki-67 Färbung bei geringerer T-Kategorie ($p=0,001$), während sich in der Invasionsfront kein signifikanter Unterschied zeigte ($p=0,42$).

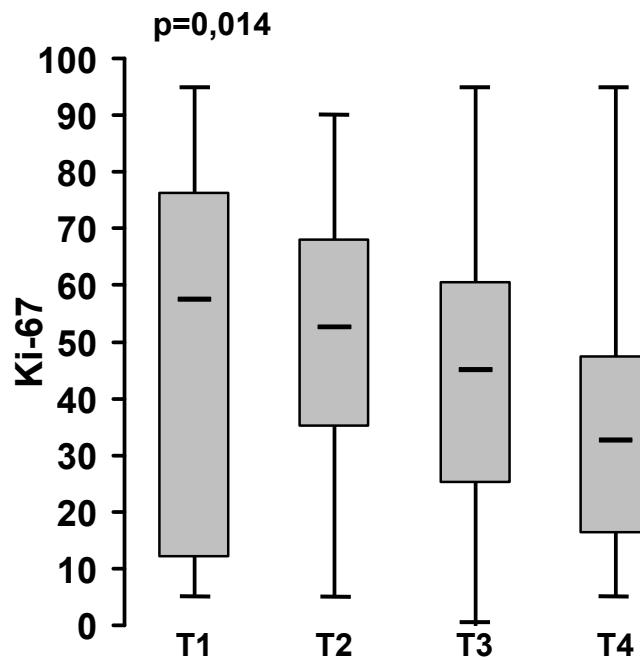


Abb. 28: Darstellung der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) und der T-Kategorie der Tumore (p -Wert=0,014; Kruskal-Wallis-Test).

Die *low grade* (G1+G2) und *high grade* (G3+G4) Tumore unterschieden sich in der Anzahl der E-Cadherin positiven Tumore signifikant ($p=0,03$). Dabei zeigte sich, dass eine positive E-Cadherin Färbung mit einem niedrigen Tumorgrading (G1+G2) korreliert (**Abbildung 29**). Von den *low grade* (G1+G2) Tumoren waren 63% E-Cadherin positiv (n=133/210), von den *high grade* (G3+G4) Tumoren nur 50% (n=20/40).

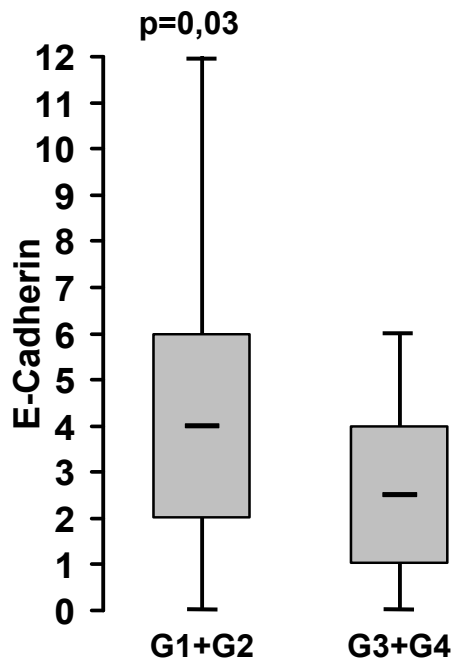


Abb. 29: Darstellung des E-Cadherin Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) bei gut (G1+G2) und schlecht (G3+G4) differenzierten Tumoren.

Bei der Korrelation des UICC-Stadiums mit der Snail1 Färbung ließ sich keine signifikante Korrelation feststellen ($p=0,19$). Die Ki-67 positiven Tumore korrelierten signifikant mit einem niedrigen UICC-Stadium ($p=0,03$). Bei der Untersuchung der E-Cadherin Färbung fand sich nur einen Trend zwischen niedrigem UICC-Stadium und positiver E-Cadherin Färbung ($p=0,08$).

4.2.6 Rolle der Lokalisation

Mit Hilfe der ICD-10 Kodierung wurde untersucht, ob die Tumorlokalisierung in einem Zusammenhang mit der Expression von Snail1, E-Cadherin und Ki-67 steht. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen linkem Kolon, rechtem Kolon und Rektum im Färbeverhalten der untersuchten Faktoren festgestellt werden ($p=0,55$, $p=0,28$, $p=0,38$). Jedoch korrelierte das UICC-Stadium signifikant mit der Lokalisation ($p=0,01$). Tumoren mit hohem UICC-Stadium befanden sich signifikant häufiger im rechten Kolon als im linken Kolon oder im Rektum.

4.2.7 Überlebensanalysen

Bei der Auswertung der Überlebenszeit wurde kein Einfluss von Snail1, E-Cadherin oder Ki-67 festgestellt (**Abbildung 30**). Auch in den Tumorkompartimenten Invasionsfront und Tumorzentrum zeigte sich kein Einfluss auf das Überleben.

Jedoch waren der Lymphknotenstatus (N-Kategorie), die Tumorgöße (T-Kategorie), das Grading (G) und das Alter bei Diagnose signifikante Einflussgrößen auf das Gesamtüberleben (*overall survival*) (**Abbildung 31**).

In der Cox-Regression zeigte sich allerdings bei der T-Kategorie kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die übrigen in der Kaplan-Meier Analyse signifikanten Einflussgrößen bestätigten sich jedoch. Der Lymphknotenstatus weist eine HR von 1,7 auf, das Grading eine HR von 1,6 und das Alter bei Diagnose eine HR von 3,3 (**Tabelle 10**).

Analyse	Maximum-Likelihood-Schätzer			COX-Prop.-Hazard Model		
	DF	Parameter-schätzer	Standard-fehler	Chi-Quadrat	Pr > ChiSq	Hazard-Quotient
Geschlecht	1	0.0052	0.1865	0.0008	0.9779	1.005
Alter	1	1.2005	0.2478	23.4800	<.0001	3.322
T	1	0.2791	0.1774	2.4751	0.1157	1.322
N	1	0.5559	0.1216	20.8888	<.0001	1.743
G	1	0.4415	0.2199	4.0318	0.0447	1.555

Tabelle 10: Cox-Regression des Gesamtüberlebens der TMA-Patienten nach Geschlecht, Alter bei Diagnose, Tumorausdehnung (T), Lymphknotenstatus (N) und Tumordifferenzierung (G). Der Hazard-Quotient (= Hazard-Ratio, HR) gibt das Risiko eines Ereignisses (hier Tod) im Vergleich zwischen zwei oder mehr Gruppen an. Rote Markierung bei signifikantem Einfluss auf das Überleben im Chi-Square-Test ($p < 0,05$).

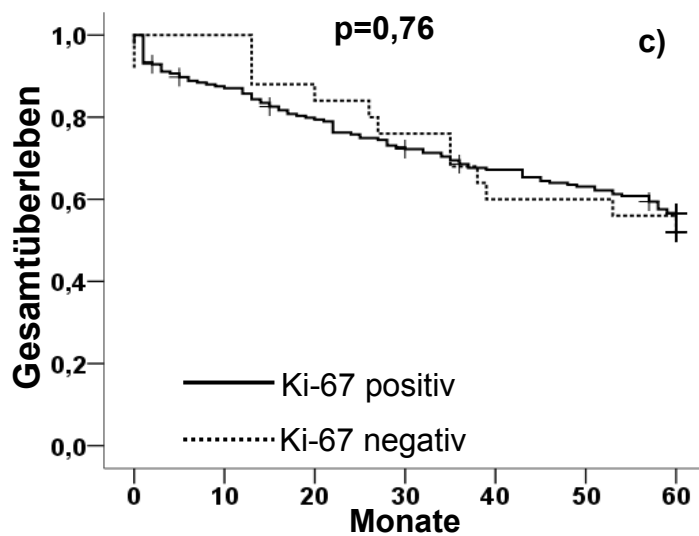
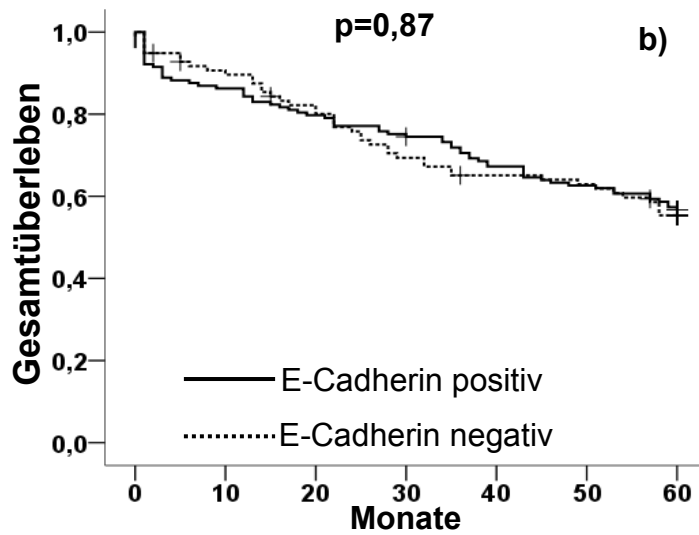
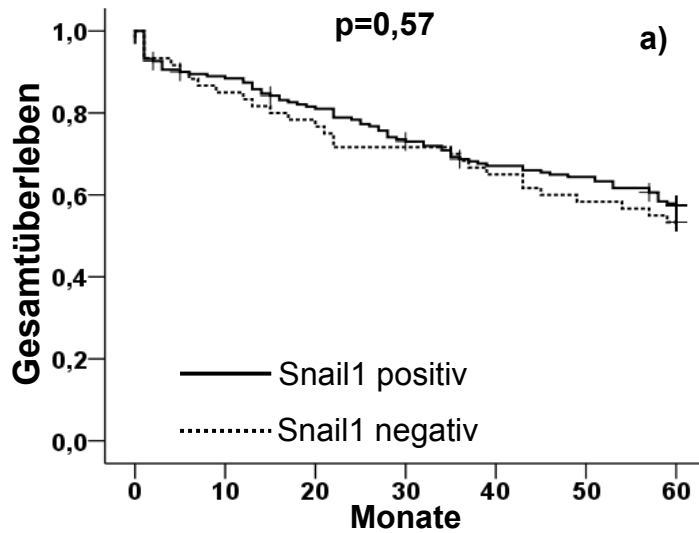
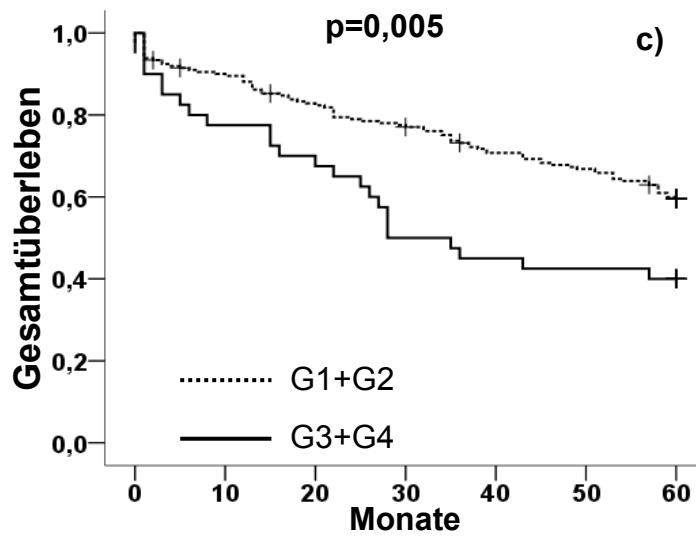
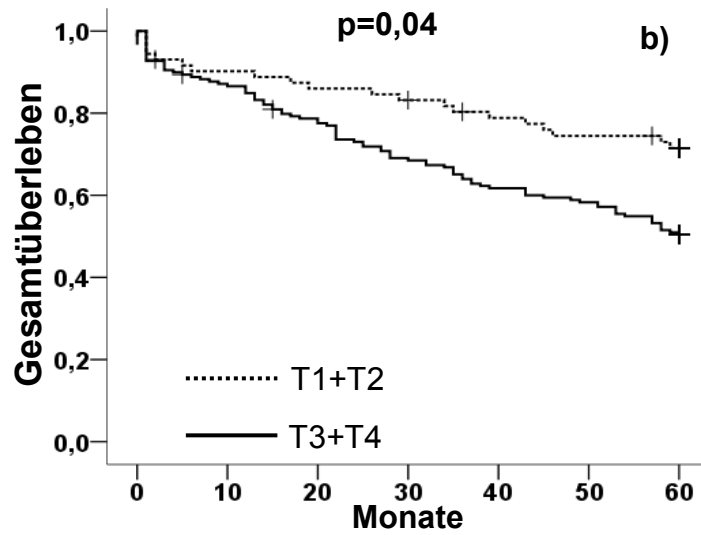
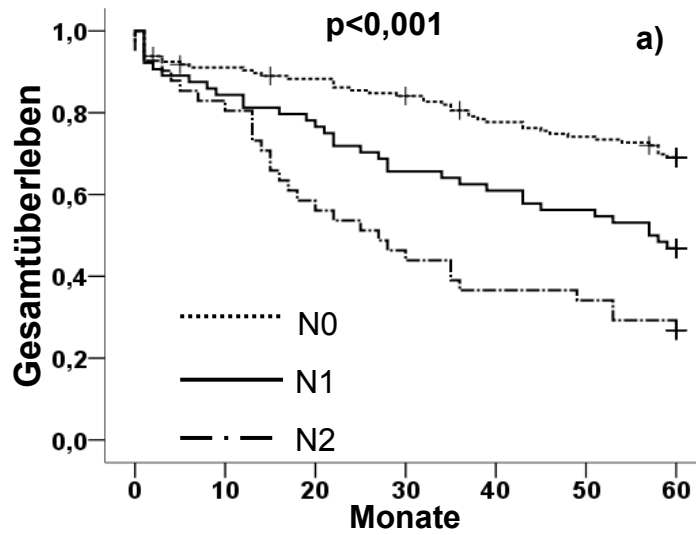


Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurven der TMA-Patienten. Dargestellt ist das Fünf-Jahres Gesamtüberleben in Monaten jeweils für a) Snail1 positive und negative, b) E-Cadherin positive und negative, und c) Ki-67 positive und negative Patienten. Es ist für keinen der Faktoren ein signifikanter Einfluss auf das Überleben sichtbar.

- Ergebnisse -



– Ergebnisse –

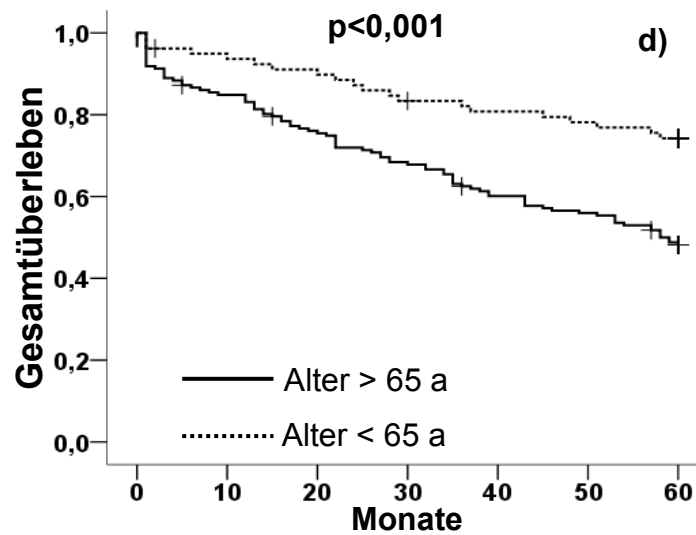


Abb. 31: Kaplan-Meier Kurven der TMA-Patienten. Dargestellt ist das Fünf-Jahres Gesamtüberleben in Monaten jeweils für a) den Lymphknotenstatus (N), b) die Tumorausdehnung (T), c) die Differenzierung des Tumors (G) und d) das Alter bei Diagnose. Alle vier Faktoren zeigen einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Vergleiche auch die Cox-Regression, **Tabelle 10**.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden 41 kolorektale Adenome mit Hilfe der quantitativen real-time PCR hinsichtlich ihrer relativen Expression von CDH1, CDH2, SNAI1, und TWIST1 mRNA untersucht. Dabei war die Arbeit der Gruppe um Rosivatz et al, die diese Faktoren in diffusen und intestinalen Magenkarzinomen untersuchten [56], eine wichtige Inspiration. Außerdem wurden die Ergebnisse aus der PCR für SNAI1/Snail1 und CDH1/E-Cadherin auch auf der Proteinebene mit Hilfe einer spezifischen immunhistochemischen Färbung validiert. Da bei den Adenomen ein signifikanter Einfluss von SNAI1 auf die E-Cadherin Expression festgestellt werden konnte, wurde dieser Zusammenhang auch bei 250 Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Hilfe eines *tissue micro arrays* untersucht. Zusätzlich wurde auch eine Ki-67 spezifische Färbung angefertigt, um zu eruieren, ob sich ein Einfluss von Snail1 auf die Proliferation der kolorektalen Karzinome feststellen lässt.

CDH1/E-Cadherin ist in Adenomen niedriger exprimiert als im Normalgewebe.

In 95% der Adenome war CDH1 mRNA nachweisbar. Die Expressionshöhe von CDH1 zeigte in den Adenomen eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Expression in der Normalmukosa. Die Expressionshöhe war vergleichbar mit der CDH1 Expression in kolorektalen Karzinomen. Dabei zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung bei den Adenomen eine starke Heterogenität, wie sie schon von vielen Autoren in kolorektalen Karzinomen [93-95] und anderen Entitäten beschrieben ist (Mamma- [96], Prostata- [39], Kopf- und Hals- [97] und Blasenkarzinome [37]).

Signifikanter Einfluss von SNAI1 auf die CDH1 Expression auf mRNA-Ebene.

Mit Hilfe der qRT PCR konnte in den Adenomen in einem hohen Prozentsatz die mRNA der Transkriptionsregulatoren SNAI1 und TWIST1 nachgewiesen werden. Diese wurde in normaler Kolonmukosa nicht exprimiert. Der Verlust von CDH1 mRNA korrelierte signifikant mit der Expression von SNAI1 mRNA. In 78% der Adenome konnte SNAI1 mRNA nachgewiesen werden. Diese Expression

korrelierte signifikant invers mit der Expression von CDH1 mRNA. Dieser inverse Zusammenhang wurde schon in vielen humanen Zelllinien [73, 98] und soliden Tumoren [99, 100] gefunden. Cano et al zeigten [78], dass Snail1 in murinen Zellen an die E-Box Region auf dem proximalen Ende des E-Cadherin Promotor bindet und so zur translationalen Repression von E-Cadherin führt. Diese Repression führte zum Verlust der Zellpolarität und einer veränderten, fibroblastenähnlichen Zellmorphologie. Auch nahmen die Mobilität und die Invasivität der Zellen deutlich zu [78]. In kolorektalen Karzinomen fanden Peña et al [101] eine inverse Korrelation zwischen Snail1 Expression und E-Cadherin Verlust. Im Gegensatz dazu fanden Rosivatz et al jedoch gar keine SNAI1 Expression in kolorektalen Karzinomen [61], untersuchten mit 25 Proben allerdings nur ein relativ kleines Kollektiv. Rosivatz et al [56] zeigten weiter, dass Snail1 zwar in diffusen Magenkarzinomen eine Rolle beim Verlust von E-Cadherin spielt, nicht jedoch beim intestinalen Magenkarzinom. Weitere Studien konnten Snail1 in soliden humanen Tumoren als wichtigen E-Cadherin Repressor und EMT-Induktor zeigen, so zum Beispiel in Mamma- [54, 102-104], Ovarial- [53] und Endometrium-Karzinomen [105]. Die bisher einzige Studie, die sich mit der Expression von Snail1 und Twist1 in intestinalen Adenomen beschäftigt, wurde von Chen et al [106] mit Hilfe eines Mausmodells durchgeführt. Dabei konnten die Autoren keinen Einfluss von Snail1 oder Twist1 auf die E-Cadherin Expression feststellen, untersuchten allerdings auch nur murine Adenome, die aus APC^{Min} Mäusen gewonnen wurden.

Einfluss von TWIST1 auf die CDH1 Expression auf mRNA-Ebene.

Auch Twist1 gehört zur Gruppe der transkriptionellen E-Cadherin Repressoren, wobei sein Wirkmechanismus nicht abschließend geklärt ist. Es ist fraglich, ob Twist1 auch wie Snail1 über eine direkte Bindung an eine E-Box bindet, oder indirekt über die Induktion von anderen Proteinen zur Herabregulation von E-Cadherin führt [56]. Twist1 ist ein wichtiger Induktor von N-Cadherin in der Tumorgenese [56] und während der embryonalen Entwicklung [107]. In verschiedenen Studien an humanen Tumoren, darunter Mamma- [41, 63], Prostata- [65], Blasen- [108] und Pankreas-Karzinome [109], Gliome [110], Sarkome [111] und T-Zell Lymphome [112], konnte Twist1 nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte in den Adenomen zwischen der mRNA des Transkriptionsfaktor TWIST1 und dem Verlust von CDH1 mRNA keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Auch in der schon erwähnten Untersuchung von Chen et al [106] an Adenomen von APC^{Min} Mäusen konnte keine Korrelation mit dem Verlust von E-Cadherin nachgewiesen werden. Bei Yang et al [63] zeigte sich im Mausmodell durch die Induktion von Twist1 in vitro ein E-Cadherin Verlust sowie durch die Suppression von Twist1 eine signifikante Reduktion der Metastasierung hochmaligner Mammakarzinome. In Mammakarzinomen vom aggressiven, invasiv-lobulären Typ zeigte sich eine signifikant höhere Twist1 Expression als in weniger aggressiven invasiv-duktalem Mammakarzinomen oder im Normalgewebe. Dies verdeutlicht, dass Twist1 bei der Metastasierung von Mammakarzinomen eine Rolle zu spielen scheint. Hüsemann et al [113] fanden schon bei Mäusen mit mammären Präkanzerosen disseminierte Zellen im Blutkreislauf. Dabei exprimierten die Zellen der Präkanzerosen signifikant öfter Twist1, als die Zellen maligner Tumore oder das Normalgewebe. Twist1 scheint also schon in der Frühphase der Karzinomentstehung und in diesem Zusammenhang wahrscheinlich bei der Intravasation [63, 113] wichtig zu sein.

CDH2 weist keine Korrelation zu CDH1, SNAI1 oder TWIST1 auf.

CDH2 mRNA konnte, niedrig exprimiert, in 42% der Adenome nachgewiesen werden. Das mesenchymale Zelladhäsionsprotein N-Cadherin ermöglicht Zellen die Interaktion mit Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und neuronalen Zellen [114, 115] und fördert beim Mamma- [116, 117] und Prostatakarzinom [114] die Metastasierung. Während der Gastrulation [107] und in vielen Zelllinien während der EMT [45, 118, 119] kann man einen Wechsel zwischen E-Cadherin und N-Cadherin Expression (*Cadherin-switch*) beobachten. In den Adenomen konnte in dieser Arbeit keine signifikante inverse Korrelation für die mRNA dieser Marker festgestellt werden. Dieser fehlende Zusammenhang könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Adenomen keine komplette EMT, sondern eine teilweise, so genannte *truncated EMT* [106], stattfindet. Diese *truncated EMT* zeichnet sich durch das Vorhandensein einiger typischer EMT Marker aus, wobei kein vollkommener Wechsel zu einem mesenchymalen Phänotyp beobachtet wird. Dies spiegelt sich bei den Adenomen in ihrem morphologisch eher epithelialen Phänotyp. Die Gruppe um Chen et al

[106] interpretierte die Beobachtung einer solchen *truncated EMT* in intestinalen Adenomen der Maus als Ausdruck der gesteigerten Gewebsplastizität und eines *tissue remodeling*. Des Weiteren konnten auch Rosivatz et al [61] in kolorektalen Karzinomen keinen Zusammenhang zwischen N-Cadherin Expression und TWIST1 oder SNAI1 mRNA feststellen.

Signifikante Korrelation der Co-Expression von SNAI1 und TWIST1 zu CDH1.

Snail1 als zinc-finger-protein und Twist1 als basic Helix-Loop-Helix Protein können wahrscheinlich über verschiedene Mechanismen [11, 63] zur transkriptionellen Repression von E-Cadherin führen. Interessanterweise fand sich bei der Co-Expression von SNAI1 und TWIST1 mRNA in den Adenomen eine hoch signifikante inverse Korrelation zur CDH1 Expression. Auch ist für Twist1 bekannt, dass es in Drosophila zur Induktion von Snail1 führen kann [120], was dort zu einer weiteren Repression von E-Cadherin führt.

Signifikante Korrelation zwischen der Expression in qRT-PCR und Färbung.

Da Rosivatz et al bei diffusen Magenkarzinomen eine Diskrepanz [52, 56, 61] zwischen der SNAI1/Snail1 Expression auf mRNA- und Proteinebene fanden, wurde in dieser Arbeit eine immunhistochemische Snail1 und E-Cadherin spezifische Färbungen der Adenome angefertigt. Für Twist1 war zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein spezifischer Antikörper im Handel erhältlich. Im Gegensatz zu Rosivatz et al [52] korrelierten die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, sowohl für Snail1 als auch für E-Cadherin, mit den Ergebnissen aus der PCR. Auch wiesen die in der PCR SNAI1 positiven Adenome in der Immunhistochemie eine signifikant verringerte E-Cadherin Expression auf, und umgekehrt. Damit konnte gezeigt werden, dass in den kolorektalen Adenomen für SNAI1/Snail1 und CDH1/E-Cadherin die Transkriptionsebene (mRNA) mit der Translationsebene (Immunhistochemie) korreliert.

Färbung der *tissue micro arrays*.

Da bei den Adenomen ein signifikanter Einfluss von SNAI1 auf den Verlust von E-Cadherin festgestellt werden konnte, wurde dieser Zusammenhang auch in kolorektalen Karzinomen untersucht. Dazu wurde ein schon bestehender *tissue*

micro array mit Gewebe von 251 Patienten benutzt. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung wurde die Expression von Snail1, E-Cadherin und Ki-67, einem Proliferationsmarker, untersucht. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Snail1 Expression in kolorektalen Karzinomen. Die Gruppe um Roy et al [121] fand bei 78% der untersuchten kolorektalen Karzinome eine positive Snail1 Färbung. Dabei wurde in der Studie von Roy et al nicht auf die genaue zelluläre Lokalisation der Snail1 Färbung (zytoplasmatisch versus nukleär) eingegangen. Auch bei Franci et al [122] waren in 79% der kolorektalen Karzinome nukleär Snail1 positive Zellen nachweisbar. Franci et al [123] stellten auch fest, dass Snail1 positive Zellen im Allgemeinen nicht mehr gegen E-Cadherin angefärbt werden konnten. Die Tatsache, dass Franci et al Snail1 positive Zellen meist an der Invasionsfront fanden [123], deckt sich dabei mit der Beobachtung, dass Snail1 besonders in aktivierten Fibroblasten, also mobilen Zellen - wie zum Beispiel in der Wundheilung [123] und in der Embryogenese [124] - gefunden wird. Um die Expression in den verschiedenen Tumorkompartimenten untersuchen zu können, wurden ein TMA mit je zwei Stenzen der Invasionsfront und zwei Stenzen des Tumorzentrums, sowie eine Stanze der normalen Kolonmukosa und einer Lymphknotenmetastase verwendet. In 76% der Kolonkarzinome fand sich eine nukleär positive Snail1 Färbung, während 39% der Karzinome negativ für E-Cadherin waren. Bei 13% der Karzinome konnte nach Auswertung mit dem Blechschmidt Score eine erhaltene E-Cadherin Expression festgestellt werden. Diese Karzinome schienen keine Herabregulation von E-Cadherin aufzuweisen. Die kolorektalen Karzinome wiesen insgesamt in 90% eine positive nukleäre Färbung für Ki-67 auf. Als Snail1 positiv wurden lediglich Zellen gewertet, die eine eindeutig nukleäre Snail1 Färbung aufwiesen. Auf die Auswertung der zytoplasmatisch Snail1 positiven Zellen wurde in dieser Arbeit verzichtet, da Zhou et al [48] zeigten, dass Snail1 durch die Phosphorylierung der nukleären Exportdomäne durch Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) aus dem Nukleus ausgeschleust und im Zytoplasma über Proteasome abgebaut wird [125, 126]. Da Snail1 in diesem Fall nicht seine Funktion als transkriptioneller Modulator wahrnehmen kann, war das Vorhandensein von zytoplasmatischem Snail1 für diese Untersuchung nicht von Interesse. Auch die Snail1 positiven Stromazellen wurden nicht gewertet. Eine positive E-Cadherin Färbung bestand in einer eindeutig membranären Expression, auch hier wurde

eine zytoplasmatische Färbung nicht als positiv gewertet. Für den Prozentsatz, ab welchem eine Probe als Ki-67 positiv gewertet wurde, wurde die Metaanalyse von de Azambuja et al [90] herangezogen. Im Normlagewebe konnten zum Teil einzelne Snail1 positive Zellen (siehe Abbildung 23, linke Spalte, mittleres Bild) in der Mukosa gefunden werden. Diese befanden sich stets in der basalen Zellschicht. Vermuten handelt es sich dabei um die physiologische Proliferation des Darmepithels, bei welcher die Zellen Mobilität erhalten.

Keine Korrelation zwischen Snail1 und E-Cadherin Verlust.

Auch wenn in vielen Studien gezeigt wurde, dass Snail1 als E-Cadherin Repressor wirkt [73, 78], und die Gruppe um Cano et al [78] diesen Zusammenhang bei humanen kolorektalen Zelllinien nachweisen konnte, fand sich in dieser Untersuchung kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Snail1 Expression und dem Verlust von E-Cadherin. Auch bei der getrennten Untersuchung der Tumorkompartimente, also der Invasionsfront und dem Tumorzentrum, konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen positiver Snail1 Färbung und Verlust von E-Cadherin festgestellt werden. In der Arbeit von Franci et al [123] wurde die Expression von Snail1 in kolorektalen Karzinomen besonders an der Invasionsfront gefunden. Zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront war hier jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Snail1 Färbung erkennbar. Dies könnte ein Nachteil der Auswertung von *tissue micro arrays* sein, da im Verhältnis zum gesamten Tumor nur relativ kleine Stenzen (Ø 0,5 mm) betrachtet werden. In verschiedenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Validität eines TMA mit zwei Stenzen pro Probe der Auswertung des gesamten Tumors gleichwertig ist [127, 128]. Zudem wurden in der vorliegenden Untersuchung vier Stenzen (zwei Invasionsfront und zwei Tumorzentrum) von jedem Patienten ausgewertet, um das Expressionsverhalten des gesamten Tumors bewerten zu können.

Snail1 positive Tumore korrelieren mit positiven Lymphknotenmetastasen.

In einigen humanen Tumoren korreliert Snail1 mit einer Zunahme der Invasion [121] sowie dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen [54]. In dieser Untersuchung fand sich keine Korrelation zwischen der N-Kategorie und der Snail1 Expression, jedoch waren die Lymphknotenmetastasen Snail1 positiver

Tumore signifikant häufig auch Snail1 positiv. Peinado et al [59] postulierten für Snail1 eine Initiatorrolle für den Beginn der Invasion, wobei es die Aktivierung anderer wichtiger EMT-Faktoren, wie Twist1 und der Zeb-Proteine, bewirkt. In den Lymphknotenmetastasen konnte - wie schon in den Primärtumoren - keine Korrelation zwischen Snail1 und E-Cadherin Verlust nachgewiesen werden.

Snail1 korreliert signifikant mit Ki-67 positiven Tumoren.

Bei der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Snail1 Färbung signifikant mit der Ki-67 Färbung korreliert. Auch bei der getrennten Untersuchung der Tumorkompartimente konnte dieser signifikante Zusammenhang zwischen Snail1 positiven und Ki-67 positiven Tumoren gefunden werden. Dieser Zusammenhang ist überraschend, wenn man die hemmende Wirkung von Snail1 auf den Zellzyklus betrachtet [57]. Vega et al [57] zeigten, dass Snail1 in caninen Zelllinien und bei Mäuse- und Hühnerembryos eine hemmende Wirkung sowohl auf die Proliferation als auch auf die Apoptoserate hatte. Dabei konnte die hemmende Wirkung auf die Proliferation allerdings durch mitogene Reize, so zum Beispiel durch TGF β , überwunden werden. Durch die Hemmung der Apoptose erhalten die Zellen, die eine EMT durchlaufen haben, einen Überlebensvorteil während der Migration durch „feindliche“ Umgebung [57].

In Tumoren ist die Proliferation jedoch eine wichtige Voraussetzung für das Tumorstadium. Es wurde in vielen Studien gezeigt, dass in Tumoren über autokrine Signalwege [129] und auch in Interaktion mit dem Stroma [130] Wachstumssignale ausgeschüttet werden, die somit auch den Snail1 induzierten Zellzyklus-Arrest aufheben könnten. So zeigten Olmeda et al [131], dass durch die Unterdrückung von Snail1 in humanen Mammakarzinom-Zelllinien mittel shRNA ein Wachstumsstopp und eine gesteigerte Nekroserate provoziert wurden. Snail1 als transkriptioneller Repressor bewirkt viele seiner Wirkungen indirekt durch die Repression von Aktivatoren oder Repressoren [79]. Da über die genaue Zusammenarbeit der vielen Signalwege in der Tumorstadium noch keine abschließende Klarheit herrscht [59], kann man von einer möglichen Modifikation der *downstream* Ziele von Snail1, abhängig von der Aktivität anderer Signalkaskaden, ausgehen. Eine solche Interaktion könnte die gesteigerte Proliferation bei Snail1 Expression in kolorektalen Karzinomen erklären.

Korrelation von Snail1 und TNM-Kategorie.

Weiterhin zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Snail1 und einer geringen T-Kategorie. Diese Korrelation war nicht signifikant, sondern stellte nur einen Trend dar. Bei der Untersuchung dieses Zusammenhangs in den Tumorkompartimenten zeigte sich jedoch, dass zwischen kleinen Tumoren (T1+T2) und fortgeschrittenen Tumoren (T3+T4) im Tumorzentrum ein signifikanter Unterschied in der Snail1 Expression besteht. Kleine Tumore exprimierten signifikant mehr Snail1 in ihrem Tumorzentrum als fortgeschrittene. In der Invasionsfront konnte dieser Unterschied zwischen kleinen und fortgeschrittenen Tumoren nicht beobachtet werden. Dies könnte mit einer nur transienten Aktivierung von Snail1 in Tumorzellen zusammenhängen, wie Moreno-Bueno et al [55] sowie Thiery et al [30] postulierten. Dabei würde Snail1 als Initiator der EMT verschiedene andere Transkriptionsfaktoren und Signalwege aktivieren und so an der Aufrechterhaltung der EMT nur indirekt mitwirken [30, 36, 59]. In fortgeschrittenen Tumoren könnten die Zellen im Tumorzentrum in ihrer Entwicklung älter sein als die Zellen an der Invasionsfront. Daher könnte im Tumorzentrum Snail1 als Initiator der EMT und wichtiger Faktor für die Invasion in angrenzendes Gewebe nicht mehr benötigt werden. Im Tumorzentrum großer, fortgeschrittener Tumore, in dem die EMT keine große Rolle für die Tumorprogression spielt, würden Snail1 und seine den Zellzyklus hemmende Wirkung demnach zu Gunsten einer Zellexpansion unterdrückt. In kleineren Tumoren liegt das Tumorzentrum auch noch nahe der Invasionsfront und die Zellen wären in ihrer Entwicklung jünger; folglich könnte deshalb noch mehr Snail1 im Zellkern vorhanden sein. In der Invasionsfront ist die Motilität der Zellen wichtiger als die Zellteilung, da nur so angrenzendes Gewebe invadiert werden kann. Vega et al [57] postulierten, dass Snail1 für die Erlangung eines möglichst malignen und mobilen Phänotyps durch Blockade der Apoptose und durch Aktivierung der EMT verantwortlich ist. Dafür wird in der Invasionsfront die ungehemmte Zellvermehrung zurückgestellt. Dieser Zusammenhang ist bei kleinen und fortgeschrittenen Tumoren gleichermaßen wichtig für die weitere Progression. Dies könnte die Grundlage für die Feststellung sein, dass es an der Invasionsfront zwischen kleinen und fortgeschrittenen Tumoren keinen Unterschied in der Snail1 Expression gibt. Bei der weiteren Untersuchung der histopathologischen Parameter konnte kein Zusammenhang zwischen Snail1 Expression und N-Kategorie oder Grading festgestellt werden. In die Studie

wurden nur M0 Patienten eingeschlossen, also Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen aufwiesen. Snail1 zeigte in dem Kollektiv keinen Einfluss auf den Lymphknotenstatus der Patienten. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Untersuchung von Franci et al [122], die bei CRC keine Assoziation zwischen histopathologischen Merkmalen und einer nukleären Snail1 Expression feststellen konnten. Roy et al [121] fanden eine Assoziation zwischen Snail1 positiven kolorektalen Tumoren und Fernmetastasierung. Dabei konnte aber auf Grund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz erreicht werden. Franci et al [122] fanden weiterhin einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Snail1 Expression im Tumorstroma, nicht im Tumorgewebe selbst, und der Fernmetastasierung. In anderen Entitäten ist der positive Zusammenhang von Snail1 und der Metastasierung besser untersucht, so beim Mamma- [54] und Ovarialkarzinom [53]. Die Arbeitsgruppe um Blanco et al [54] konnte beim Mammakarzinom auch einen Einfluss von Snail1 auf den Lymphknotenstatus und eine inverse Korrelation mit dem Grading feststellen. Auch auf das Grading hatte Snail1 allerdings in diesem Kollektiv keinen signifikanten Einfluss.

Korrelation von Ki-67 mit T-Kategorie.

Wie schon bei der Snail1 Färbung fand sich auch für die Ki-67 Färbung ein signifikanter Unterschied hinsichtlich kleiner und fortgeschrittener Tumore. Die kleinen Tumore waren signifikant häufiger Ki-67 positiv als die fortgeschrittenen. Auch in den Tumorkompartimenten zeigte sich in der Ki-67 Färbung dasselbe Bild wie in der Snail1 Färbung. Im Tumorzentrum kleiner Tumore konnten signifikant häufiger Ki-67 markierte Zellkerne gefunden werden, als in fortgeschrittenen Tumoren. In der Invasionsfront gab es keinen signifikanten Unterschied. Dies ist nicht überraschend, wenn man die signifikante Korrelation zwischen der Snail1 und der Ki-67 Färbung im gesamten Tumor bedenkt. Die Versorgung mit Nährstoffen ist im Zentrum fortgeschrittener Tumore meist auf Grund ihrer Größe und durch eine eingeschränkt Durchblutung schlechter als im Zentrum kleinerer Tumore. Dies äußert sich häufig durch Nekrosen im Tumorzentrum und könnte auch den Unterschied in der Proliferation zwischen dem Tumorzentrum kleiner und fortgeschrittener Tumore erklären.

Korrelation von Grading und E-Cadherin Expression.

Bei der weiteren Untersuchung der histopathologischen Merkmale zeigte sich, dass das Grading der Tumore negativ mit der E-Cadherin Expression korrelierte. Dieser Zusammenhang von E-Cadherin Verlust und Grading wurde schon bei anderen Entitäten nachgewiesen und gilt als ein Hauptmerkmal der malignen Entartung epithelialer Zellen [78, 132]. Durch den Verlust der Zelladhäsion ändert sich auch die Zellpolarität der epithelialen Zellen, was schon mikroskopisch als Zeichen einer Entdifferenzierung erkennbar ist. Dies ist eine Grundlage für das histologische Grading der Tumore.

Kein Einfluss von Snail1, Ki-67 oder E-Cadherin in der Überlebensanalyse.

Mit den *follow-up* Daten der Patienten wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt, um einen Einfluss der untersuchten Faktoren auf das Überleben nachweisen zu können. Bei keinem der untersuchten Faktoren, Snail1, Ki-67 oder E-Cadherin, konnte ein signifikanter Einfluss auf das 5-Jahres Überleben festgestellt werden. Auf Grund der vorhandenen Daten konnte nur das Gesamtüberleben untersucht werden, da nicht von allen Patienten die genaue Todesursache übermittelt wurde. Ob sich ein Einfluss von Snail1, Ki-67 oder E-Cadherin auf die tumorabhängige Sterberate feststellen ließe, bleibt somit unklar. In vielen Studien [53, 103, 133-136] zeigte sich aber, dass die Snail1 Expression ein Marker für eine schlechtere Prognose in verschiedenen Entitäten ist. Der negative Einfluss eines E-Cadherin Verlustes auf die Prognose und das Gesamtüberleben ist in der Arbeit von Tsanou et al [137] für das kolorektale Karzinom zusammengefasst. Dabei wird der Verlust dieses Zelladhäsionsmoleküls mit der Entdifferenzierung, der Invasion und einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht. Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde in verschiedenen Studien zum kolorektalen Karzinom untersucht. Dabei konnte in zwei großen Studien von Allegra et al [138] mit 465 Patienten und Jansson et al [139] mit 255 Patienten kein Einfluss auf die Prognose festgestellt werden. Nur bei Nabi et al [140] wurde bei der Untersuchung von 50 Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Korrelation zwischen hoher Ki-67 Expression und niedrigem Grading, niedrigem Dukes-Stadium und schlechter Prognose gefunden.

Alter bei Diagnose, Grading, T- und N-Kategorie waren signifikante Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben.

Signifikanten Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben in diesem Kollektiv waren das Alter bei Diagnose, die Tumorausdehnung (T-Kategorie), der Lymphknotenstatus (N-Kategorie) und das Grading. Diese Ergebnisse entsprechen der allgemeinen Literatur [141, 142] hinsichtlich des Einflusses histopathologischer Marker auf das Überleben bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es zeigt sich somit, dass das untersuchte Kollektiv sich nicht grundsätzlich von anderen Kollektiven unterscheidet.

6 Ausblick

Vorherige Studien haben einen Zusammenhang zwischen der EMT und ihren Induktoren und einer schlechten Prognose für Krebspatienten, nicht nur mit kolorektalem Karzinom, postuliert. Die durch die EMT ermöglichte Änderung des Phänotyps der Krebszellen, hin zu Invasion und Motilität, sind grundlegende Schritte für die Metastasierung [78]. Die weitere Erforschung und möglicherweise therapeutische Beeinflussung dieses Zellprogramms ist für die Aussicht auf eine endgültige Heilung von großem Interesse. Noch immer ist die Metastasierung die häufigste Todesursache von Krebspatienten. Über die wirksame Kontrolle der EMT könnte eine Metastasierung verhindert und damit durch die Resektion eine vollkommene Heilung erreicht werden. In Studien [143] konnte die Wirksamkeit des PDGF-Rezeptor Blockers Glivec® bei der Hemmung der EMT und damit der Metastasierung von Mammakarzinomen im Mausmodell gezeigt werden. PDGF und der PDGF-Rezeptor führen über autokrine Signalwege zur Aufrechterhaltung einer EMT. Auch über die Blockade des TGF β -Signalweges, der zur Aktivierung von Snail1 [144], Twist1 [82] und der EMT [145] führt, könnte die Metastasierung gehemmt werden [146].

Es wird immer offensichtlicher, dass die an der Aktivierung der EMT beteiligten Faktoren, wie Snail1 und Twist1, auch an anderen für die Progression maligner Erkrankungen wichtigen Signalwegen beteiligt sind. So kann die Apoptosehemmung durch Snail1 und Twist1 zum Überleben von Krebszellen bei Bestrahlung und Chemotherapie beitragen, wie in verschiedenen Studien schon gezeigt wurde [66, 80, 147]. Auch die Überwindung der Seneszenz durch Twist1 könnte das Reaktivieren lange inaktiver Mikrometastasen fördern und so eine Erklärung für die mitunter lange Latenz zwischen Resektion und Metastase liefern [11].

Insgesamt sind die EMT und ihre Induktoren, darunter Snail1 und Twist1, attraktive Ziele für die Therapie und Prävention von Karzinomen und deren Metastasen. Dabei muss noch viel über die komplexe Verkettung der einzelnen Signalwege und deren Zielstrukturen herausgefunden werden, um eine möglichst genaue Steuerung dieses wichtigen Zellprogramms zu erreichen. Auch die Abhängigkeit dieser Zielstrukturen von verschiedenen Geweben und die

Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten bedürfen weiterer Untersuchungen. Ein möglicher Einfluss auf die maligne Progression der kolorektalen Adenome durch die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren ist ein interessanter Ansatz für prospektive Studien. Auch die klinische Relevanz der hier gezeigten Expression von EMT-Initiatoren in diesen Läsionen muss noch in zukünftigen Studien untersucht werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AK	Antikörper
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Aqua Dest.	Destilliertes Wasser, aqua destillata
bHLH-Protein	<i>basic-helix-loop-helix</i> Protein
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CI	Konfidenzintervall
CRC	kolorektales Karzinom
Ct	<i>threshold cycle</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC-Protein	<i>Deleted in colorectal Carcinoma</i> -Protein
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Effizienz
E260	Extinktion bei 260nm
E-Box	<i>Enhancer</i> -Box, DNA-Bindungsregion
E-Cad	E-Cadherin
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
FAM	6-Carboxyfluorescein-phosphoramidit
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FoxC2	<i>Forkhead box protein C2</i>
G	Tumorgrading
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
HGF	<i>Hepatocyt Growth Factor</i>
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>

– Abkürzungsverzeichnis –

HR	<i>Hazard Ratio</i>
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten V. 10
IgG1	Immunglobulin G1
IHC	immunhistochemische Färbung
IRS	Immunreaktivitäts-Score
LK	Lymphknoten
M	Metastasierung
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MAPKAPK2	<i>MAP Kinase-Activated Protein-Kinase 2</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
Met	Metastase
Min	Minute
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
N	Lymphknotenstatus
NG	Normalgewebe
OD	optische Dichte
Pak1	Serin/Threonin-Protein Kinase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PP	Prozentzahl positiver Zellen
prox.	proximal
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
Ras-Protein	<i>Rat sarcoma</i> -Protein
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
sec	Sekunde
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SI	Färbeintensität

– Abkürzungsverzeichnis –

T	Tumorausdehnung
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TNM	T=Tumor; N=Nodes; M=Metastasis
Tr	Tropfen
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
y	Jahre
Δ	Delta

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Vorgang der Metastasierung.** Rote Zellen entsprechen Tumorgewebe. Im Primärtumor (ganz links) durchlaufen Zellen die EMT. Dies ermöglicht die Invasion von umgebendem Gewebe (blau) und die Intravasation in abführende Blut- und Lymphgefäße. Am Ort der Extravasation können die Zellen eine MET durchlaufen und Makrometastasen (ganz rechts) bilden. Modifiziert nach Huber et al, 2005 [11]. 2
- Abb. 2: Modell der Adenom-Karzinom Sequenz des kolorektalen Karzinoms.** Modifiziert nach Kullmann F, 2003 [19]. 4
- Abb. 3: Induktion der EMT.** Verlust der epithelialen Polarität und der Expression von E-Cadherin (E-Cad) durch die EMT führt zu einem motilen, invasiven, fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Transkriptionsfaktoren wie Snail1 und Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, TGF β) können diese EMT in Tumorzellen auslösen und zu einem E-Cadherin Verlust führen. Modifiziert nach Birchmeier W, 2005 [42]. 9
- Abb. 4: Aufbau von E-Cadherin.** Adhäsionskomplex zwischen zwei Zellen bestehend aus zwei E-Cadherin Molekülen (rot), je aus einer extrazellulären (ED), einer transmembranären (TD) und einer intrazellulären (ID) Domäne. Die ID ist über α - (α C) und β -Catenin (β C) sowie p120 mit dem Aktinskelett (AS) der Zelle verbunden. Modifiziert nach Pećina-Šlaus N, 2003 [44]. 11
- Abb. 5: Aufbau Snail1 und Twist1.** Schematische Darstellung eines Snail1 Proteins (links) sowie eines Twist1 Homodimers (rechts) und der jeweiligen Bindung an E-Box-Motive (blau) in der Promotor-Region eines Gens. Modifiziert nach Peinado et al 2007 [59]. 13

- Abb. 6: Aufbau des TMA.** Skizze: Jeweils zwei Patienten pro Zeile, insgesamt 20 Patienten pro TMA. Die ersten vier Spalten enthalten Tumorgewebe (je zwei vom Tumorzentrum, zwei aus der Invasionsfront), dann eine Stanze Normalgewebe (NG) und eine Stanze Lymphknoten-Metastase (LK Met). Die Kontrolle besteht aus Milz- und Plazenta-Gewebe. Foto: Aufsicht auf einen TMA-Block..... 23
- Abb. 7: Kurven der qRT PCR für ein Adenom.** Inlay: 96-Well PCR-Platte. Die Kurven zeigen für das jeweilige Gen-Produkt (CDH1, GAPDH, SNAI1, CDH2 und TWIST1) die Zunahme der Fluoreszenz (y-Achse) im Verlauf der PCR-Zyklen (x-Achse, „Zyklus“). Die gestrichelte Linie parallel zur x-Achse entspricht dem Grenzwert, welcher für jedes Gen-Produkt individuell bestimmt wurde. Wenn eine Senkrechte durch den Schnittpunkt von Grenzwert und Kurve gelegt wird, so entspricht der Schnittpunkt dieser Senkrechten mit der x-Achse dem Ct-Wert. Die Farben der Kurven entsprechen den Farben im Inlay. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt..... 29
- Abb. 8: Effizienzgeraden für die Primer** von GAPDH, CDH1, CDH2, SNAI1 und TWIST1. Aufgetragen ist der C_t -Wert gegen den Logarithmus der Verdünnung der Probe. Aus der Geradengleichung ($y = mx + c$) lässt sich die Steigung m errechnen. Durch Einsetzen dieser in die Gleichung $E = 10^{-\frac{1}{m}}$ lässt sich die Effizienz (E) der PCR errechnen..... 32
- Abb. 9: Schema der ABC-Färbung.** Bild 1: Der primäre Antikörper bindet an ein spezifisches Antigen. Bild 2: Der sekundäre, Biotin-beladene Antikörper bindet an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Bild 3: Der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex bindet an das Biotin des sekundären Antikörpers. Bild 4: Nach Zugabe des DAB-Substrates wird DAB durch die Peroxidase zu braunem Farbstoff oxidiert. 34

- Abb. 10: Vergleich der relativen CDH1 mRNA Expression** (in $\Delta\Delta C_t$ Werten, y-Achse) zwischen kolorektaler Normalmukosa, Adenom- und Karzinomgewebe. Dabei fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen Adenom-gewebe und Normalmukosa ($p=0,035$). Jeder Punkt entspricht einer Probe, Median in rot. 43
- Abb. 11: Relative CDH1 mRNA Expression** (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in SNAI1 positiven und negativen Adenomen (links) und TWIST1 positiven und negativen Adenomen (rechts) (p -Wert nach Mann-Whitney-U Test)..... 44
- Abb. 12: Relative CDH1 mRNA Expression** (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in Adenomen mit und ohne Co-Expression von SNAI1 und TWIST1 ($p=0,003$, Mann-Whitney-U Test). 45
- Abb. 13: Relative Expression der CDH1 mRNA** (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in CDH2 positiven und negativen Adenomen ($p=0,241$, Mann-Whitney-U Test)..... 46
- Abb. 14: Relative CDH2 mRNA Expression** (als $\Delta\Delta C_t$ -Wert, y-Achse) in SNAI1 positiven und negativen Adenomen (links) und TWIST1 positiven und negativen Adenomen (rechts) (p -Werte nach Mann-Whitney-U Test)..... 47
- Abb. 15: E-Cadherin im Adenom.** Übersicht (40x) eines E-Cadherin gefärbten Adenoms mit Anteilen normaler Mukosa. Fenster (1): Vergrößerung der normalen Mukosa (400x) mit stark positiver membranärer E-Cadherin Färbung. Fenster (2): Vergrößerung eines Adenomanteils (400x) mit schwacher membranärer E-Cadherin Färbung. Maßstab: 1mm (40x) bzw. 100 μ m (400x). 48
- Abb. 16: E-Cadherin Färbung** (100x), oben: stark E-Cadherin positive Normal-mukosa, unten: schwach E-Cadherin positives

- Adenom-gewebe. Fenster: jeweils Negativ-Kontrolle der Antikörper. Maßstab: 100 μ m. 49
- Abb. 17: Snail1 Färbung (oben) und Negativ-Kontrolle (unten) eines Adenoms (100x).** Fenster: Vergrößerung Snail1 negativer (1) bzw. positiver (2) Anteile des Adenoms (400x). Pfeile zeigen Snail1 positive Zellkerne an. Maßstab: 100 μ m. 50
- Abb. 18: Korrelation mRNA Gehalt mit Färbeverhalten** a): Korrelation der relativen CDH1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem E-Cadherin spezifischen Färbe-verhalten der Adenome. b): Korrelation der relativen SNAI1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem Snail1 spezifischen Färbeverhalten der Adenome. c): Korrelation der relativen CDH1 mRNA Expression ($\Delta\Delta C_t$, y-Achse) mit dem Snail1 spezifischen Färbeverhalten der Adenome. Median in rot. 51
- Abb. 19: Korrelation SNAI1 PCR mit E-Cadherin Färbung.** Anteil (%) der in der PCR SNAI1 positiven (schwarz) oder negativen (weiß) Adenome an den in der Immunhistochemie E-Cadherin positiven oder negativen Adenomen..... 52
- Abb. 20: TMA kolorektale Karzinome, Tumorzentrum.** Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100 μ m..... 53
- Abb. 21: TMA kolorektale Karzinome, Invasionsfront.** Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der

Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100µm.....	54
Abb. 22: TMA kolorektale Karzinome, Lymphknotenmetastase. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100µm.	55
Abb. 23: TMA kolorektale Karzinome, Normalgewebe. Linke Spalte: Snail1 Färbung; mittlere Spalte: E-Cadherin Färbung; rechte Spalte: Ki-67 Färbung. Jeweils Übersicht (100x, obere Reihe) und Vergrößerung (400x, mittlere Reihe) der Färbung sowie Vergrößerung der Negativ-Kontrolle (400x, untere Reihe). Der Pfeil in der mittleren Reihe zeigt jeweils auf eine positive Zelle (nukleär für Snail1 und Ki-67, membranär für E-Cadherin). Maßstab: 100µm.....	56
Abb. 24: Boxplots des E-Cadherin Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) bei Snail1 positiven und Snail1 negativen Tumoren.	58
Abb. 25: Boxplots der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) bei Snail1 positiven und Snail1 negativen Tumoren.....	59
Abb. 26: Boxplot der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) bei E-Cadherin positiven und E-Cadherin negativen Tumoren.	60
Abb. 27: Darstellung des Snail1 Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) von kleinen (T1+T2) und fortgeschrittenen (T3+T4) Tumoren, a) im gesamten Tumor, b) im Tumorzentrum und c) in der Invasionsfront.	61

Abb. 28: Darstellung der Ki-67 positiven Zellen (in %, y-Achse) und der T-Kategorie der Tumore (p-Wert=0,014; Kruskal-Wallis-Test).....	62
Abb. 29: Darstellung des E-Cadherin Färbeverhaltens (als Remmele-Score, y-Achse) bei gut (G1+G2) und schlecht (G3+G4) differenzierten Tumoren.....	63
Abb. 30: Kaplan-Meier-Kurven der TMA-Patienten. Dargestellt ist das Fünf-Jahres Gesamtüberleben in Monaten jeweils für a) Snail1 positive und negative, b) E-Cadherin positive und negative, und c) Ki-67 positive und negative Patienten. Es ist für keinen der Faktoren ein signifikanter Einfluss auf das Überleben sichtbar.....	65
Abb. 31: Kaplan-Meier Kurven der TMA-Patienten. Dargestellt ist das Fünf-Jahres Gesamtüberleben in Monaten jeweils für a) den Lymphknotenstatus (N), b) die Tumorausdehnung (T), c) die Differenzierung des Tumors (G) und d) das Alter bei Diagnose. Alle vier Faktoren zeigen einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Vergleiche auch die Cox-Regression, Tabelle 10	67

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation nach TNM und Dukes, Stadien nach UICC , 7th Edition (2009).	5
Tabelle 2: Resektionverfahren des Kolonkarzinoms in Abhängigkeit der Lokalisation. Modifiziert nach Duale Reihe Chirurgie, 3. Auflage, 2008.....	7
Tabelle 3: Charakteristika der 35 Adenom-Patienten mit insgesamt 41 Adenomen	22

Tabelle 4: Einteilung der TMA-Patienten nach pTNM- und UICC-Kriterien [83]	22
Tabelle 5: Primer- und Sondensequenzen nach Rosivatz et al [56, 61] für die qRT PCR.....	28
Tabelle 6: Konzentrationen der für die Färbungen verwendeten Antikörper	36
Tabelle 7: Auswertung der Färbung nach IRS (Remmele Score). Der Score ist das Produkt von PP und SI und liegt zwischen 0 und 12. Ein Score von 0-2 wurden als negativ gewertet, ein Score ≥3 als positiv.....	38
Tabelle 8: Auswertung der Ki-67 Färbung. Die Anzahl positiver Zellen wurde in 5% Schritten ausgewertet. Als normal galten Werte ≤ 10%. Werte von 11% - 25% wurde als erhöhte Proliferation, Werte > 25% als stark erhöhte Proliferation gewertet.....	39
Tabelle 9: Aufschlüsselung der histopathologischen Merkmale und des Färbeverhaltens des TMA-Patientenkollektiv	57
Tabelle 10: Cox-Regression des Gesamtüberlebens der TMA-Patienten nach Geschlecht, Alter bei Diagnose, Tumorausdehnung (T), Lymphknotenstatus (N) und Tumordifferenzierung (G). Der Hazard-Quotient (= Hazard-Ratio, HR) gibt das Risiko eines Ereignisses (hier Tod) im Vergleich zwischen zwei oder mehr Gruppen an. Rote Markierung bei signifikantem Einfluss auf das Überleben im Chi-Square-Test ($p < 0,05$).....	64

10 Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995*. Eur J Cancer, 2002. **38**(1): p. 99-166.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
3. Husmann, G., et al., *Krebs in Deutschland 2005/2006*. 2010(7. Auflage).
4. Winawer, S., et al., *Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 544-60.
5. Matthews, B.A., et al., *Objective risk, subjective risk, and colorectal cancer screening among a clinic sample*. Psychol Health Med, 2007. **12**(2): p. 135-47.
6. Fidler, I.J., *Critical determinants of metastasis*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(2): p. 89-96.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
8. Fidler, I.J. and I.R. Hart, *Recent observations on the pathogenesis of cancer metastasis*. Prog Clin Biol Res, 1982. **85 Pt B**: p. 601-19.
9. Hart, I.R. and I.J. Fidler, *The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology of cancer metastasis*. Biochim Biophys Acta, 1981. **651**(1): p. 37-50.
10. Zetter, B.R., *The cellular basis of site-specific tumor metastasis*. N Engl J Med, 1990. **322**(9): p. 605-12.
11. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 548-58.
12. Levin, B., et al., *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1570-95.
13. Winawer, S.J., et al., *Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 1977-81.
14. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
15. Arends, J.W., *Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma*. J Pathol, 2000. **190**(4): p. 412-6.
16. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. **127**(3): p. 469-80.
17. Brabletz, T., et al., *Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 744-9.
18. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. Br J Surg, 2002. **89**(7): p. 845-60.
19. Kullmann, F., *[Carcinogenesis and hereditart colon cancers]*. Internist (Berl), 2003. **44**(3): p. 254-5, 258-67.

20. Quirke, P., et al., *The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate?* Lancet Oncol, 2007. **8**(7): p. 651-7.
21. Chang, A., et al., *Oncology, Chapter 42: Colon, Rectal, and Anal Cancer Management*. 2006(Section Five, Chapter 42): p. 711-739.
22. Morse, M.A., *Adjuvant therapy of colon cancer: current status and future developments*. Clin Colon Rectal Surg, 2005. **18**(3): p. 224-31.
23. Schmiegel, W., et al., *[Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(8): p. 799-840.
24. Kleespies, A., et al., *Determinants of morbidity and survival after elective non-curative resection of stage IV colon and rectal cancer*. Int J Colorectal Dis, 2009. **24**(9): p. 1097-109.
25. Sebag-Montefiore, D., et al., *Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial*. Lancet, 2009. **373**(9666): p. 811-20.
26. Sauer, R., et al., *Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(17): p. 1731-40.
27. Cunningham, D., et al., *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(4): p. 337-45.
28. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 145-7.
29. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
30. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
31. Hay, E.D., *Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo*. Epithelial–Mesenchymal Interactions, ed. R.F.a.R.E. Billingham. 1968, Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins Co. 31–55.
32. Trelstad, R.L., E.D. Hay, and J.D. Revel, *Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo*. Dev Biol, 1967. **16**(1): p. 78-106.
33. Trelstad, R.L., J.P. Revel, and E.D. Hay, *Tight junctions between cells in the early chick embryo as visualized with the electron microscopy*. J Cell Biol, 1966. **31**(1): p. C6-10.
34. Stoker, M. and M. Perryman, *An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts*. J Cell Sci, 1985. **77**: p. 209-23.
35. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-34.
36. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 740-6.
37. Bringuier, P.P., et al., *Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors*. Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3241-5.
38. Dorudi, S., et al., *Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome*. Br J Cancer, 1995. **71**(3): p. 614-6.

39. Umbas, R., et al., *Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer*. *Cancer Res*, 1994. **54**(14): p. 3929-33.
40. Uchikado, Y., et al., *Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer*. *Gastric Cancer*. **14**(1): p. 41-9.
41. Mironchik, Y., et al., *Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 10801-9.
42. Birchmeier, W., *Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(5): p. 413-7.
43. Volk, T., O. Cohen, and B. Geiger, *Formation of heterotypic adherens-type junctions between L-CAM-containing liver cells and A-CAM-containing lens cells*. *Cell*, 1987. **50**(6): p. 987-94.
44. Pecina-Slaus, N., *Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells*. *Cancer Cell Int*, 2003. **3**(1): p. 17.
45. Cavallaro, U., B. Schaffhauser, and G. Christofori, *Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?* *Cancer Lett*, 2002. **176**(2): p. 123-8.
46. Islam, S., et al., *Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1643-54.
47. Carver, E.A., et al., *The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(23): p. 8184-8.
48. Zhou, B.P., et al., *Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(10): p. 931-40.
49. Dominguez, D., et al., *Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(14): p. 5078-89.
50. Yamashita, S., et al., *Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 298-302.
51. Yang, Z., et al., *Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3179-84.
52. Becker, K.F., et al., *Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers*. *Cells Tissues Organs*, 2007. **185**(1-3): p. 204-12.
53. Elloul, S., et al., *Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma*. *Cancer*, 2005. **103**(8): p. 1631-43.
54. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. *Oncogene*, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
55. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. *Oncogene*, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
56. Rosivatz, E., et al., *Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(5): p. 1881-91.

57. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev, 2004. **18**(10): p. 1131-43.
58. Kajita, M., K.N. McClinic, and P.A. Wade, *Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7559-66.
59. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
60. Chen, Z.F. and R.R. Behringer, *twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis*. Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 686-99.
61. Rosivatz, E., et al., *Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers*. Int J Cancer, 2004. **111**(5): p. 711-9.
62. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 818-29.
63. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
64. Howard, T.D., et al., *Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 36-41.
65. Kwok, W.K., et al., *Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5153-62.
66. Wang, X., et al., *Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 474-82.
67. Hsu, M.Y., et al., *E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1515-25.
68. Wijnhoven, B.P., W.N. Dinjens, and M. Pignatelli, *E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer*. Br J Surg, 2000. **87**(8): p. 992-1005.
69. Gagliardi, G., et al., *Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel*. Virchows Arch, 1995. **426**(2): p. 149-54.
70. Berx, G., et al., *Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene*. Hum Mutat, 1998. **12**(4): p. 226-37.
71. Debruyne, P., S. Vermeulen, and M. Mareel, *The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer*. Acta Gastroenterol Belg, 1999. **62**(4): p. 393-402.
72. Garinis, G.A., et al., *Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas*. J Pathol, 2002. **198**(4): p. 442-9.
73. Battle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
74. Efstathiou, J.A., et al., *Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2316-21.

75. Larriba, M.J., et al., *The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(1): p. 141-51.
76. Brabletz, T., A. Jung, and T. Kirchner, *Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer*. *Virchows Arch*, 2002. **441**(1): p. 1-11.
77. Wheeler, J.M., et al., *Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer*. *Gut*, 2001. **48**(3): p. 367-71.
78. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(2): p. 76-83.
79. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. *Development*, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
80. Escrava, M., et al., *Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(5): p. 1528-40.
81. Pena, C., et al., *The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas*. *Int J Cancer*, 2006. **119**(9): p. 2098-104.
82. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(1): p. 79-89.
83. Wittekind, C., et al., *TNM residual tumor classification revisited*. *Cancer*, 2002. **94**(9): p. 2511-6.
84. Nocito, A., et al., *Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(1): p. 1-5.
85. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(2): p. 581-5.
86. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
87. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
88. Remmele, W., et al., *Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1986. **409**(2): p. 127-47.
89. Blehshmidt, K., et al., *The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(2): p. 489-95.
90. de Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
91. Carpenter, J. and J. Bithell, *Bootstrap confidence intervals: when, which, what? A practical guide for medical statisticians*. *Stat Med*, 2000. **19**(9): p. 1141-64.

92. Kirkwood, B.R. and J.A.C. Sterne, *Essential medical statistics*. 2nd ed. 2003, Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
93. Batistatou, A., et al., *Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma*. *Virchows Arch*, 2006. **448**(6): p. 763-7.
94. El-Bahrawy, M.A., et al., *The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma*. *Hum Pathol*, 2001. **32**(11): p. 1216-24.
95. Dorudi, S., et al., *E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study*. *Am J Pathol*, 1993. **142**(4): p. 981-6.
96. Harigopal, M., et al., *Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma*. *World J Surg Oncol*, 2005. **3**: p. 73.
97. Schipper, J.H., et al., *E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis*. *Cancer Res*, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6328-37.
98. Jiao, W., K. Miyazaki, and Y. Kitajima, *Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(1): p. 98-101.
99. Poser, I., et al., *Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24661-6.
100. Yokoyama, K., et al., *Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro*. *Oral Oncol*, 2001. **37**(1): p. 65-71.
101. Pena, C., et al., *SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue*. *Oncogene*, 2009. **28**(49): p. 4375-85.
102. Cheng, C.W., et al., *Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene*. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3814-23.
103. Moody, S.E., et al., *The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 197-209.
104. Come, C., et al., *Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5395-402.
105. Blehschmidt, K., et al., *The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas*. *Diagn Mol Pathol*, 2007. **16**(4): p. 222-8.
106. Chen, X., et al., *Intestinal adenomagenesis involves core molecular signatures of the epithelial-mesenchymal transition*. *J Mol Histol*, 2008. **39**(3): p. 283-94.
107. Oda, H., S. Tsukita, and M. Takeichi, *Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during Drosophila gastrulation*. *Dev Biol*, 1998. **203**(2): p. 435-50.
108. Zhang, Z., et al., *Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(4): p. 598-606.
109. Ohuchida, K., et al., *Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(8): p. 1634-40.
110. Elias, M.C., et al., *TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion*. *Neoplasia*, 2005. **7**(9): p. 824-37.

111. Entz-Werle, N., et al., *Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas*. Int J Cancer, 2005. **117**(3): p. 349-55.
112. van Doorn, R., et al., *Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sezary syndrome identified by gene expression analysis*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5578-86.
113. Husemann, Y., et al., *Systemic spread is an early step in breast cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 58-68.
114. Tran, N.L., et al., *N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells*. Am J Pathol, 1999. **155**(3): p. 787-98.
115. De Wever, O. and M. Mareel, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 429-47.
116. Hazan, R.B., et al., *Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 779-90.
117. Hazan, R.B., et al., *N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma*. Cell Adhes Commun, 1997. **4**(6): p. 399-411.
118. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, *Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 873-87.
119. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 631-44.
120. Ip, Y.T., et al., *dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo*. Genes Dev, 1992. **6**(8): p. 1518-30.
121. Roy, H.K., et al., *The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer*. Dig Dis Sci, 2005. **50**(1): p. 42-6.
122. Franci, C., et al., *Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5595.
123. Franci, C., et al., *Expression of Snail protein in tumor-stroma interface*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5134-44.
124. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
125. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition*. J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 29-33.
126. Yook, J.I., et al., *A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1398-406.
127. Schraml, P., et al., *Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 1966-75.
128. Camp, R.L., L.A. Charette, and D.L. Rimm, *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest, 2000. **80**(12): p. 1943-9.
129. Hsu, S., et al., *Colon carcinoma cells switch their response to transforming growth factor beta 1 with tumor progression*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(3): p. 267-75.
130. Hartsough, M.T. and K.M. Mulder, *Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells*. Pharmacol Ther, 1997. **75**(1): p. 21-41.

131. Olmeda, D., et al., *SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(24): p. 11721-31.
132. Takeichi, M., *Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis*. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(5): p. 806-11.
133. Miyoshi, A., et al., *Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(2): p. 252-8.
134. Martin, T.A., et al., *Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2005. **12**(6): p. 488-96.
135. Toyama, T., et al., *Low expression of the snail gene is a good prognostic factor in node-negative invasive ductal carcinomas*. *Jpn J Clin Oncol*, 2006. **36**(6): p. 357-63.
136. Yang, M.H., et al., *Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(10): p. 1459-67.
137. Tsanou, E., et al., *The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach*. *Anticancer Res*, 2008. **28**(6A): p. 3815-26.
138. Allegra, C.J., et al., *Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(7): p. 1735-43.
139. Jansson, A. and X.F. Sun, *Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas*. *Apmis*, 1997. **105**(9): p. 730-4.
140. Nabi, U., A.H. Nagi, and W. Sami, *Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma*. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2008. **20**(4): p. 44-8.
141. Hermanek, P., *Colorectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging*. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 1989. **3**(3): p. 511-29.
142. de Leon M.P., D.G.C., *Pathology of colorectal cancer*. *Dig Liver Dis*, 2001. **33**(4): p. 372-88.
143. Jechlinger, M., et al., *Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1561-70.
144. Peinado, H., M. Quintanilla, and A. Cano, *Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(23): p. 21113-23.
145. Zavadil, J., et al., *Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition*. *Embo J*, 2004. **23**(5): p. 1155-65.
146. Yingling, J.M., K.L. Blanchard, and J.S. Sawyer, *Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(12): p. 1011-22.
147. Vichalkovski, A., et al., *PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage*. *Oncogene*, 2010. **29**(24): p. 3554-65.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Nikolas Stoecklein danke ich für die hervorragende und freundschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit. Seine Geduld und seine konstruktive Kritik haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Dem Team des Chirurgischen Forschungslabor, allen voran Svetlana Seidschner und Imke Hoffmann, gebührt ein ganz besondere Dank. Sie standen mir bei meinen ersten Schritten im Labor stets zur Seite und waren bei vielen Untersuchungen dieser Arbeit unerlässlich.

Frau Dr. med. Feride Kröpil möchte ich für ihre Betreuung dieser Arbeit in ihrer knapp bemessenen Freizeit danken, ich weiß Ihren Einsatz erst jetzt wahrlich zu schätzen, nachdem ich selbst angefangen habe, zu arbeiten.

Auch den Co-Autoren der Veröffentlichungen, in die Ergebnisse dieser Promotion eingeflossen sind, gebührt ein Dank für Ihre Mitarbeit.

Der Forschungskommission der Universitätsklinik Düsseldorf danke ich für das Vertrauen in diese Arbeit und die daraus resultierende finanzielle Unterstützung des Projektes. In diesem Zusammenhang danke ich nochmals Professor Dr. med. Stoecklein und Dr. med. Kröpil für die Antragstellung an die Forschungskommission.

Professor Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel danke ich für die Unterstützung bei der Teilnahme an diversen Kongressen, auf welchen ich meine Ergebnisse präsentieren durfte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und Eva, welche mir immer Mut zugesprochen haben und nie die Geduld verloren, auch wenn es Rückschläge gab.

Danke.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift