

Aus dem Pathologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

Validierung des Biomarkers Claudin-3 für das peritoneal
metastasierte Dickdarmkarzinom

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Julian Dullinger

aus

Altötting

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens H.L. Neumann

Mitberichterstatter:

PD Dr. med. Clemens Gießen-Jung

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Florian Bösch

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

07.07.2022

„Ohne Spekulation
gibt es keine neue Beobachtung.“

- Charles Darwin -

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den vielen Menschen danken, ohne die die Durchführung und das Schreiben dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für Unterstützung, Motivation und Förderung möchte ich danken:

Insbesondere meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Jens H. L. Neumann, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein offenes Ohr und eine offene Tür für etwaige Probleme hatte.

Meinen Betreuer PD Dr. med. Florian Bösch und dem ganzen Team in den Laboren der Pathologie der Standorte Innenstadt und Großhadern, ohne sie wäre die Zusammenstellung des Kollektivs und der Färbungen nicht möglich gewesen.

Auch ein großes Dankeschön für die Zusammenarbeit mit meinen Mitdoktoranten Meliha Wasem und Sven Jakob.

Vor allem aber den Kolleginnen Frau Andrea Sendlhofert und Frau Anja Heier die das Schneiden und immunhistochemische Färben der Blöcke durchgeführt haben.

Zusätzlich noch meiner Familie und Freunden für den Zuspruch und die moralische Unterstützung bei der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Aus dem Pathologischen Institut der	1
Ludwig-Maximilians-Universität München	1
Vorstand: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen	1
1 Einleitung.....	6
1.1 Aktuelle Epidemiologie und Bedeutung des kolorektalen Karzinoms (KRK).....	6
1.2 Diagnostik, Staging und Therapie.....	6
1.3 Entstehung des kolorektalen Karzinoms	7
1.4 Entstehung der Metastasen	9
1.5 Claudinfamilie und Tight Junctions	12
1.6 Entscheidung für Claudin-3 als Forschungsobjekt	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Erstellung der Kohorten	15
2.2 Durchführung der Immunhistochemie.....	15
2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	16
2.4 Statistische Methoden	18
3 Ergebnisse.....	19
3.1 Korrelation der allgemeinen Patientendaten	19
3.2 Überlebensfunktionen aller Kohorten	21
3.3 Vergleich der H-Scores	22
3.4 Vergleich der Gruppen mit Low- und High Claudin-3 Expression	23
3.5 Kaplan-Maier-Überlebenskurven der einzelnen Kohorten.....	25
4 Diskussion.....	27
4.1 Expression des Claudin-3 in kolorektalen Karzinoms.....	27
4.2 Einfluss des Claudin-3 auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms	29
4.3 Zusammenfassung und Ausblick	32
5 Literaturverzeichnis.....	33
6 Tabellenverzeichnis	40
7 Abbildungsverzeichnis	41
8 Abkürzungsverzeichnis	42
9 Eidesstattliche Versicherung	44

1 Einleitung

1.1 Aktuelle Epidemiologie und Bedeutung des kolorektalen Karzinoms (KRK)

Dickdarmkrebs ist seit vielen Jahren eine der Krebsarten mit der höchsten Prävalenz und Mortalität. Für das Jahr 2019 wurde von der American Cancer Society die Zahl der neuen KRKs auf 145600 und die daraus resultierenden Todesfälle auf 51020 allein in Amerika geschätzt.[1] Damit liegt die geschätzte Prävalenz auf Platz vier aller Karzinome. Dies wird nur von Lungen-, Brust- und Prostatakarzinomen übertroffen. Auch in Deutschland lagen die Zahlen im Jahr 2017 bei 23134 Todesfällen.[2] Es gibt jedoch eine rückläufige Tendenz: Das Robert Koch-Institut (RKI) berichtete im Jahr 2016, dass im Zeitraum von 2003 bis 2013 der aktuelle Trend der durchschnittlichen jährlichen Veränderung der altersstandardisierten Rate -2,0% bei den Frauen und -1,7% bei den Männern betrage. Die Mortalität sei sogar noch stärker gesunken um 3,1% bei den Frauen und 2,4% bei den Männern. Das RKI führt diesen Rückgang unter anderem auf die Verbesserung der sekundären Prävention durch die Einführung des Koloskopiescreenings ab dem 55. Lebensjahr seit Oktober 2002 zurück. Dadurch stieg die Rate der Adenome, die bereits im in-situ Stadium diagnostiziert wurden, was somit den Outcome für diese Patientengruppe verbesserte.[3]

1.2 Diagnostik, Staging und Therapie

Die Koloskopie ist der Goldstandard für das Screening der asymptomatischen Bevölkerung auf KRK. Das Alter bei der ersten Untersuchung und die Häufigkeit der Diagnostik wird von verschiedenen Risikofaktoren, wie dem Vorliegen einer FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) oder einem HNPCC-Syndrom (hereditäres, non-polypöses Kolonkarzinom) beeinflusst. Zum Staging und der präoperativen Untersuchung empfehlen die aktuellen S3-Leitlinien eine Abdomensonographie und eine konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax. Eine zusätzliche CT-Untersuchung (Computertomographieuntersuchung) ist bei

Verdacht auf Fernmetastasen oder Infiltration der Nachbarorgane indiziert.[4] Entscheidend für die Prognose und Therapieplanung ist die UICC (Union for International Cancer Control) TNM-Klassifikation. Dabei beschreibt das T (Tumor) die Eindringtiefe des Primarius in das Gewebe, das N (Nodus) den Lymphknotenbefall und das M (Metastasen) die Metastasen.[5] Die häufigsten Metastasierungsorte des KRK sind Thorax, Peritoneum, Leber, Nervensystem, Knochen und andere Organe des Gastrointestinaltrakts. Dabei hat der Ort der Metastasierung einen großen Einfluss auf den Outcome. Beispielsweise beschreibt eine Studie von Matias Riihimäki 2016, dass Patienten mit Fernmetastasen in der Leber ein medianes Überleben von 9 Monaten aufwiesen. Hingegen liege bei Patienten mit peritonealen Metastasen nur ein medianes Überleben von 7 Monaten vor.[6] Es gibt also eine starke Indikation dafür, dass der Ort und die Ausbreitung der Metastasen einen großen Einfluss auf die Therapieentscheidung haben. In der Regel wird bis auf wenige Ausnahmen eine chirurgische Resektion durchgeführt. Bei Patienten im Stadium IV mit ausgedehnten Lebermetastasen und asymptomatischen Primärtumor wird beispielsweise ohne Resektion des Primarius primär eine Chemotherapie durchgeführt. Die Entscheidung, ob eine neoadjuvante, adjuvante oder palliative Therapie von Nöten ist, ist ebenfalls von dem Stadium des Tumors und den Risikofaktoren des Patienten abhängig.[4, 7-11] Der Trend zur personalisierten Medizin nimmt zu. Es wird empfohlen bereits vor Therapiebeginn den Mutationsstatus von BRAF und RAS festzustellen, um eine möglichst wirksame und nebenwirkungsarme Therapie der Erkrankten zu ermöglichen.[4, 7, 12, 13]

1.3 Entstehung des kolorektalen Karzinoms

Bereits 1966 postulierte Morson B. C., dass KRKs aus einer Vorläuferläsion entstehen. Er nannte sie „Pre-invasive Carcinoma of the Rectum“.[14] In den darauf folgenden Jahren wurde weiter an diesem Ansatz geforscht und der Grundstein für die Theorie der „Adenom-Karzinom Sequenz“ gelegt.[15] Mittlerweile unterteilt man die Tumorgenese des KRK in zwei Pfade: Die Adenom-Karzinom Sequenz (AKS) und die serratierte Kanzerogenese.

Bei der AKS entsteht das Karzinom aus den tubulären, tubovillösen oder villösen Adenomen. Es ist eine dynamische Entwicklung, der eine Mutation des *APC*-Gens zu Grunde liegt. Darauf folgen weitere Mutationen von *P53* und *KRAS* und die Entwicklung einer chromosomalen Instabilität. Jedoch behalten die Zellen ihren stabilen Mikrosatelliten-Status.[11, 16, 17]

Das sessile, serratierte Adenom stellte sich als Vorläuferläsion der serratierten Kanzerogenese heraus. Die Mutation des *BRAF*-Gens spielt dabei eine Schlüsselrolle, die zusammen mit einer Methylierung von CpGs mehrere Genausfälle zur Folge hat und häufig eine Mikrosatelliteninstabilität mit sich zieht.[16, 17]

Eine weitere Möglichkeit ist die initiale Mutation im *KRAS*- Gen, die sowohl in der AKS, als auch in der serratierten Kanzerogenese auftreten kann. Diese geht ebenfalls mit weiteren Promotor-(CpG) Methylierungen und Genausfällen einher. Der Mikrosatellitenstatus kann stabil oder niedrig instabil sein.[17, 18]

1.4 Entstehung der Metastasen

Dass verschiedene Tumore unterschiedliche Organe für ihre Metastasierung bevorzugen ist gemeinhin bekannt. Auch das KRK bildet dabei keine Ausnahme. Besonders häufig findet man dabei Metastasen in Leber, Thorax, Peritoneum, Knochen, Nervensystem und anderen gastrointestinalen Organen.[6] Über die Ausbreitung der Metastasen sowie die konsekutive Infiltration von Fremdgeweben existieren unterschiedliche Theorien. Eine davon ist die „Seed and Soil“- Theorie, die S. Paget begründete. Sie besagt, dass sich der „Seed“ des Primarius nicht zufällig in den Organen niederlässt, sondern ein bestimmtes „Soil“, also die richtige Umgebung mit den passenden Voraussetzungen benötigt.[19, 20] Eine andere Theorie ist die anatomisch/mechanische Hypothese, die besagt, dass sich Ableger des Tumors, dem Blut-/Lymphfluss folgend mit größter Häufigkeit im nächsten Organ in Flussrichtung festsetzen.[20, 21]

Grundlegend müssen für eine Metastasierung jedoch drei Schritte durchlaufen werden:

Die Invasion des Tumors in das umliegende Gewebe, die Intravasation in Blut-/Lymphgefäße und die Extravasation um den Ort des neuen Befalls zu erreichen.[22]

Die EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und Wundheilung, aber auch bei vielen pathologischen Prozessen, Fibrosen und der Entstehung von Metastasen. Bei der Metastasierung ist sie von großer Bedeutung für den Vorgang der Migration von Zellen aus dem Primarius heraus, da dabei der epitheliale Zellphänotyp, der unter anderem von Zelladhäsionskomplexen wie den Tight Junctions (TJs) geprägt wird, verlassen wird. Somit wird eine Loslösung aus dem Primarius und eine Intravasation in die Blutgefäße ermöglicht. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Spektrum, das von keiner EMT (im soliden Primarius), teilweiser EMT, bis zu reiner EMT (vereinzelt vorkommend an der Invasionsfront) reicht.[23]

Die durch Intravasation entstehenden zirkulierenden Tumorzellen treten einzeln oder in Zellverbänden auf. Ein Großteil zirkulierender Tumorzellen besitzt zumindest einen intermediären EMT Phänotyp, das heißt vor allem in den Zellverbänden liegen nebeneinander sowohl Zellen vom epithelialen als auch vom mesenchymalen Phänotyp vor.

Um sich am Metastasierungsort anzusiedeln müssen sich Zellen vom mesenchymalen Typus jedoch zurück zu ihrem epithelialen Phänotyp umwandeln.[23]

Unter anderem wurde in Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen eine höhere Widerstandsfähigkeit der zirkulierenden Zellverbände gegen Apoptose und eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose gefunden.[24] Außerdem beschreiben einige Studien eine höhere Metastasierungsrate der Zellcluster im Vergleich zu den einzelnen zirkulierenden Zellen.[25, 26]

Um die EMT zu aktivieren ist ein Zusammenspiel vieler verschiedener Stoffe und Signalwege notwendig. Hierzu gehören beispielsweise die Transkriptionsfaktoren SNAI1 und SNAI2, TGF- β , BMP, RTK und Wnt.

GSK-3 β bildet einen Komplex mit Axin und APC. Dieser phosphoryliert β -Catenin und markiert es für den proteasomalen Abbau. Im Wnt/ β -Catenin Signalweg binden und aktivieren Wnt Liganden den plasmamembranständigen Frizzled-Rezeptor. Dies verursacht eine Deaktivierung der hemmenden Funktion von GSK-3 β auf β -Catenin. Dadurch kann β -Catenin in den Nucleus wandern und an Transkriptionsfaktoren (z.B. LEF-1) binden, welche die Exprimierung zahlreicher Gene auslöst, die für EMT von großer Bedeutung sind.[27, 28]

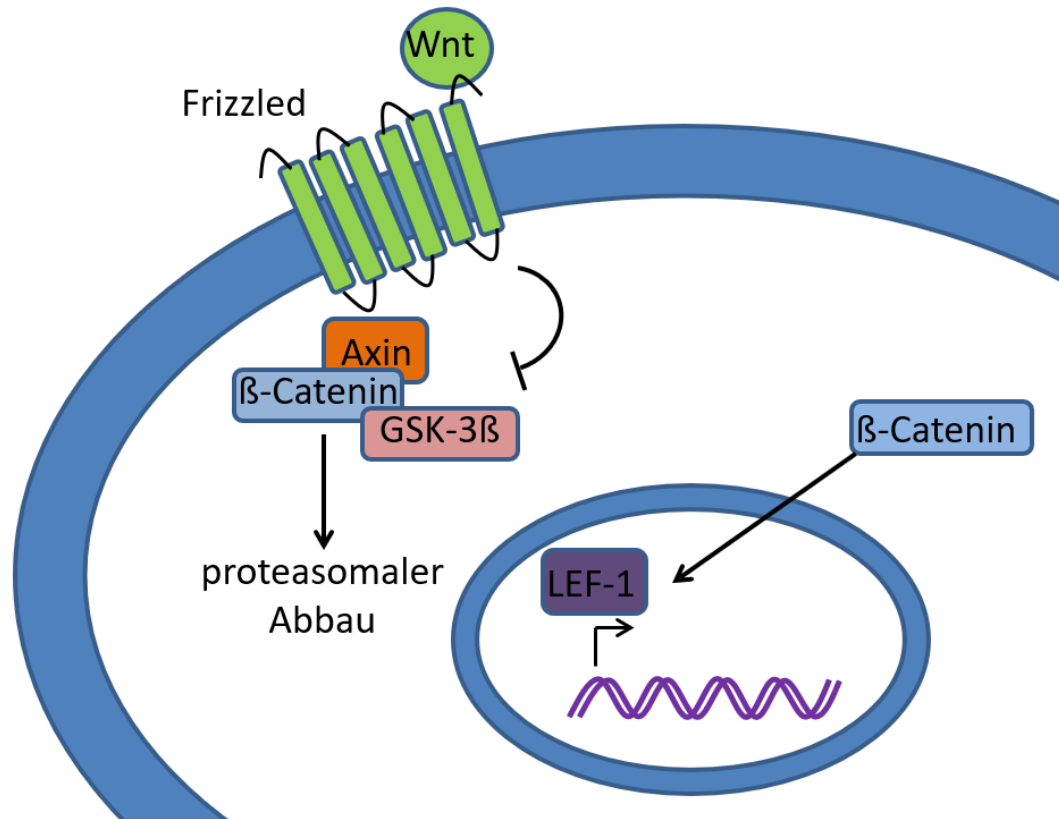


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs (modifiziert nach Gonzalez 2014 [27])

Letztendlich steht fest, dass Metastasierung ein Zusammenspiel von Zelladhäsion, Proteolyse, Migration, Lymph- und Angiogenese ist.[29-32] Alle diese Mechanismen sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.5 Claudinfamilie und Tight Junctions

Bei der Claudinfamilie handelt es sich um Transmembranproteine, die entscheidend für die Bildung und Aufrechterhaltung der TJs sind. Sie bestehen aus vier Transmembranhelices und ihre zwei extrazellulären Segmente beinhalten ein anti-paralleles Betafaltblatt. (s. Abb.2)[33]



Abbildung 2: Claudin-3 - Anfärbung entsprechend der Sekundärstruktur (RCSB Proteindatabank 2019 – gezeigt ist eine Claudineinheit der Struktur des Heterodimers mit CPE [34])

Die TJs sind von großer Bedeutung für Epithel- und Endothelzellen, da durch sie der interzelluläre Raum versiegelt wird und sie somit als Diffusionsbarriere für Plasmamembranlipide und Proteine dienen. Dies hilft dabei den apikalen und basolateralen Pol zu definieren und ermöglicht die Bildung von elektrischen und chemischen Gradienten. Zudem vermitteln TJs die Zell-Zell-Kontakte und verhindern Zellmigration. Weiterhin beeinflussen sie die Kommunikation zwischen den Zellen, helfen die Zellpolarität aufrecht zu erhalten und beeinflussen Zellwachstum und Proliferation.[22, 35]

Sie bestehen aus drei Komponenten:

Den IgG-like family of junctional adhesion molecules (JAMs), den Occludinen und den bereits genannten Claudinen.[36] JAMs interagieren häufig mit Integrinen und sind an vielen Prozessen wie Entzündung, Angiogenese, Hämostase und der Epithelbarrierenbildung beteiligt.[37] Occludine hingegen

sind weniger an der Bildung der TJs beteiligt, sondern an deren Aufrechterhaltung und deren Barrierefunktion, was wiederum eine wichtige Rolle in Entzündungsabläufen einnimmt.[36, 38]

Es existieren mindestens 27 verschiedene Claudine.[39-41] Diese Untertypen sind in verschiedenen Organen unterschiedlich stark exprimiert.[42-44] Der Ausfall einzelner Mitglieder hat bereits schwere Folgen. Beispielsweise führt das Fehlen von Claudin-1 zu sklerosierender Cholangitis[45], im Falle von Claudin-14 zu rezessiver Taubheit[46] und bei Claudin-16 zu familiärer Hypomagnesiämie[47].[43]

Die Konzentration der Claudine wird von vielen Faktoren beeinflusst. Auf Grund der gewebeabhängigen Expression mehrerer unterschiedlicher Claudine ist eine Interaktion zwischen den verschiedenen Klassen der Claudine wahrscheinlich, durch die die Zusammensetzung und somit die Permeabilität der TJs beeinflusst werden kann. Claudine interagieren dabei entweder lateral auf Membranebene (heterometrisch) oder zwischen zwei benachbarten Zellen (heterotyp).[48, 49] ZO-1 und ZO-2 sind weitere Proteine, die für die Bildung der TJs notwendig sind. Diese verankern die Claudine mit dem Aktinfilament der Zelle.[48, 50] Weiterhin wird die Claudinregulation von Phosphorylierung beeinflusst.[48] Beispielsweise durch die Phosphorylierung von Claudin-3 durch die Proteinkinase A wird die Stärke der TJ-Bindung in Ovarialkarzinomzellen geschwächt.[51] Auch verschiedene Entzündungsparameter wie Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ oder Interleukin-13 schwächen die Zell-Zellkontakte durch Beeinflussung der Claudine.[48]

Zudem wurde festgestellt, dass die Claudinuntertypen sowohl in Entzündungsreaktionen als auch in unterschiedlichen Tumoren sowohl hoch-, als auch herunterreguliert werden.[22, 28, 41, 43] Die Expressionen von Claudin-1 und Claudin-4 sind beispielsweise in Mammakarzinomen je nach Tumorart entweder gesteigert oder supprimiert. In Tumoren der Zervix, des Kolons, Rektums, Magens und in Melanomen beschreiben Studien ebenfalls eine Hochregulation. In hepatischen oder Prostatakarzinomen hingegen wird Claudin-1 verringert exprimiert. Claudin-4 verhält sich in diesen Geweben sehr ähnlich – allerdings ist es bei Prostatakarzinomen hochreguliert.[22, 52]

Auch wird vermutet, dass die Expression einzelner Claudine weitere Mitglieder ihrer Proteinfamilie beeinflussen können. Zum Beispiel wiesen Ip et al. mittels Real-Time PCR in Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms nach, dass eine vermehrte Claudin-10 Expression ebenfalls mit einer Hochregulation von Claudin-1, -2, und -4 einhergeht. Es herrscht ein Diskurs darüber, ob bereits durch Messung der Expression eines Claudins eine Aussage über den jeweiligen spezifischen Tumor abgeleitet werden kann.

Jiang et al. wiesen bereits 2014 nach, dass Claudin-3 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben von hepatozellulären Karzinomen betroffenen Patienten genutzt werden kann.[53] 2017 wiesen Worst et al. erhöhte Claudin-3 Werte in Prostatakarzinomen mit einem Gleason-Score ≥ 8 im Vergleich mit Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und Patienten mit einem Gleason-Score von 6-7 nach. Damit postulierten sie, dass Claudin-3 ein möglicher Biomarker des Prostatakarzinoms sein könnte.[54] Eine weitere Entdeckung machten Jääskeläinen et al. 2018. Ihre Daten zeigten, dass sowohl Claudin-3 als auch Claudin-7 als potenzieller prognostischer Faktor bei triple-negativem Mammakarzinom nutzbar wäre.[55]

1.6 Entscheidung für Claudin-3 als Forschungsobjekt

In vorausgehenden Studien der Arbeitsgruppe „Gastrointestinale Pathologie“ der Ludwig-Maximilians-Universität wurde der Biomarker Claudin-3 mittels Genexpressionsanalysen als vielversprechend bezüglich seiner Expression in KRKs mit unterschiedlichen Mutationslokalisationen ermittelt. Die Familie der Claudine hat sich bereits in multiplen Studien als vielversprechender Ansatzpunkt herausgestellt, um diverse Pathologien und vor allem die Entstehung, Metastasierung und das Outcome von verschiedenen Karzinomen zu erforschen. Besonders Claudin-3 war in mehreren Studien vielversprechend als potenzieller prognostischer Marker für das jeweilige Tumorgewebe. Es stellte sich daher die Frage, ob sich Claudin-3 als prospektiver Biomarker von KRKs eignet und ob man anhand der Expression frühzeitige Aussagen über das Metastasierungsverhalten des Primarius treffen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Erstellung der Kohorten

Die drei Kohorten ohne Metastase (M0), Lebermetastase (HEP) und Peritonealmetastase (PER) entstanden in Zusammenarbeit mit der Viszeralchirurgie und dem Pathologischen Institut der LMU München. Die 106 an KRK erkrankten Patienten, die sich in München im Zeitraum von 2003 bis 2016 einer Resektion unterzogen hatten, wurden aus der Datenbank der Viszeralchirurgie herausgesucht, mit dem Tumorregister abgeglichen und in die Kohorten eingeteilt. Sie erhielten jeweils eine Kohortennummer. Anschließend wurden die entsprechenden HE (Hämatoxilin-Eosin)-gefärbten Schnitte aus dem Pathologischen Archiv anhand ihrer Journalnummer herausgesucht und erneut mikroskopiert, um sicher zu gehen, dass genügend qualitativ verwertbares Tumormaterial und idealerweise auch umgebende Schleimhaut auf ihnen zur Verfügung stand. Die den Schnitten zugeordneten Paraffinblöcke mit den entsprechenden Geweben wurden erneut geschnitten. Die so entstandenen Schnitte wurden abermals durch Mikroskopie kontrolliert und anschließend immunhistochemisch angefärbt (s. 2.2).

2.2 Durchführung der Immunhistochemie

Für die Claudin-Immunhistochemie wurde ein polyklonaler Claudin-3 Rabbit anti-Human Antikörper von der Firma Abcam verwendet. Es fand eine Hitzevorbehandlung mit Target Unmasking Fluid der Firma Pan Path (Produktnummer: Z000R0000) statt. Anschließend wurde der Primärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:800 inkubiert. Als Detektionssystem wurde das ImmPRESS Anti-Rabbit IgG Polymer Kit der Firma Vector (Produktnummer: MP-7401) verwendet. Für die Färbung wurde als Chromogen DAB+ von Agilent Technologies (Produktnummer: K3468) und als Gegenfärbung Hematoxylin Gill's Formula von Vector (Produktnummer: H-3401) benutzt.

2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der mit Claudin-3 angefärbten Schnitte erfolgte doppelverblindet zusammen mit dem erfahrenen Pathologen Neumann. Diskrepante Fälle wurden gemeinsam mikroskopiert und ein Konsensus-Score erstellt. Zur Beurteilung wurde der Histoscore (H-Score) verwendet. Dies ist ein semiquantitatives Verfahren, in dem der Beurteiler den Anteil der Zellen anhand der Stärke ihrer immunhistochemischen Anfärbung im Vergleich mit umliegendem Darmgewebe in folgende Gruppen einteilt:

Tabelle 1: Gruppeneinteilung nach Anfärbeintensitäten

	Gruppe 0	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Intensität der Anfärbung	keine Färbung	schwache Färbung	moderate Färbung	starke Färbung
Multiplikationsfaktor	0	1	2	3

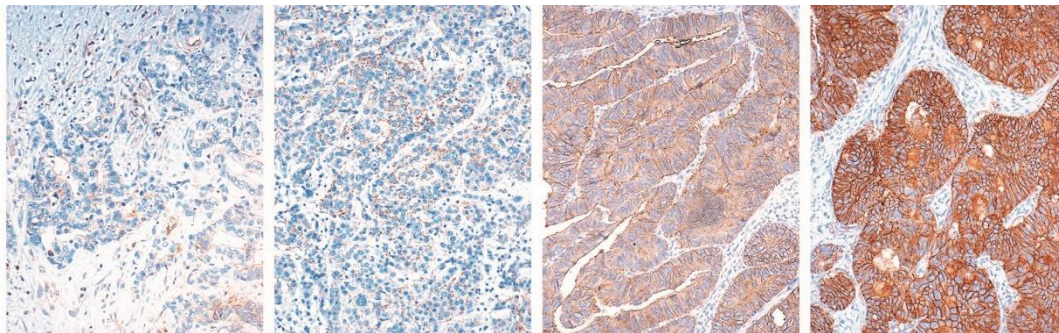


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung geordnet von keiner Färbung (links) bis starke Färbung (rechts)

Die jeweilige Prozentzahl wird mit dem jeweiligen Gruppenwert multipliziert und anschließend zu den anderen Gruppen addiert.

$$\text{H-Score} = \text{„\% in 0“} \times 0 + \text{„\% in 1“} \times 1 + \text{„\% in 2“} \times 2 + \text{„\% in 3“} \times 3$$

Dadurch erhält man einen semiquantitativen Wert, mit dem man die Färbungsintensität und Menge der angefärbten Zellen pro Schnitt vergleichen kann.

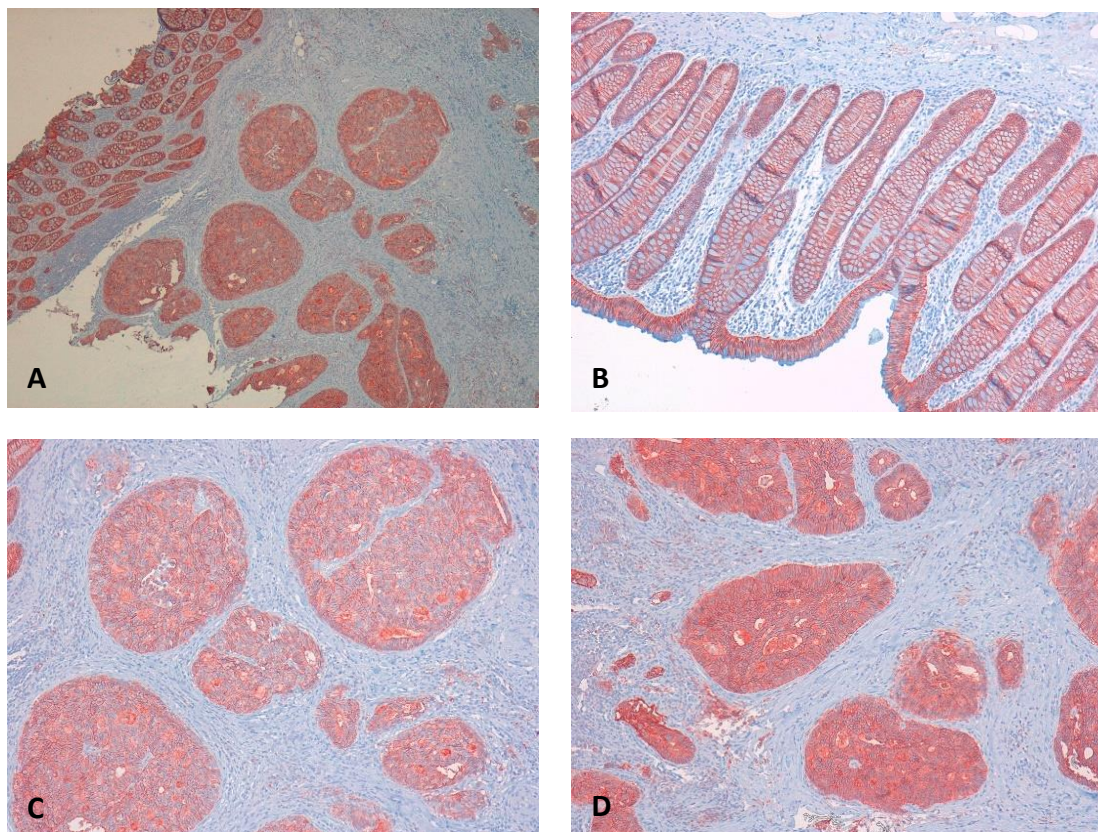


Abbildung 4: Beispielhafte Schnittbilder eines Patienten der Kohorte M0 in verschiedenen Vergrößerungen (A) Tumormasse und Schleimhaut in 50-facher Vergrößerung. (B) Schleimhaut in 100-facher Vergrößerung. (C, D) Verschiedene Ausschnitte des Primarius mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten in 100-facher Vergrößerung.

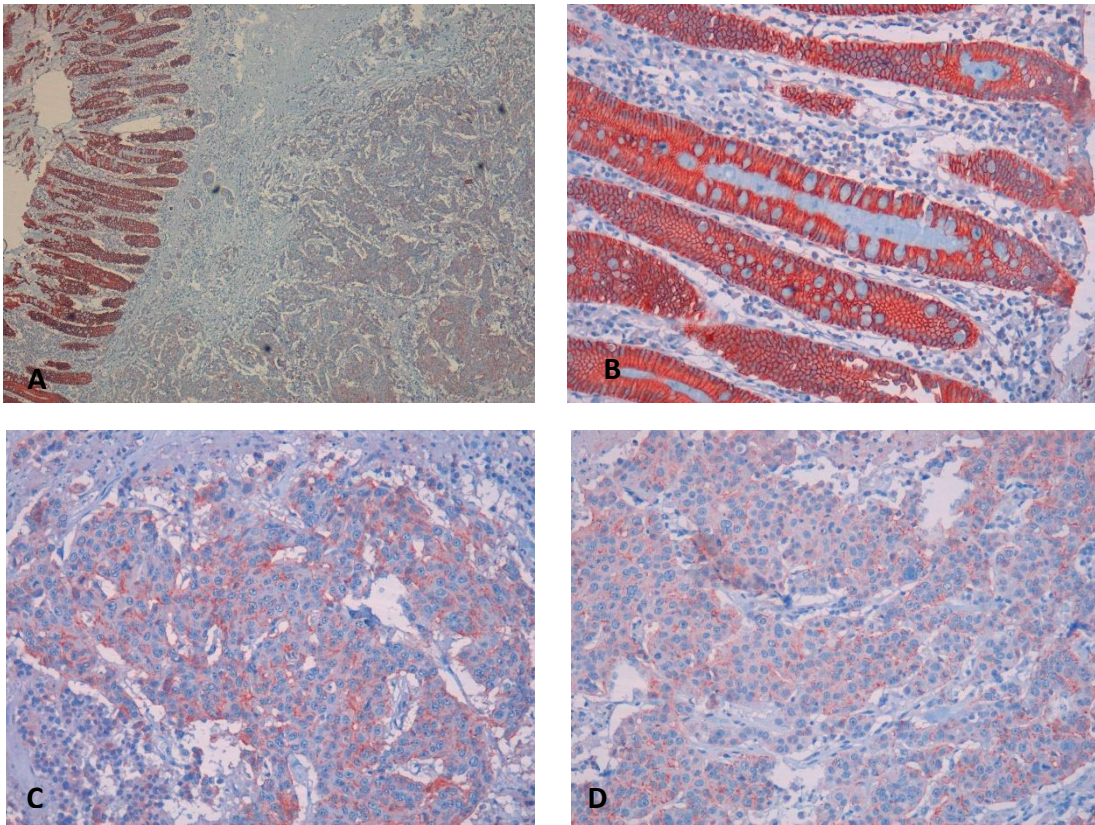


Abbildung 5: Beispielhafte Schnittbilder eines Patienten der Kohorte PER in verschiedenen Vergrößerungen (A) Tumormasse und Schleimhaut in 50-facher Vergrößerung. (B) Schleimhaut in 200-facher Vergrößerung. (C, D) Verschiedene Ausschnitte des Primarius mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten in 200-facher Vergrößerung.

2.4 Statistische Methoden

Zur Sammlung der Daten und Darstellung der Kohorten wurde Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO 64-Bit (Version 2101) verwendet. Die grundlegende Datenanalyse und statistischen Berechnungen wurden mit dem Programmpaket IBM SPSS Products: Intel Compiler 19.1 durchgeführt. Verwendet wurden COX-Regressionen, Chi-Quadrat-Tests und Student's T-Test wobei der p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Korrelation der allgemeinen Patientendaten

Für die Auswertung standen insgesamt 106 Fälle zur Verfügung (s. Tab.2). Für diese lag jeweils sowohl genug färbbares Gewebe in ihren Blöcken vor und die zugehörigen Datenbankeinträge waren vollständig. Sie wurden in die drei Kohorten M0 (35 Patienten ohne Metastasen in Leber oder Peritoneum), HEP (39 Patienten mit Metastasen in der Leber) und PER (32 Patienten mit Metastasen im Peritoneum) eingeteilt. Die angegebenen p-Werte entstanden durch das Berechnen von Chi-Quadrat-Tests. Die p-Werte waren in den Unterpunkten T, N und Zeitpunkt der Metastase kleiner als 5 % und sind somit als signifikant anzunehmen. Für die Kategorien Geschlecht, Altersgruppe und Ort des Primarius konnte kein Zusammenhang zwischen den Kohorten dargestellt werden.

Beim Vergleich der Kohorten mit Metastasen untereinander zeigt sich in unserer Studie der statistisch signifikante Zusammenhang ($p < 0,001$), dass bei einer tieferen Eindringtiefe (höheres T) mehr solitäre peritoneale Metastasen als Lebermetastasen auftreten.

Tabelle 2: Übersicht über Patientendaten, Korrelation der Kohorten mit den Patientendaten mittels Chi-Quadrat-Test und Vergleich der Kohorten HEP und PER untereinander mittels Student's T-Test

Total	M0		HEP		PER		P	
N = 106	N = 35		N = 39		N = 32		Global p	HEP mit PER
Geschlecht								
Männlich	19	54,3%	20	51,3%	13	40,6%	0,504	0,370
Weiblich	16	45,7%	19	48,7%	19	59,4%		
Altersgruppe								
<65	15	42,9%	17	43,6%	14	43,8%	0,997	0,989
≥65	20	57,1%	22	56,4%	18	56,3%		
Seite des Primarius								
Rechtes Kolon	13	37,1%	11	28,2%	16	50,0%	0,169	0,060
Linkes Kolon	22	62,9%	28	71,8%	16	50,0%		
T								
0	1	2,9%	0	0,0%	0	0,0%	< 0,001	< 0,001
1	6	17,1%	1	2,6%	0	0,0%		
2	8	22,9%	3	7,7%	0	0,0%		
3	16	45,7%	33	84,6%	6	18,8%		
4	4	11,4%	2	5,1%	26	81,3%		
N								
0	22	62,9%	12	30,8%	4	12,5%	0,001	0,185
1	7	20,0%	13	33,3%	14	43,8%		
2	6	17,1%	14	35,9%	14	43,8%		
Zeitpunkt der Metastase								
Keine Metastasen	35	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	< 0,001	0,112
Synchron	0	0,0%	30	76,9%	19	59,4%		
Metachron	0	0,0%	9	23,1%	13	40,6%		
Grading								
1	4	11,4%	1	2,6%	0	0,0%	0,204	0,649
2	19	54,3%	21	53,8%	17	53,1%		
3	12	34,3%	17	43,6%	15	46,9%		
Perforation								
0	35	100,0%	30	76,9%	22	68,8%	0,076	0,205
1	0	0,0%	1	2,6%	3	9,4%		

3.2 Überlebensfunktionen aller Kohorten

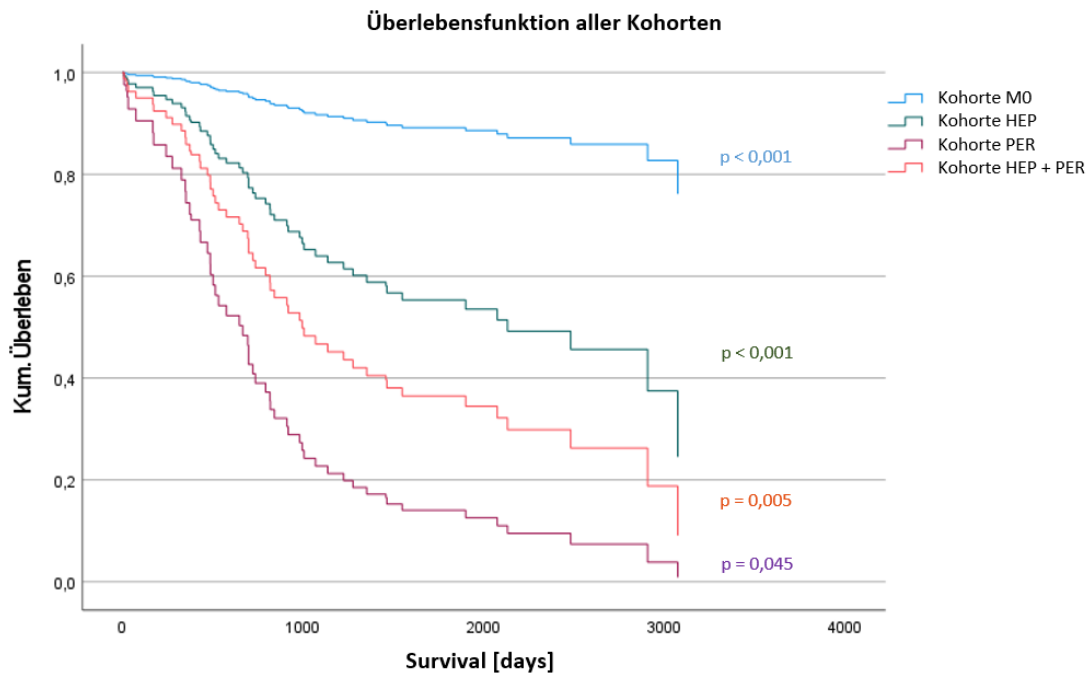


Abbildung 6: Überlebensfunktionen aller Kohorten in einer Kaplan-Maier-Kurve, Berechnung der P-Werte mittels COX-Regression

Hierbei wurden die Kohorten um die Kohorte HEP + PER, die alle Patienten mit Metastasen (also Kohorte HEP + Kohorte PER) beinhaltet, ergänzt. Es zeigte sich, dass Patienten, die sich in der Kohorte ohne Metastasen befanden das längste Überleben hatten. Ein ebenfalls signifikanter Unterschied ergab sich auch zwischen den Gruppen mit Metastasierung. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit peritonealen Metastasen ein deutlich kürzeres Überleben hatten als Patienten mit Lebermetastasen.

Dies alles stützt die Aussage, dass es sich bei den Kohorten um ein repräsentatives Modell handelt.[56]

3.3 Vergleich der H-Scores

Im Folgenden wird der H-Score der Kohorten in einem Boxplot dargestellt. Hier wurden signifikante Unterschiede des H-Scores zwischen den Gruppen M0 mit PER (zweiseitiger p-Wert = 0,048) und M0 mit HEP + PER (zweiseitiger p-Wert = 0,034) festgestellt. Der H-Score der Kohorte M0 war signifikant höher als in der Kohorte PER oder der Kohorte HEP + PER. Die Anfärbung der Schnitte und somit die Expression von Claudin-3 war in PER im Vergleich zu M0 erniedrigt.

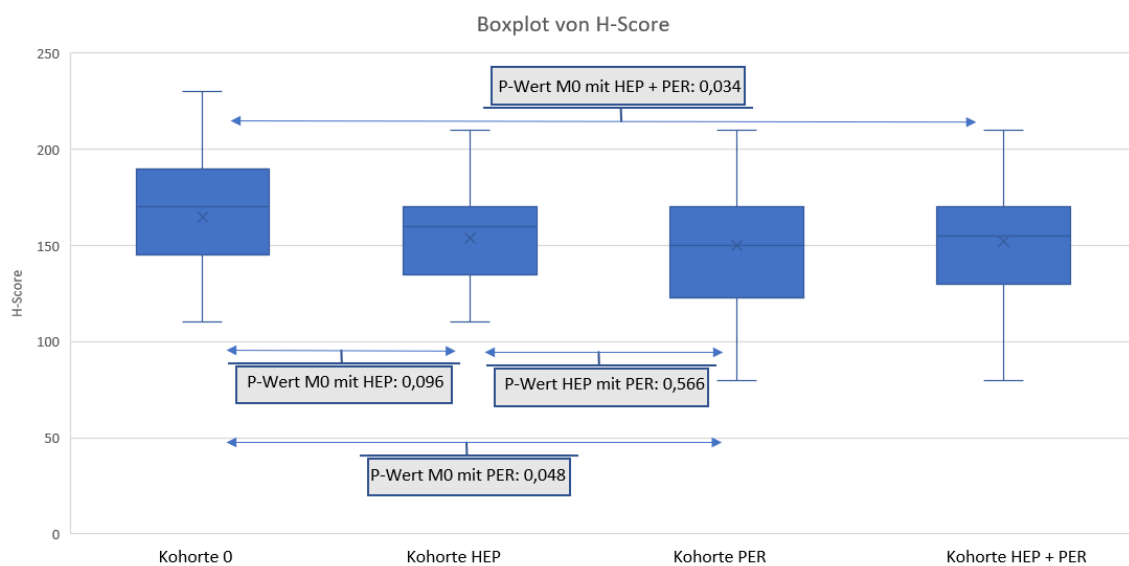


Abbildung 7: H-Scores der Kohorten in einem Boxplot und Vergleich der H-Scores der Kohorten untereinander mittels Student's T-Test

3.4 Vergleich der Gruppen mit Low- und High Claudin-3 Expression

Tabelle 3: Korrelation der Gruppen von Low- und High Expression mit den Patientendaten mittels Chi-Quadrat-Test

Total	Expression of Claudin 3				P
	Low Expression (≤ 155)		High Expression (>155)		
N = 106	N = 50		N = 56		
Geschlecht					
Männlich	20	40,0%	32	57,1%	0,078
Weiblich	30	60,0%	24	42,9%	
Altersgruppe					
<65	22	44,0%	24	42,9%	0,906
≥ 65	28	56,0%	32	57,1%	
Seite des Primarius					
Rechtes Kolon	20	40,0%	20	35,7%	0,650
Linkes Kolon	30	60,0%	36	64,3%	
T					
0	0	0,0%	1	1,8%	0,622
1	2	4,0%	5	8,9%	
2	6	12,0%	5	8,9%	
3	25	50,0%	30	53,6%	
4	17	34,0%	15	26,8%	
N					
0	19	38,0%	19	33,9%	0,697
1	14	28,0%	20	35,7%	
2	17	34,0%	17	30,4%	
Zeitpunkt der Metastase					
Keine Metastase	14	28,0%	21	37,5%	0,372
Synchron	23	46,0%	26	46,4%	
Metachron	13	26,0%	9	16,1%	
Grading					
1	1	2,0%	4	7,1%	0,186
2	31	62,0%	26	46,4%	
3	18	36,0%	26	46,4%	
Perforation					
0	43	86,0%	44	78,6%	0,982
1	2	4,0%	2	3,6%	

Der H-Score wurde in die zwei Gruppen Low-Expression (H-Score ≤ 155) und High-Expression (H-Score > 155) eingeteilt. Als Grenze zwischen diesen beiden Gruppen wurde der Mittelwert des H-Scores der Kohorten M0, HEP und PER (H-Score = 155) gewählt.

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Unterkategorien zwischen den Gruppen Low- und High-Expression nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Korrelation der Kohorten miteinander bezüglich Low- und High Expression

Claudin-3 Expression	M0		HEP		PER		P		
							Gesamt p	HEP vs PER	M0 vs HEP + PER
Low Expression (≤ 155)	14	40,0%	19	48,7%	17	53,1%	0,545	0,716	0,304
High Expression (>155)	21	60,0%	20	51,3%	15	46,9%			

In Tabelle 4 ist die Verteilung der Low- und High-Expression in den jeweiligen Gruppen dargestellt. Diese zeigt zwar prozentuale Unterschiede, ist allerdings insgesamt nicht signifikant ($p = 0,545$). Die Tendenz, dass in M0 ein größerer Anteil eine höhere Claudin-3-Expression besitzt, ist allerdings auch hier sichtbar.

3.5 Kaplan-Maier-Überlebenskurven der einzelnen Kohorten

Auch beim Vergleich innerhalb der einzelnen Kohorten konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Intensität der Claudin-3-Anfärbbarkeit einen Rückschluss auf das Überleben der Patienten zulässt. Anhand des graphischen Verlaufs in Kohorte M0 können keine Aussagen gemacht werden, da in unserer Stichprobe von 35 Patienten nur vier an den Folgen ihres Krebsleidens starben (s. Abb.8). Innerhalb der Kohorte HEP könnte über eine Tendenz des längeren Überlebens bei niedriger Expression spekuliert werden, diese ist jedoch nicht statistisch signifikant (s. Abb.9). In der Kohorte PER wird das Überleben der Patienten von der Claudin-3 Expression innerhalb der Kohorte nicht beeinflusst (s. Abb.10).

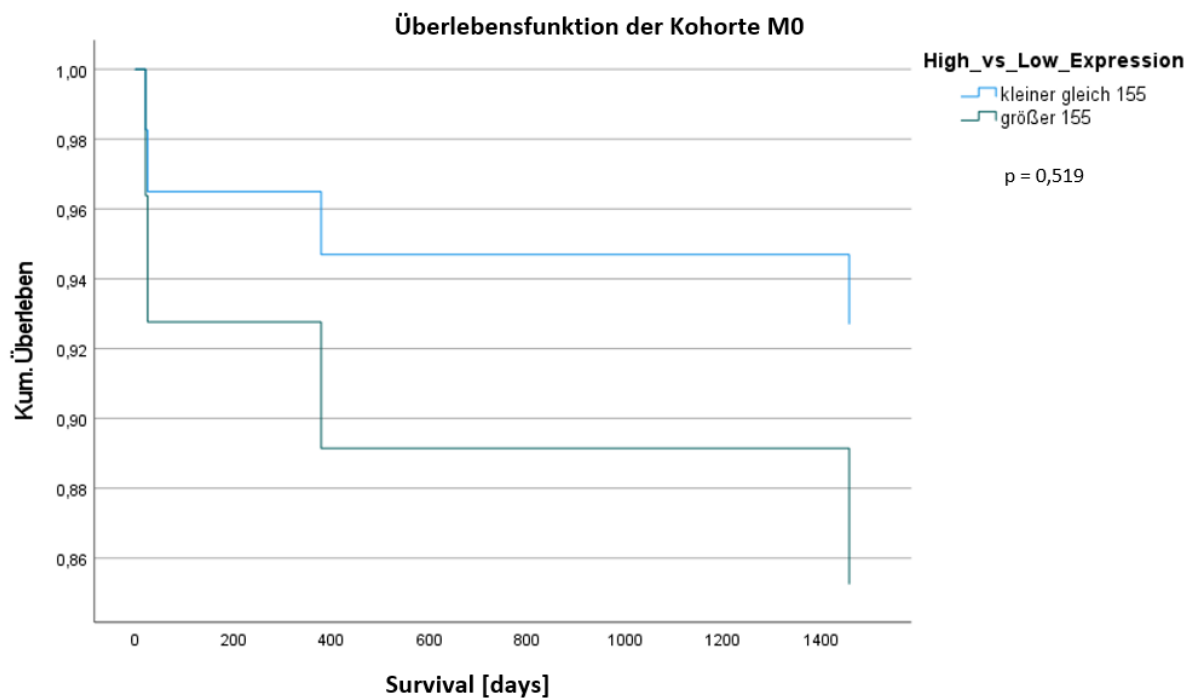


Abbildung 8: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte M0 mit Low- und High Expression

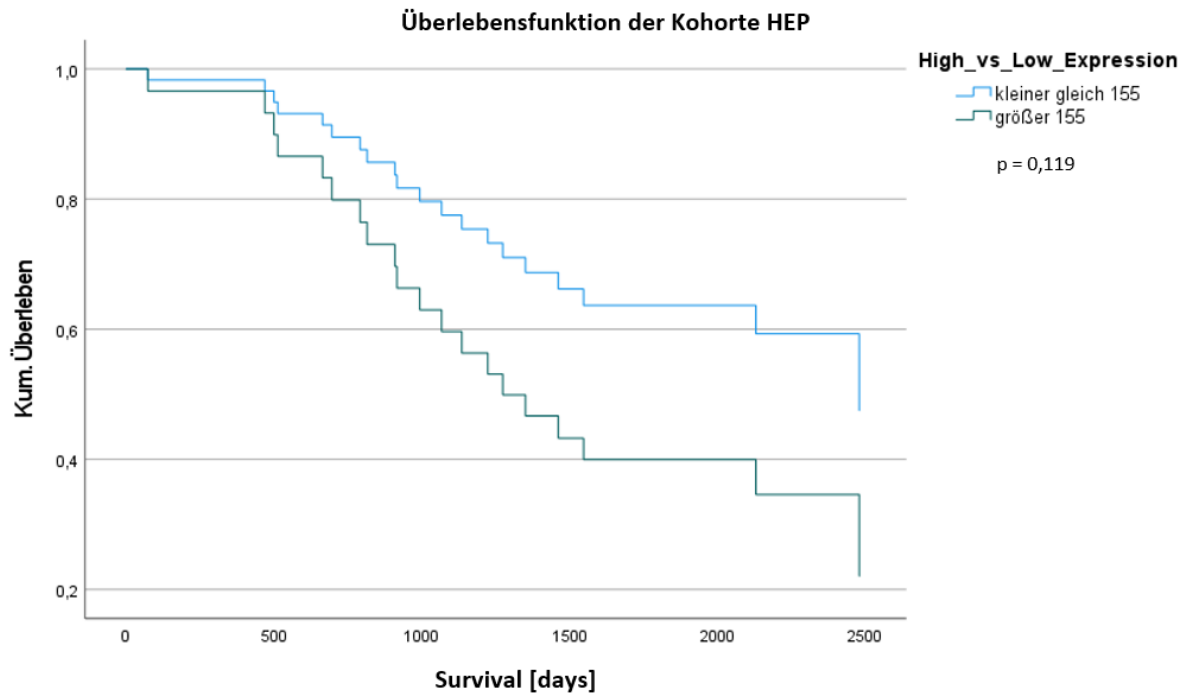


Abbildung 9: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte HEP mit Low- und High Expression

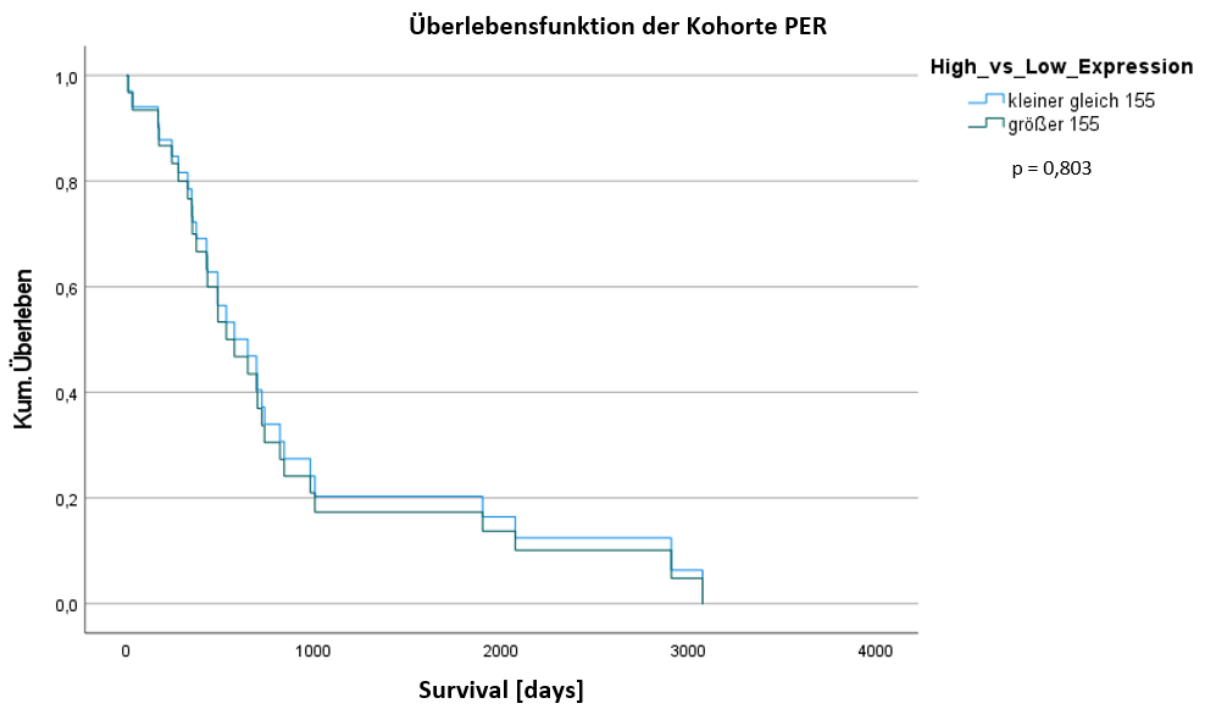


Abbildung 10: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte PER mit Low- und High Expression

4 Diskussion

4.1 Expression des Claudin-3 in kolorektalen Karzinoms

Es konnte gezeigt werden, dass Claudin-3 in vielen verschiedenen gesunden Geweben, wie der Haut, dem endokrinen Gewebe, dem Pankreas und auch dem Kolon exprimiert.[42] Da die Methode, die in dieser Studie verwendet wurde, das Darmgewebe in direkter Umgebung des Primarius mitanfärbt und keine Quantifizierung der Expression erlaubt, können keine absoluten quantitativen Aussagen bezüglich der exakten Höhe der Expression von Claudin-3 sowohl im Tumor als auch dem umgebenden Gewebe gemacht werden. Jedoch eignet sich die Anfärbung und die Interpretation mit dem semiquantitativen H-Score, um die Expression in der umgebenden Schleimhaut relativ zum Primarius zu vergleichen. Ein Vorteil der Methode ist, dass der systematische Fehler zwischen den verschiedenen Objektträgern minimiert wird. Denn durch den direkten Vergleich zu der umgebenden Schleimhaut ist eine interne Referenz gegeben. Zusätzlich können damit bereits Veränderungen innerhalb des Primarius und in den Invasionszonen erkannt und interpretiert werden. Jedoch kann keine Aussage bezüglich der Claudin-3 Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe gemacht werden.

Claudin-3 liegt bereits in gesunden Geweben beispielsweise des Pankreas, der Niere und des Kolons in hohen Dosen vor.[43] Zusätzlich scheint die Regulierung der Claudin-3 Expression tumorabhängig zu sein, da die Claudin-3 Konzentration in einigen Tumoren, wie z. B. der Pleura, Prostata, Mamma, Niere und Ovar im Vergleich zu normalen Gewebe erhöht ist.[28, 43, 52, 54] In anderen Tumoren, beispielsweise in ovariellen Keimstrang-Stroma-Tumoren und Hepatoblastomen, ist sie jedoch im Vergleich zu gesunden Gewebe erniedrigt.[28]

Zudem existieren bezüglich des KRK widersprüchliche Studienergebnisse. In einer Studie aus 2006 beschreiben Hewitt et al., dass die Claudine-3, -4 und -7 in vielen Tumoren und gesunden Geweben ein ähnliches Exprimierungsmuster besitzen - unter anderem sind sie auch in KRKs präsent und häufig erhöht.[43]

Eine weitere oft zitierte Studie wurde 2005 von de Oliveira et al. veröffentlicht. Diese zeigt anhand von zwölf Proben, dass sowohl Claudin-1, -3 und -4 in KRKs vermehrt exprimiert sind.[57]

Andererseits fanden Tang et al. 2011 in 50 Patienten, die auf Grund eines KRK operiert wurden, eine deutliche Verringerung der Expression von Claudin-3.[58]

Diese Widersprüche können mit unserer Studie nicht ausgeräumt werden, sollten jedoch in weiteren Studien wiederaufgegriffen und geklärt werden.

4.2 Einfluss des Claudin-3 auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms

Nicht nur für das KRK, sondern auch für das hepatozelluläre Karzinom und das Plattenepithel der Lunge konnten Interaktionen zwischen Claudin-3 und dem Wnt/ β -Catenin Signalweg nachgewiesen werden. Jeweils eine Erniedrigung oder der Knockout des Claudin-3 hat eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs zur Folge. Eine Überexpression des Claudin-3 hingegen inhibiert den Wnt/ β -Catenin Signalweg. Zusätzlich konnte in diesen Studien ein Zusammenhang zwischen niedriger Claudin-3 Expression und einer schlechteren Survivalprognose festgestellt werden.[53, 59, 60]

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich im Vergleich der Kohorten in M0 ein signifikant höherer H-Score (Vergleich von M0 mit HEP + PER: $p=0,034$; M0 mit PER: $p=0,048$), der mit einer vermehrten Expression von Claudin-3 einhergeht. Wie der graphischen Darstellung (s. Abb.7) zu entnehmen ist, ist die Verminderung der Expression von Claudin-3 in der Gruppe mit den peritonealen Metastasen am stärksten ausgeprägt. Dieser Effekt reicht jedoch nicht aus, um einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Metastasierungslokalisationen aufzuzeigen. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kohorte M0 und HEP ($p=0,096$) dargestellt werden, auch wenn eine derartige Veränderung anhand des Graphen zu vermuten wäre. (s. Abb.7) Da der aktivierte Wnt/ β -Catenin Signalweg EMT auslöst (s.o.), ist dies ein möglicher Ansatz, der den direkten Zusammenhang zwischen den Metastasierungseigenschaften des Karzinoms und der Expression von Claudin-3 begründet. Daraus könnte auch indirekt auf das kürzere Überleben der Patienten mit niedrigerer Claudin-3 Expression geschlossen werden. Dass Patienten mit metastasierten KRKs ein kürzeres Überleben besitzen, wurde bereits in vielen Studien bewiesen und konnte auch von uns bestätigt werden (s. Abb.6).[6, 56]

Ein weiterer Effekt des erniedrigten Claudin-3 auf das Überleben innerhalb der Kohorten konnte statistisch nicht nachgewiesen werden. Dennoch lässt sich innerhalb der HEP Kohorte eine Tendenz des längeren Überlebens bei niedriger Expression vermuten (s. Abb.9).

Andererseits zeigten de Souza et al. in einer Studie von 2013, dass auch eine erzwungene Überexpression von Claudin-3 das durch EGF (Epidermal Growth Faktor) induzierte maligne Potential erhöht. Auch fanden sie in derselben Studie heraus, dass ein Silencing von Claudin-3 zwar die durch EGF induzierte Malignität ausschaltet, jedoch das gesamte maligne Potential der Krebszellen erhöht.[61]

Dieser Effekt liegt jedoch nicht in jedem Organ gleichermaßen vor. Zhang et al. zeigten, dass eine Überexpression von Claudin-3 in Zellen des Adenokarzinoms der Lunge ebenfalls eine Erhöhung des durch EGF induzierten malignen Potentials auslöst. Jedoch inhibierte in ihrer Studie eine Herabregulation von Claudin-3 das Tumorwachstum in Nacktmäusen.[62]

2020 veröffentlichten Pérez et al. eine Studie, in der sie die Expression von Claudin-3 in den CMS (Consensus molecular subtypes) des KRK untersuchten. Die CMS werden aus 4 Untertypen gebildet: Der CMS1 (MSI immun), der CMS2 (kanonisch), der CMS3 (metabolisch) und CMS4 (mesenchymal).[63] Sie fanden heraus, dass eine hohe Expression von Claudin-3 in den CMS2 und CMS3 das Langzeit-Überleben ihrer Patienten verkürzten. Zudem stellten sie fest, dass Claudin-3 in CMS1 weniger exprimiert wurde als in den anderen Untergruppen.[64]

Hier fällt auf, dass allein durch eine weitere Unterteilung der KRKs in ihre molekularen Subtypen ein unterschiedliches Expressionsmuster von Claudin-3 ergibt.

Romani et al. zeigten 2020, dass eine geringe Expression von Claudin-7, jedoch nicht Claudin-3 als Marker für Fernmetastasen in Ovarialkarzinomen genutzt werden kann.[65]

Ein 2019 von Zhou et al. veröffentlichter Artikel beschreibt den Zusammenhang von erhöhtem Claudin-3 und vermehrten Fernmetastasen.[66]

Dies alles weist auf die gewebeabhängige Rolle der Wirkung von Claudin-3 auf den komplexen Vorgang der Metastasierung hin.

Klaver et al. veröffentlichten 2018 eine Studie, die die bekannte Verbindung zwischen der Kategorie T4 der „klassischen“ TNM-Klassifikation mit peritonealen Metastasen genauer untersucht. Sie fanden eine Verbindung zwischen „tatsächlicher peritonealer Penetration“ und höherer Wahrscheinlichkeit für peritoneale Metastasen.[67]

Diese Ergebnisse stützen, dass Claudin-3 eine wichtige Rolle im Metastasierungsprozess des KRK spielt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch verminderte Expression des Claudin-3 eine Funktionsstörung der TJs verursacht wird. Dies erleichtert das Herauslösen und die Migration von Zellen aus dem Primarius. Die erste Voraussetzung, die für den Vorgang der Metastasierung notwendig ist, ist dadurch erfüllt. Unsere Studie zeigt eine allgemein verringerte Expression von Claudin-3 in den Tumoren, die Metastasen entwickeln, was diese Theorie stützt. Weiterhin hatte die PER Kohorte den geringsten H-Score und wir konnten zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Eindringtiefe des Tumors und peritonealer Metastasierung besteht (s. Tab. 2: $p < 0,001$). Dies weist darauf hin, dass die fehlende Expression von Claudin-3 eine tiefere Infiltration ins umliegende Gewebe ermöglicht.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die erhoffte Differenzierung zwischen Leber- und Peritonealmetastasen konnte nicht statistisch signifikant gezeigt werden. Dies spricht gegen Claudin-3 als prädiktiven, klinischen Marker zur Unterscheidung zwischen den beiden Metastaselokalitäten. Auf Grund der verwendeten Methode kann keine quantitative Aussage bezüglich der Claudin-3 Expression getroffen und nur ein Vergleich zum umliegenden Gewebe angestellt werden.

Dennoch konnte in unserer Studie ein deutlicher Zusammenhang zwischen verminderter Expression von Claudin-3 und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung vor allem ins Peritoneum nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die entscheidende Beobachtung dieser Arbeit.

Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse einen signifikanten Zusammenhang zwischen peritonealer Metastasierung und der Eindringtiefe des Primarius. Ein interessanter Ansatz für kommende Studien wäre die Expression von Claudin-3 in einer größeren Kohorte innerhalb der Kategorie T4 zu untersuchen.

Ob sich die Tendenz des längeren Überlebens bei niedriger Expression in der Kohorte HEP bewahrheitet und ob der Metastasierungsort zusammen mit der Expression von Claudin-3 Aussagen über das Überleben der Patienten zulässt sollte mit genauerem Matching innerhalb der Kohorten untersucht werden.

Des Weiteren konnten die Widersprüche bzgl. der Expression von Claudin-3 in KRKs in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden (s. 4.1). Diese sollten mit einer größeren Anzahl an Probanden, einer gesunden Kontrollgruppe und unter Berücksichtigung möglicher Störfaktoren und Einflussgrößen wiederaufgegriffen und geklärt werden. Dabei sollte auch vermehrt auf die Interaktion der Claudine untereinander geachtet werden, da sich die unterschiedlichen Proteine der Claudinfamilie gegenseitig beeinflussen (s.o.) und die genauen Interaktionen noch nicht endgültig geklärt sind.

5 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019. 69(1): p. 7-34.
2. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle durch Krebs insgesamt 2017 2019 06.05.2020]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html>.
3. Barnes, B., et al., Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016, Robert Koch-Institut.
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. , Deutschen Krebsgesellschaft e.V., and Deutschen Krebshilfe. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Langversion 2019 07.05.2020]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf.
5. UICC. TNM. 2019 08.05.2020]; Available from: <https://www.uicc.org/resources/tnm>.
6. Riihimaki, M., et al., Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 29765.
7. Kuipers, E.J., et al., Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15065.
8. Schmiegel, W., et al., Kolorektales Karzinom. *Dtsch Arztebl International*, 2009. 106(51-52): p. 843-8.
9. Piso, P. and D. Arnold, Multimodale Therapiekonzepte der Peritonealkarzinose bei kolorektalen Karzinomen. *Dtsch Arztebl International*, 2011. 108(47): p. 802-8.

10. Arnold, D. and A. Stein, Kolorektales Karzinom: Innovationen bei den multimodalen Therapien. Dtsch Arztebl International, 2014. 111(6): p. -12-.
11. Brown, G., Colorectal Cancer. 2007-12-06, The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK: Cambridge University Press.
12. Sorich, M.J., et al., Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Oncol, 2015. 26(1): p. 13-21.
13. Karagkounis, G. and M.F. Kalady, Molecular Biology: Are We Getting Any Closer to Providing Clinically Useful Information? Clin Colon Rectal Surg, 2017. 30(5): p. 415-422.
14. Morson, B.C., Factors influencing the prognosis of early cancer of the rectum. Proc R Soc Med, 1966. 59(7): p. 607-8.
15. Muto, T., H.J.R. Bussey, and B.C. Morson, The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer, 1975. 36(6): p. 2251-2270.
16. Munding, J. and A. Tannapfel, Differenzierte Bewertung der Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom. Der Gastroenterologe, 2013. 8(6): p. 495-503.
17. Tannapfel, A., et al., Entstehung kolorektaler Karzinome. Dtsch Arztebl International, 2010. 107(43): p. 760-6.
18. Kirchner, T., Neues aus der Pathologie. Bayerisches Ärzteblatt 2010. 2010(1-2): p. 8 ff.
19. Paget, S., THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. The Lancet, 1889. 133(3421): p. 571-573.
20. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nature Reviews Cancer, 2002. 2(8): p. 563.

21. Langley, R.R. and I.J. Fidler, The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International Journal of Cancer*, 2011. 128(11): p. 2527-2535.
22. Martin, T.A. and W.G. Jiang, Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1788(4): p. 872-91.
23. Nieto, M.A., et al., EMT: 2016. *Cell*, 2016. 166(1): p. 21-45.
24. Aceto, N., et al., Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*, 2014. 158(5): p. 1110-1122.
25. Cheung, K.J. and A.J. Ewald, A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science*, 2016. 352(6282): p. 167-9.
26. VanderVorst, K., et al., Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. *Cancer Res*, 2019. 79(8): p. 1719-1729.
27. Gonzalez, D.M. and D. Medici, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 2014. 7(344): p. re8.
28. Singh, A.B., A. Sharma, and P. Dhawan, Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*, 2010. 2010: p. 541957.
29. Bogenrieder, T. and M. Herlyn, Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 2003. 22(42): p. 6524-36.
30. Folberg, R., M.J. Hendrix, and A.J. Maniotis, Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 2000. 156(2): p. 361-81.
31. Wong, C.W., et al., Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *The American journal of pathology*, 2002. 161(3): p. 749-753.

32. Mięka-Pietrasik, J., et al., The peritoneal "soil" for a cancerous "seed": a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases. *Cell Mol Life Sci*, 2018. 75(3): p. 509-525.
33. Nakamura, S., et al., Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 816.
34. RCSB Proteindatabank. 6AKE Crystal structure of mouse claudin-3 in complex with C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. 2019 06.01.2021]; Available from: <https://www.rcsb.org/structure/6ake>.
35. Krause, G., et al., Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1778(3): p. 631-45.
36. Niessen, C.M., Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(11): p. 2525-32.
37. Kummer, D. and K. Ebnet, Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection. *Cells*, 2018. 7(4).
38. Cummins, P.M., Occludin: one protein, many forms. *Molecular and cellular biology*, 2012. 32(2): p. 242-250.
39. HGNC. Gene group: Claudins (CLDN). o.J. 17.05.2020]; Available from: <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/488>.
40. Mineta, K., et al., Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 2011. 585(4): p. 606-12.
41. Zhu, L., et al., Claudin Family Participates in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 2019. 10(1441).
42. The HUMAN PROTEIN ATLAS. CLDN3 Tissue Atlas. o.J. 19.05.2020]; Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165215-CLDN3/tissue>.

43. Hewitt, K.J., R. Agarwal, and P.J. Morin, The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 2006. 6: p. 186.
44. Turksen, K. and T.C. Troy, Barriers built on claudins. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 12): p. 2435-47.
45. Hadj-Rabia, S., et al., Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, 2004. 127(5): p. 1386-90.
46. Wilcox, E.R., et al., Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 2001. 104(1): p. 165-72.
47. Simon, D.B., et al., Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 1999. 285(5424): p. 103-6.
48. Findley, M.K. and M. Koval, Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*, 2009. 61(4): p. 431-7.
49. Daugherty, B.L., et al., Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem*, 2007. 282(41): p. 30005-13.
50. Umeda, K., et al., ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 2006. 126(4): p. 741-54.
51. D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin, Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(28): p. 26233-40.
52. Kwon, M.J., Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci*, 2013. 14(9): p. 18148-80.
53. Jiang, L., et al., CLDN3 inhibits cancer aggressiveness via Wnt-EMT signaling and is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2014. 5(17): p. 7663-76.

54. Worst, T.S., et al., Database-augmented Mass Spectrometry Analysis of Exosomes Identifies Claudin 3 as a Putative Prostate Cancer Biomarker. *Mol Cell Proteomics*, 2017. 16(6): p. 998-1008.
55. Jaaskelainen, A., et al., High-level cytoplasmic claudin 3 expression is an independent predictor of poor survival in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 2018. 18(1): p. 223.
56. Joachim, C., et al., Overall survival of colorectal cancer by stage at diagnosis: Data from the Martinique Cancer Registry. *Medicine (Baltimore)*, 2019. 98(35): p. e16941.
57. de Oliveira, S.S., et al., Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*, 2005. 579(27): p. 6179-85.
58. Tang, W., et al., Dysregulation of Claudin family genes in colorectal cancer in a Chinese population. *BioFactors*, 2011. 37(1): p. 65-73.
59. Ahmad, R., et al., Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/beta-catenin signaling. *Oncogene*, 2017. 36(47): p. 6592-6604.
60. Che, J., et al., Claudin-3 Inhibits Lung Squamous Cell Carcinoma Cell Epithelial-mesenchymal Transition and Invasion via Suppression of the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. *Int J Med Sci*, 2018. 15(4): p. 339-351.
61. de Souza, W.F., et al., Claudin-3 overexpression increases the malignant potential of colorectal cancer cells: roles of ERK1/2 and PI3K-Akt as modulators of EGFR signaling. *PLoS One*, 2013. 8(9): p. e74994.
62. Zhang, L., et al., Claudin-3 expression increases the malignant potential of lung adenocarcinoma cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncotarget*, 2017. 8(14): p. 23033-23047.
63. Guinney, J., et al., The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 2015. 21(11): p. 1350-6.

64. Pérez, A.G., et al., N-glycosylation and receptor tyrosine kinase signaling affect claudin-3 levels in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*, 2020. 44(4): p. 1649-1661.
65. Romani, C., et al., Low Expression of Claudin-7 as Potential Predictor of Distant Metastases in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Patients. *Front Oncol*, 2020. 10: p. 1287.
66. Zhou, S., et al., Identification of claudin1, 3, 7 and 8 as prognostic markers in human laryngeal carcinoma. *Mol Med Rep*, 2019. 20(1): p. 393-400.
67. Klaver, C.E.L., et al., Locally Advanced Colorectal Cancer: True Peritoneal Tumor Penetration is Associated with Peritoneal Metastases. *Ann Surg Oncol*, 2018. 25(1): p. 212-220.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung nach Anfärbeintensitäten	16
Tabelle 2: Übersicht über Patientendaten, Korrelation der Kohorten mit den Patientendaten mittels Chi-Quadrat-Test und Vergleich der Kohorten HEP und PER untereinander mittels Student's T-Test	20
Tabelle 3: Korrelation der Gruppen von Low- und High Expression mit den Patientendaten mittels Chi-Quadrat-Test	23
Tabelle 4: Korrelation der Kohorten miteinander bezüglich Low- und High Expression.....	24

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs (modifiziert nach Gonzalez 2014 [27])	11
Abbildung 2: Claudin-3 - Anfärbung entsprechend der Sekundärstruktur (RCSB Proteindatabank 2019 – gezeigt ist eine Claudineinheit der Struktur des Heterodimers mit CPE [34]).....	12
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung geordnet von keiner Färbung (links) bis starke Färbung (rechts)	16
Abbildung 4: Beispielhafte Schnittbilder eines Patienten der Kohorte M0 in verschiedenen Vergrößerungen (A) Tumormasse und Schleimhaut in 50-facher Vergrößerung. (B) Schleimhaut in 100-facher Vergrößerung. (C, D) Verschiedene Ausschnitte des Primarius mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten in 100-facher Vergrößerung.	17
Abbildung 5: Beispielhafte Schnittbilder eines Patienten der Kohorte PER in verschiedenen Vergrößerungen (A) Tumormasse und Schleimhaut in 50-facher Vergrößerung. (B) Schleimhaut in 200-facher Vergrößerung. (C, D) Verschiedene Ausschnitte des Primarius mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten in 200-facher Vergrößerung.	18
Abbildung 6: Überlebensfunktionen aller Kohorten in einer Kaplan-Maier-Kurve, Berechnung der P-Werte mittels COX-Regression	21
Abbildung 7: H-Scores der Kohorten in einem Boxplot und Vergleich der H-Scores der Kohorten untereinander mittels Student's T-Test.....	22
Abbildung 8: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte M0 mit Low- und High Expression.....	25
Abbildung 9: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte HEP mit Low- und High Expression	26
Abbildung 10: Kaplan-Maier-Kurven des Überlebens der Patienten in der Kohorte PER mit Low- und High Expression.....	26

8 Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKS	Adenom-Karzinom Sequenz
APC	Adenomatöses Polyposis Coli
BMP	Bone morphogenetic proteins
BRAF	Protoonkogen, Mitglied der Familie der RAF-Proteine
CMS	Consensus molecular subtypes
CpG	Chemischer Zusammenschluss der Nukleotide Cytosin und Guanin
CpGI	CpG - Inseln: Genomlokalisationen mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
CT	Computertomographie
EGF	Epidermal Growth Faktor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEP	Kohorte der Patienten mit Metastasen in Leber
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
H-Score	Histoscore
IgG	Immunglobulin G
JAMs	Junctional adhesion molecules
KRAS	Mitglied der RAS-Proteinfamilie
KRK	Kolorektales Karzinom
M	Auftreten von Metastasen
M0	Kohorte der Patienten ohne Metastasen in Leber oder Peritoneum
HEP + PER	Zusammenfassung der Kohorten HEP und PER
N	Betroffenheit der Lymphknoten
P53	Nukleäres Phosphoprotein aus der Gruppe der Tumorsuppressorgene
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PER	Kohorte der Patienten mit Metastasen in Peritoneum
RAS	Prototonkogenfamilie, benannt nach der Erstentdeckung in „Rat sarcoma“
RAF	Familie von Proteinkinasen, Abkürzung steht für „rapidly accelerated fibrosarcoma“
RKI	Robert Koch-Institut
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SNAI1 und SNAI2	Transkriptionsfaktoren für u. a. Wundheilung und EMT
T	Eindringtiefe des Primärtumors
TGF-β	Transforming Growth Faktor- β
TJs	Tight Junctions
TP53	Tumor Protein 53
UICC	Union for International Cancer Control
Wnt	„wingless and int“, Protein und Auslöser des Signalwegs des gleichen Namens
ZO-1 und ZO-2	„Zona occludens“, Proteine der TJs

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Maximilian Julian Dullinger, an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Validierung des Biomarkers Claudin-3 für das peritoneal metastasierte Dickdarmkarzinom“ ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken habe ich als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Burgkirchen, den 27.08.2022

Ort, Datum

Maximilian Dullinger

Unterschrift