Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie

(Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns)

CDK9-Expression und prognostische Wertigkeit im Kolonadenokarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

verfasst von

Sandra Schneider

geboren in Laupheim

eingereicht 2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Lemke

2. Berichterstatter: PD Dr. Dr. med. Patrick C. Hermann

Tag der Promotion: 16.07.2021

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SONDERZEICHEN III

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das Kolonkarzinom 1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren 1
1.1.2 Pathogenese und Screening 1
1.1.3 Diagnostik 2
1.1.4 Klassifikationssysteme 3
1.1.5 Therapie 4

1.2 Cyclin-dependent kinases 5
1.2.1 Allgemeines und Funktion von CDKs 5
1.2.2 Cyclin-dependent kinase 9 6

1.3 Fragestellung 11

2 MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Patientenmaterial und -daten 12

2.2 Antikörper 13
2.2.1 Primärantikörper 13
2.2.2 Enzymgekoppelter Sekundärantikörper 13

2.3 Chromogen-Substrat 13

2.4 Chemikalien 13

2.5 Verbrauchsmaterialien 14

2.6 Geräte 15

2.7 Datenauswertungsprogramm und Statistikprogramm 16

2.8 Färbemethoden 17
2.8.1 Vorbereitung von Objektträgern für die HE-Färbung 17
2.8.2 Immersionsfixation, Gewebeeinbettung und Erstellung der Schnittpräparate 17
2.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 19
2.8.4 Immunhistochemische Färbung 19
2.8.5 Statistische Methoden 23

3 ERGEBNISSE 25

3.1 Patientenkollektiv und immunhistochemische Auswertung der CDK9-Expression 25

3.2 CDK9-Expression im Kolon-Normalgewebe im Vergleich zum Kolon-Karzinomgewebe 30

3.3 Prognostische Wertigkeit von CDK9 im Kolonkarzinom 33
3.3.1 Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs 33
3.3.2 Überlebenszeitanalyse des Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Geschlechts und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinom 36
3.3.3 Überlebenszeitanalyse des Patientenkollektivs in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinom 38
3.3.4 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Staging des Karzinoms und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinomgewebe 39
3.3.5 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Grading des Karzinoms und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinomgewebe 41

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 41

4 DISKUSSION 42

4.1 Immunhistochemischer Nachweis der CDK9-Expression in Karzinomen .. 43

4.2 Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression im Normalgewebe und im Tumorgewebe 44

4.3 Prognostische Wertigkeit von CDK9 in Tumoren 46

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 47

5 ZUSAMMENFASSUNG 48

6 LITERATURVERZEICHNIS 50

7 ANHANG 64

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SONDERZEICHEN

Ala	Alanin
Arg	Arginin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-dependent kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMGC-Gruppe	Gruppe von Proteinkinasen; namensgebend sind die Anfangsbuchstaben der folgenden Kinasegruppen: CDK, MAPK, GSK3β und CDK-like kinases
CT	Computer-Tomographie
CTD	Carboxy-terminale Domäne
d	Dezimalstelle
DAB+	3,3` Diaminobenzidin
dH_2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSIF	DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) - sensitivity inducing factor
DSIF-P	phosphorylierter DSIF
Fc-Fragment	Fragment crystallisable = konstanter Teil eines Antikörpers
g	Gramm
G	Grading – Differenzierungsgrad eines Karzinoms
Glu	Glutaminsäure
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3β
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IHC-P	Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Ile	Isoleucin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
Leu	Leucin
M	Fernmetastasen im TNM-System
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Max	Maximum
Min	Minimum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MR-Kolonographie	Darstellung Gastrointestinaltrakt mittels Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
N	Regionäre Lymphknoten im TNM-System
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NELF	Negative elongation factor
Nr.	Nummer
N-TEF	Negative transcription elongation factor
OP	Operation
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
P	phosphoryliert
PBS	Phosphate buffered saline
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PITALRE	Molekülname aufgrund der Abkürzung für die Aminosäurefolge: Prolin-Isoleucin-Threonin-Alanin-Leucin-Arginin-Glutaminsäure
Pro	Prolin
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b

R0	kein Residualtumor nach Resektion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
Ser	Serin
T	Primärtumor im TNM-System
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
Thr	Threonin
Tis	Carcinoma in situ (TNM-System)
TNB-Puffer	Tris-NaCl-Blocking-Puffer
TNM	Tumor Nodus Metastasen
TNT-Puffer	Tris-NaCl-Tween-Puffer
Tyr	Tyrosin
UICC	Union internationale contre le cancer
Z.n.	Zustand nach
°C	Grad Celsius
β	beta
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Das Kolonkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Kolorektale Karzinome waren 2012 weltweit insgesamt die dritthäufigste Tumorerkrankung nach Lungenkrebs und Brustkrebs. Bezüglich der Inzidenz gibt es große regionale Unterschiede mit einer höheren Inzidenz in Industrienationen. Die Mortalität hingegen ist in weniger entwickelten Regionen höher [33]. Eine Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts über die Inzidenz von Krebserkrankungen in Deutschland ergab für das Jahr 2016 circa 58.000 Neuerkrankungen an Darmtumoren, davon fast 2/3 im Bereich des Dickdarms [25].

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Kolorektalkarzinoms gilt unter anderem ein Kolorektalkarzinom bei Verwandten ersten Grades [36]. Patienten, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden, haben ebenfalls im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Ein besonders hohes Risiko besteht hierbei für Patienten mit einer ausgedehnten Kolitis, einer lang bestehenden Erkrankung, sowie wenn die Diagnose der CED mit unter 30 Jahren gestellt wird [31, 53, 73]. Das Risiko an Darmkrebs zu erkranken steigt außerdem mit dem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter für Männer lag 2016 in Deutschland bei 72 Jahren, für Frauen bei 76 Jahren [25]. Ein erhöhtes Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken konnte außerdem unter anderem für folgende Risikofaktoren nachgewiesen werden: Rauchen [67], Diabetes mellitus [3], hoher Alkoholkonsum [115], Übergewicht [14, 98], übermäßiger Verzehr von rotem Fleisch [29] sowie Bewegungsmangel [120].

1.1.2 Pathogenese und Screening

Bei der Mehrzahl der Kolonkarzinome handelt es sich um Adenokarzinome. Sehr selten treten beispielsweise Siegelringzellkarzinome oder Plattenepithelkarzinome auf [18, 51]. Viele der Kolorektalkarzinome gehen aus einem Adenom hervor. Man spricht von einer Adenom-Karzinom-Sequenz. Auch wenn die Progression zum Karzinom durchschnittlich zwischen 10 bis 25 Jahren dauern kann, werden dennoch nicht alle Adenome auch zu Karzinomen. Das Risiko der malignen Entartung ist hierbei bei villösen verglichen mit tubulären Adenomen erhöht und steigt außerdem mit

zunehmender Größe der Adenome [85]. Im Rahmen der Progression vom Adenom zum invasiven Karzinom kommt es zu einer Akkumulation unterschiedlicher Mutationen [116]. Zur Früherkennung kolorektaler Karzinome besteht im Alter zwischen 50 und 54 Jahren in Deutschland jährlich ein Anspruch auf einen speziellen Stuhltest. Hier wird der Stuhl auf nicht sichtbares Blut untersucht. Fällt der Test positiv aus, erfolgt zur weiteren Abklärung eine Koloskopie. Ab einem Alter von 55 Jahren wird dieser Stuhltest alle 2 Jahre angeboten. Alternativ wird ab einem Alter von 50 Jahren für Männer und ab einem Alter von 55 Jahren für Frauen eine Koloskopie zur Krebsfrüherkennung angeboten [42]. Durch diese Screening-Maßnahmen und die damit einhergehende Früherkennung und somit auch frühzeitige Behandlung von Kolonkarzinomen, konnte die Inzidenz und Mortalität gesenkt werden [8, 9].

1.1.3 Diagnostik

Bevor bei der Diagnose eines Kolonkarzinoms eine entsprechende Therapie eingeleitet wird, muss zunächst das genaue Tumorstadium eruiert werden. Hierzu wird eine komplette Koloskopie empfohlen, um gleichzeitig vorliegende distale Tumore oder Polypen nicht zu übersehen, und um eine Histologie zu gewinnen [4, 22]. Sollte eine komplette Koloskopie beispielsweise aufgrund eines stenosierenden Tumors nicht möglich sein, ist alternativ eine CT- oder MR-Kolonographie vorgesehen [32, 87]. Zur Untersuchung auf eventuell vorliegende Fernmetastasen werden zunächst eine Abdomensonographie sowie ein Röntgen-Thorax in 2 Ebenen empfohlen. Sollte sich hier der Verdacht auf eine Metastasierung oder unklare Befunde ergeben, wird die Durchführung eines Thorax-CTs empfohlen. Besteht der Verdacht auf eine Lebermetastasierung, erzielt eine Kontrastmittel-Sonographie ähnlich valide Ergebnisse wie das Abdomen-CT [63, 99, 100]. Vorteil eines Abdomen-CTs ist jedoch die bessere Beurteilbarkeit der lokalen Tumorausdehnung, also beispielsweise ob der Tumor auf die Darmwand begrenzt ist, ob das Nachbargewebe infiltriert ist, oder ob Lymphknoten befallen sind. Daher wird meist zusätzlich zur Abdomensonographie ein präoperatives Abdomen-CT empfohlen [5, 20, 49, 56, 63]. Als Tumormarker wird präoperativ CEA bestimmt. In den Nachsorgeuntersuchungen kann ein ansteigender CEA-Wert dann Hinweis auf ein Rezidiv sein [63].

1.1.4 Klassifikationssysteme

Zur Einteilung von Kolorektalkarzinomen dienen die TNM-Klassifikation sowie die UICC-Stadieneinteilung. Diese stellen eine einheitliche Beschreibung des Tumorstadiums dar und dienen sowohl als Hilfestellung bei der Therapieentscheidung, als auch bei der Einschätzung der Prognose. Als Grundlage beider Klassifikationen dient das Staging, also die Bestimmung der anatomischen Tumorausbreitung. Hierbei wird sowohl die lokale Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium), die Beurteilung regionärer Lymphknoten bezogen auf den Tumorbefall (N-Stadium) und die Untersuchung auf Fernmetastasen (M-Stadium) berücksichtigt [10, 11].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Kolon- und Rektumtumoren.

Die TNM-Klassifikation beinhaltet sowohl die Beurteilung der lokalen Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium), sowie die Beurteilung der regionären Lymphknoten (N-Stadium) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium) (nach [11]).

T-Stadium	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ; Tumor liegt ausschließlich intramukös (im Bereich der Lamina propria)
T1	Tumorinfiltration der Submukosa
T2	Tumorinfiltration der Muscularis propria
T3	Tumorinfiltration der Subserosa oder von nicht peritonealisiertem perikolischem oder perirektalem Gewebe
T4	Tumorinfiltration anderer Organe oder Strukturen und / oder Perforation des viszeralen Peritoneums
N-Stadium	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknoten mit Tumorbefall
N1	1 bis 3 regionäre Lymphknoten sind vom Tumor befallen
N2	4 oder mehr regionäre Lymphknoten sind vom Tumor befallen
M-Stadium	
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: Stadieneinteilung von Kolon- und Rektumtumoren nach UICC.

Die TNM-Klassifikation des Tumors wird in dieser Einteilung zu Stadien nach UICC zusammengefasst (nach [11]). T = Primärtumor. Tis = Carcinoma in situ. N = regionäre Lymphknoten. M = Fernmetastasen. UICC = Union internationale contre le cancer.

UICC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
III	jedes T	N1, N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Kolonkarzinome können zusätzlich anhand ihrer Drüsenstruktur in histopathologisch unterschiedliche Differenzierungsgrade eingeteilt werden. Gut (G1) und mäßig (G2) differenzierte Karzinome können hierbei in die Gruppe der low-grade Tumore zusammengefasst werden. Schlecht differenzierte (G3) bzw. undifferenzierte (G4) Karzinome hingegen werden der Gruppe der high-grade Tumore zugeteilt [51].

Tabelle 3: Histopathologisches Grading epithelialer maligner Tumore des Kolons.

Anhand der histopathologischen Beurteilung des Differenzierungsgrades des Drüsengewebes des Kolonkarzinoms erfolgt die Einteilung bezüglich des Gradings. G1 und G2 Tumore können zur Gruppe der `low-grade´ Tumore und G3 und G4 Tumore können in die Gruppe der `high-grade´ Tumore zusammengefasst werden [10, 51].

GX	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar	
G1	gut differenziertes Karzinom	low-grade
G2	mäßig differenziertes Karzinom	
G3	schlecht differenziertes Karzinom	high-grade
G4	undifferenziertes Karzinom	

1.1.5 Therapie

Eine Indikation zur operativen Tumorentfernung besteht für Patienten mit Kolonkarzinom ohne Metastasen bzw. mit resektablen Metastasen. Ziel ist es hierbei eine R0-Resektion zu erreichen, also den Tumor im Gesunden zu entfernen. Hierbei werden die versorgenden Gefäß-/Lymphknotenstrukturen mit abgesetzt. Eine adjuvante Chemotherapie folgt gegebenenfalls auf eine R0-Resektion. Indikation hierfür ist ein UICC-Stadium III. Metastasierte Karzinome werden bei Resektabilität

operativ therapiert. Bei nicht vorhandener Resektabilität wird primär eine systemische Therapie empfohlen. Um Komplikationen durch den Primärtumor zu vermeiden, wie beispielsweise die Entstehung eines Ileus, sollte eine palliative Resektion erfolgen. Generell sollte das therapeutische Konzept in einer interdisziplinären Tumorkonferenz für jeden Patienten individuell festgelegt werden [62].

Doch auch durch die genannten therapeutischen Maßnahmen können nicht alle Patienten gänzlich geheilt werden. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei circa 62%. Bei den jährlichen Krebstodesfällen in Deutschland liegt Darmkrebs bei beiden Geschlechtern an dritter Stelle [25]. Problematisch sind insbesondere das Auftreten von Rezidiven sowie metastasierte Karzinome. Diese Patienten erhalten in der Regel eine Chemotherapie, doch diese birgt viele Nebenwirkungen und Resistenzen [77, 89, 93]. Ziel ist es daher neue Prognosefaktoren zu finden, um die Therapieeskalation an das individuelle Risikoprofil anpassen zu können. Zudem sollen neue Zielstrukturen für neue therapeutische Ansätze gefunden werden.

1.2 Cyclin-dependent kinases

Die Kinasen der Familie der Cyclin-dependent kinases (CDKs) sind in wichtigen zellulären Prozessen wie beispielsweise dem Zellzyklus oder der Transkription beteiligt [76]. Da eine Deregulation in diesem Bereich eine gesteigerte Proliferation zur Folge haben kann und somit an der Tumorentstehung involviert sein kann, gelten CDKs als ein vielversprechender Forschungsansatz, unter anderem als Zielstruktur in der Entwicklung neuer Chemotherapeutika [38, 75].

1.2.1 Allgemeines und Funktion von CDKs

In die Gruppe der CDKs können aufgrund von Sequenzhomologie derzeit 21 Proteinkinasen (nach [76]) eingeordnet werden. Ursprünglich namensgebend war die Regulation der Kinaseaktivität über Cycline [76]. CDKs gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen und sind aufgrund der Struktur ihrer katalytischen Untereinheit eine von insgesamt 8 Kinase-Familien, die der CMGC-Gruppe angehören. Der Name CMGC entsteht hierbei aus den jeweils ersten Buchstaben der folgenden Kinase-Familien: CDK, MAPK, GSK3β und CDK-like kinases [46, 78]. Die charakteristische Struktur der katalytischen Untereinheit der CDKs besteht aus einer

Substrat-bindenden Domäne sowie einer ATP-Bindungsstelle. Ein weiteres gemeinsames Merkmal der CDKs ist das Vorhandensein einer Cyclin-bindenden Domäne. Durch die Bindung des Cyclins an die Cyclin-bindende Domäne kommt es unter anderem zu einer Konformationsänderung, wodurch die Substratbindestelle freigegeben wird [30, 52]. CDKs sind in einer Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse involviert. Während CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6 beispielsweise an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, regulieren andere CDKs die Transkription, unter anderem CDK7 und CDK9 [71, 94, 102, 103, 106, 109].

1.2.2 Cyclin-dependent kinase 9

Initial, als die Funktion noch unbekannt war, wurde CDK9 1994 entdeckt und als PITALRE bezeichnet. Der Grund hierfür war die folgende Aminosäuresequenz im Molekül: Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu. Es konnte gezeigt werden, dass PITALRE ubiquitär exprimiert wird, primär im Zellkern lokalisiert ist und die Höhe der Expression je nach Gewebe differiert [45]. Heute sind 2 Isoformen von CDK9 bekannt, eine 42kDa und eine 55kDa Isoform. Diese zeigen eine gewebespezifische Verteilung [111]. Vier mögliche Cyclinpartner sind für CDK9 bekannt, nämlich Cyclin T1, T2a, T2b oder Cyclin K [35, 95].

1.2.2.1 Funktion von CDK9 in der Regulation der Transkription

Zur Proteinbiosynthese innerhalb der Zelle wird zunächst im Rahmen der Transkription aus einem DNA-Doppelstrang ein mRNA-Einzelstrang generiert. Anschließend dient die mRNA als Vorlage für die Proteinsynthese. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet [15]. Als katalysierendes Enzym der Transkription dient eine RNA-Polymerase, speziell die RNA-Polymerase II (RNAPII) [16]. Die Transkription kann in drei Einzelschritte unterteilt werden. Im Rahmen der Initiation bildet sich an der Promotorregion der Präinitiationskomplex, bestehend aus der RNAPII sowie Transkriptionsfaktoren. Anschließend beginnt die Transkription. Während der Elongation wird das Transkript schließlich verlängert und im Rahmen der Termination wird die mRNA freigesetzt [17].

Die größte Untereinheit der RNAPII enthält die CTD, eine wichtige Zielstruktur für die Regulation der Transkription. Diese Region besteht aus mehreren Wiederholungen der folgenden hoch konservierten Aminosäuresequenz: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser.

Die Reste dieser Aminosäuren sind die Zielstruktur posttranslationaler Modifikationen [2, 28, 80, 88]. Faktoren, die die Zusammenlagerung der RNAPII zum Präinitiationskomplex stimulieren, stimulieren zusätzlich auch CDK7, die als katalytische Untereinheit des Transkriptionsfaktors II H (TFIIH) die Serinreste an den Positionen 5 und 7 der oben genannten Aminosäuresequenz der CTD der RNAPII im Präinitiationskomplex phosphoryliert und dadurch die Initiation der Transkription einleitet. Als Cyclinpartner dient hierbei Cyclin H [1, 69, 109]. Nach einer initial kurzen Elongationsphase während der Transkription, bei der lediglich kurze Transkripte generiert werden, stoppt die RNAPII die weitere Transkription. In der Folge konnten zwei N-TEFs (Negative transcription elongation factors) identifiziert werden, die für die Pause der RNAPII verantwortlich sind. Es handelt sich um NELF und DSIF und es gab erste Hinweise darauf, dass P-TEFb (Positive transcription elongation factor b) diese Wirkung aufheben kann und dadurch in der Folge zu einer effektiven Elongation führen kann [79, 117, 124]. Untersuchungen konnten zeigen, dass CDK9 die katalytische Untereinheit von P-TEFb bildet [94]. Als regulatorische Untereinheit dient hierbei einer der 4 Cyclin-Partner von CDK9, also Cyclin T1, T2a, T2b oder Cyclin K [35, 95]. In der Folge konnte nachgewiesen werden, dass durch die Phosphorylierung von DSIF durch P-TEFb die blockierende Wirkung von DSIF auf die Elongation der Transkription in eine aktivierende Wirkung umgewandelt wird [123]. Die zusätzliche Phosphorylierung von NELF durch P-TEFb führt dazu, dass dieser N-TEF von der RNAPII wegdissoziiert und die Elongation fortgeführt werden kann [37]. Für die Fortführung der Elongation ist aber zusätzlich die Phosphorylierung von Serin 2-Resten an der CTD der RNAPII, hauptsächlich durch P-TEFb, notwendig [80, 110].

Der Phosphorylierungsstatus der CTD der RNAPII ist sehr wichtig, um die entsprechenden Cofaktoren an richtiger Stelle zu rekrutieren und eine erfolgreiche Transkription zu gewährleisten. Die Phosphorylierung der Serin 2-Reste tritt vor allem während der Elongation der Transkription auf und scheint insbesondere für den Beginn der Termination der Transkription wichtig zu sein, denn an diesen phosphorylierten Serin 2-Resten können Terminationsfaktoren binden. Die Phosphorylierungen an der Position Serin 5 der CTD treten besonders an den Promotorregionen auf. Generiert werden diese Phosphorylierungen durch TFIIH [59, 72].

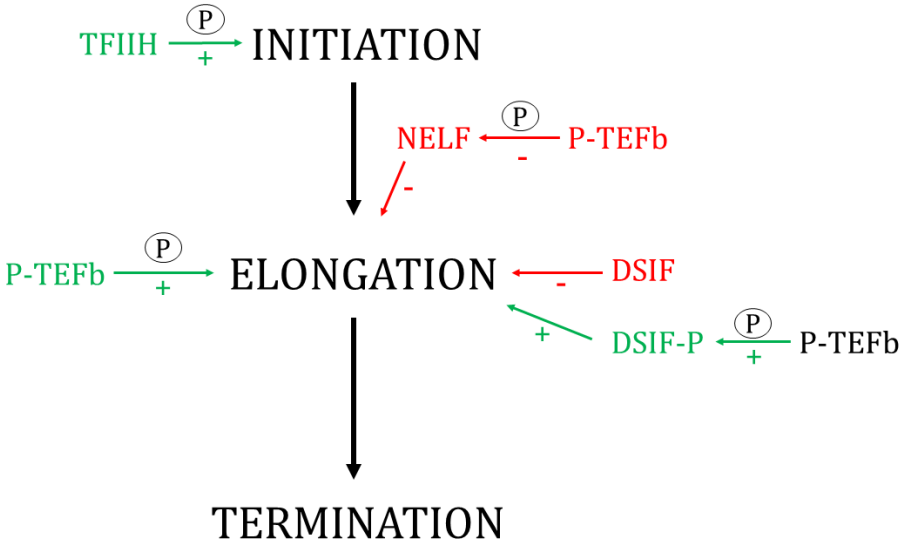

Abbildung 1: Übersicht über die Regulation der Transkription durch CDK7 und CDK9

TFIIH, bestehend aus CDK7 und dessen Cyclinpartner Cyclin H, phosphoryliert die CTD der RNAPII an den Serinresten 5 und 7 und fördert hierdurch die Initiation der Transkription. Kurz nach dem Start der Elongation kommt es durch NELF und DSIF zur Hemmung der Fortführung der Elongation. Durch die Phosphorylierung durch P-TEFb dissoziiert NELF weg und DSIF wird zum Aktivator der weiteren Elongation. P-TEFb besteht hierbei aus CDK9 mit einem seiner Cyclinpartner T1, T2a, T2b oder K. P-TEFb phosphoryliert zusätzlich die CTD der RNAPII (Serinrest 2), was zur Fortführung der Elongation führt. Dadurch können außerdem Terminationsfaktoren binden und die Termination der Transkription wird eingeleitet.
CDK = Cyclin-dependent kinase. CTD = C-terminale Domäne. DSIF = DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) - sensitivity inducing factor. P = Phosphorylierung. P-TEFb = Positive transcription elongation factor b. NELF = Negative elongation factor. RNAPII = RNA-Polymerase II. TFIIH = Transkriptionsfaktor II H. + = Aktivierung. - = Hemmung.

1.2.2.2 CDK9 und Tumorerkrankungen

Aufgrund der wichtigen regulatorischen Funktionen von CDK9 innerhalb der Zelle, ist es nicht verwunderlich, dass CDK9 bereits seit mehreren Jahren im Zusammenhang mit unterschiedlichen Tumorarten untersucht wird. Dabei konnte eine veränderte Expression von CDK9 bereits für mehrere Tumorarten nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigte die immunhistochemische Untersuchung der CDK9-Expression in Pankreaskarzinomen verglichen mit dem Normalgewebe eine erhöhte CDK9-Expression [60]. Eine hohe Expression von CDK9 konnte außerdem unter anderem in mehreren Lymphomen [6], sowie in Ösophaguskarzinomen [114] und Tumoren des Kopf-/Hals-Bereiches nachgewiesen werden [83].

Der Effekt von CDK9 Inhibitoren auf unterschiedliche Tumorarten wurde bereits mehrfach untersucht. Eine Arbeitsgruppe untersuchte beispielsweise an CLL-Zellen die Effekte einer Behandlung mit dem CDK Inhibitor Flavopiridol. Es konnte im

Rahmen dieser Untersuchungen nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung mit Flavopiridol die Phosphorylierung der CTD der RNAPII gehemmt wurde, was in einer reduzierten RNA-Synthese resultiert. Dabei kam es auch zu einem Rückgang in der Synthese antiapoptotischer Moleküle, deren Transkripte und Proteine zudem eine kurze Halbwertszeit in der Zelle aufweisen. Als Folge konnte eine zunehmende Apoptose der Tumorzellen beobachtet werden [21, 23, 61]. Phase II Studien erbrachten für die alleinige Gabe von Flavopiridol aber beispielsweise für metastasierte hormonrefraktäre Prostatakarzinompatienten oder für Patienten mit metastasiertem Melanom keine ausreichende therapeutische Wirkung und die Effektivität einer Verabreichung von Flavopiridol in Kombination mit anderen Therapeutika sollte in diesen Fällen evaluiert werden [12, 68]. In aktuelleren Studien untersuchte eine Arbeitsgruppe den Effekt von SNS-032, ein Inhibitor von CDK2, CDK7 und CDK9, auf Brustkrebszellen. Ebenso wie bei der Behandlung mit Flavopiridol konnte eine Reduktion antiapoptotischer Moleküle nachgewiesen werden. Folglich konnte eine Apoptoseinduktion in den Tumorzellen, jedoch nicht für das Normalgewebe, nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Wachstumshemmung von Brustkrebszelllinien beobachtet werden. Nähere Untersuchungen zeigten, dass der Phosphorylierungsgrad der CTD der RNAPII an den Serinresten 2 und 5 reduziert war, was sich ebenso in einer reduzierten RNA-Synthese widerspiegelte [27, 121]. Ähnliches zeigte sich auch bei der Behandlung von Pankreastumorzelllinien mit SNS-032. Es konnte eine Apoptoseinduktion sowie ein Zellzyklusarrest der Tumorzellen nachgewiesen werden [60]. Auch Untersuchungen bezüglich der Behandlung von Tumoren aus dem hämatopoetischen Formenkreis mit SNS-032 erbrachten in Studien mit Zellkulturversuchen beispielsweise für die CLL vergleichbare Ergebnisse [24]. Phase I Studien mit SNS-032 wurden bereits für solide Tumoren als auch für Tumoren des hämatopoetischen Formenkreises durchgeführt. An Nebenwirkungen konnten beispielsweise Übelkeit und Fatigue beobachtet werden, aber auch eine Myelosuppression oder ein Tumorlysesyndrom traten auf. Insgesamt war das Therapeutikum aber gut verträglich [47, 113].

Dinaciclib ist ein Inhibitor von CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9. Erste Versuche 2010 zeigten, dass Dinaciclib CDK2 und CDK5 stärker inhibiert als Flavopiridol und hierdurch eine überlegene Wirksamkeit aufweist. Zudem konnte in unterschiedlichen Tumorzelllinien ein Zellzyklusarrest durch die Gabe von Dinaciclib beobachtet

werden [91]. In einer Phase I Studie mit CLL Patienten konnte eine Wirksamkeit von Dinaciclib nachgewiesen werden, bei gleichzeitig akzeptabler Verträglichkeit [34]. Eine Phase III Studie bei Patienten mit CLL zeigte ebenfalls eine gute Wirksamkeit von Dinaciclib bei ebenfalls akzeptabler Verträglichkeit [43]. Bei den somatischen Tumoren ergab eine Studie mit Brustkrebspatienten im fortgeschrittenen Stadium zwar eine Wirksamkeit von Dinaciclib bei guter Verträglichkeit, war jedoch im Vergleich zur Kontrollsubstanz nicht überlegen [82]. Eine Phase II Studie mit Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom zeigte keinen therapeutischen Effekt von Dinaciclib [112]. Zusammenfassend ergeben diese Studien, einschließlich einer Phase III Studie, insbesondere für Tumoren aus dem hämatopoetischen Formenkreis bisher vielversprechende Ergebnisse für die Wirksamkeit von Dinaciclib. Zudem zeigt sich insgesamt in den meisten Studien eine gute Verträglichkeit [34, 43, 86].

Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass CDK Inhibitoren und speziell CDK9 Inhibitoren zwar vielversprechende zukünftige Therapeutika für Karzinome darstellen könnten, aber weiterhin intensive Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist, um die Effektivität und Verträglichkeit dieser Therapeutika für Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten evaluieren und verbessern zu können.

1.3 Fragestellung

Kolontumoren sind weltweit immer noch eine der häufigsten Tumorerkrankungen für beide Geschlechter und sind dadurch für eine Vielzahl der jährlichen Krebstodesfälle verantwortlich [25, 33]. Therapeutische Probleme bereiten insbesondere metastasierte Karzinome oder das Auftreten von Rezidiven. Zudem werden Chemotherapeutika oftmals schlecht vertragen [77, 89, 93]. Um auch Kolontumorpatienten, die gegen die bisherige Tumorbehandlung resistent sind, oder ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium haben, zukünftig effektiv therapieren zu können, ist es daher zwingend notwendig, neue Zielmoleküle für eine effiziente und zielgerichtete und damit möglichst nebenwirkungsarme Therapie gegen Tumorzellen zu finden. CDK9 übt einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf die Transkription aus [37, 80, 110, 117, 123] und wurde daher bereits mehrfach als potenziell vielversprechende Zielstruktur neuer Tumortherapien beschrieben [23, 24, 60, 64, 114, 121]. Deshalb soll in dieser Arbeit die CDK9-Expression in Kolonkarzinomen und im Kolon-Normalgewebe betrachtet werden, um zu untersuchen, ob CDK9 als therapeutische Zielstruktur im Kolonkarzinom in Betracht kommt. Zudem wird untersucht, ob und inwieweit die Höhe der CDK9-Expression im Kolontumor differiert und ob hierdurch das Überleben der Patienten beeinflusst wird und ob sich CDK9 daher als potenzieller Prognoseparameter, und damit als zukünftig wichtige Hilfestellung bei der Therapieentscheidung für Kolontumorpatienten, eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenmaterial und -daten

In die hier vorliegende Studie wurden Patienten mit einem Primärkarzinom im Kolon, die aufgrund ihres Kolonkarzinoms in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Universitätsklinikum Ulm zwischen November 2003 und Oktober 2014 operiert wurden und von denen ausreichend Gewebe zur Durchführung der Studie vorlag, eingeschlossen. Patienten die präoperativ eine Chemotherapie erhalten hatten, oder an einem Rezidiv leiden, wurden ausgeschlossen. Außerdem wurden ausschließlich Patienten mit Adenokarzinomen berücksichtigt. Bei 20 zufällig ausgewählten Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe auch das Normalgewebe analysiert. Insgesamt wurde im Rahmen dieser Studie das Tumorgewebe von 175 Patienten immunhistochemisch untersucht.

Für die anschließende Auswertung wurden die Patientendaten erhoben. Dies erfolgte ausschließlich in anonymisierter Form (Verschlüsselung mittels Codierung). Hierbei wurde von den Patienten jeweils das Grading [10, 51] und Staging [11], das Datum der Primär-OP, die Überlebenszeit nach der Primär-OP in Monaten (Stand 21.04.2016), das Alter der Patienten bei Primär-OP, das Geschlecht, sowie die genaue Lokalisation des Tumors ermittelt. Diese Daten wurden im Rahmen der Tumornachsorge des Universitätsklinikums Ulm erhoben und konnten freundlicherweise übernommen werden. Die Daten für die hier vorliegende Arbeit wurden letztmalig am 21.04.2016 aktualisiert. Patienten, die bis zu diesem Zeitpunkt noch am Leben waren, werden in dieser Arbeit als Überlebende klassifiziert. Eine tabellarische Übersicht über die klinischen Daten der Patienten ist im Anhang einzusehen (Tabelle 7).

Das Einverständnis zum Sammeln des Gewebes und der Nutzung von diesem und den Patientendaten für klinische Studien wurde von allen Patienten bereits vor der Primär-OP eingeholt. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Nutzung der klinischen Daten ausschließlich in anonymisierter Form mittels einer speziellen Codierung. Ein entsprechender Ethikantrag zur Nutzung der Gewebe- und Datenbank wurde zuvor von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Antragnummern 112/2003, 268/2008 und 235/2015).

2.2 Antikörper

Die jeweiligen Verdünnungen der eingesetzten Antikörper sind in Klammer angegeben und gelten jeweils für die Verwendung bei immunhistochemischen Färbungen von Paraffinpräparaten (IHC-P).

2.2.1 Primärantikörper

CDK9 (C12F7)	IgG. Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen CDK9 (42kDa und 55kDa Isoformen). Spezifisch für CDK9 von: Mensch, Maus, Ratte, Affe, Hamster, Rind, Hund. Cell Signaling Technology, Danvers, USA. (IHC-P: 1:150)

2.2.2 Enzymgekoppelter Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen, Universelles Immun-Peroxidase Polymer	IgG, mit Peroxidase konjugiert. N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R). Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan. (IHC-P: unverdünnt)

2.3 Chromogen-Substrat

DAB+	DAB+ Chromogen: 3,3` Diaminobenzidin. DAB+ Substratpuffer: Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,5. Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

2.4 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Citrat-Puffer (10-fach)	Antigen Retrieval Citra Plus. Bio Genex, Fremont, Kalifornien, USA
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Eosin Y Solution Alcoholic. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehydlösung 37%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämatoxylinlösung, Gill Nr. 3	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

HCl	Fluka® Analytical. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na_2HPO_4	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Peroxidase-Blocking Solution	Code S2023. Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Silane	(3-Aminopropyl-) Triethoxy-Silane. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris Base	Trizma® base. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween ® 20	Viscous Liquid. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Xylene AnalaR NORMAPUR. VWR Chemicals, Frankreich

2.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	24x32 mm, Dicke: Nr. 1,5 VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld Superior, Stärke Nr. 1. Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einbettkassetten	Histosette® II M485. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger für HE-Färbung	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Objektträger Superfrost® Plus für IHC	Menzel-Gläser. Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Paraffin	Paraffinwachs (TEK IV). Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Safe-Lock Tubes	0,5ml, 1,5ml, 2ml. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcon 15ml. Corning Science México S.A. de C.V., Mexiko

2.6 Geräte

Analysenwaage 1	MXX-2001. Max=2000g, d=0,1g. Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Analysenwaage 2	SBC 32. Max=120g, Min=0,01g, d=0,0001g. SCALTEC INSTRUMENTS GmbH, Göttingen, Deutschland
Autotechnikon	Autotechnikon Leica ASP300S. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Deutschland
Dampfkochtopf	Nordic Ware, Minneapolis, USA
Färbeküvette mit Färbeeinsatz aus Glas	R. Langenbrinck GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Feuchte Kammer	Eigenproduktion
Heizplatte	RCT basic. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kamera Mikroskop	MC 80. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Kühlschrank	Cooler. Robert-Bosch-Hausgeräte GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kunststoffplatte mit Deckel	Eigenproduktion

Mikroskop 1	Axioplan 2. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop 2	IX81. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Sharp R-93ST, Mikrowelle mit Grill-/ Heißluft. Sharp Electronics GmbH, Deutschland
Paraffin-Ausgießstation	MICROM EC 350. Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
pH-Meter	MP220 pH-Meter. Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten	0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 100-1000µl. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikküvette für die Mikrowelle	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Schlittenmikrotom	Microm HM450. Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Schwenktisch	KS250 basic. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2. Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	pfm Waterbath 1000. pfm medical ag, Köln, Deutschland

2.7 Datenauswertungsprogramm und Statistikprogramm

Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA)

SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

2.8 Färbemethoden

2.8.1 Vorbereitung von Objektträgern für die HE-Färbung

Die Objektträger für die HE-Färbungen wurden zu Beginn silanisiert, was eine bessere Haftbarkeit des Gewebes auf den Objektträgern sicherstellen soll. Dazu wurden die Objektträger zunächst 1 Minute in einer 2%igen Silanlösung inkubiert, daraufhin zweimal 1 Minute in Aceton und anschließend zweimal 1 Minute in dH_2O gegeben. Es folgte die Trocknung über Nacht im Wärmeschrank bei 40°C.

Da für die immunhistochemischen Färbungen spezielle Objektträger (Superfrost® Plus) benutzt wurden, die eine gute Adhäsion des Gewebes gewährleisten, war dieser Schritt hier nicht notwendig.

Herstellung einer 2%igen Silanlösung:	196ml Aceton + 4ml Silane (3-Aminopropyl-triethoxy-Silane)

2.8.2 Immersionsfixation, Gewebeeinbettung und Erstellung der Schnittpräparate

Das Gewebe wurde zunächst über Nacht bei Raumtemperatur in neutralem Formalin auf dem Schwenktisch asserviert. Am nächsten Tag erfolgte das Aufteilen des Gewebes in Histosetten. Das Gewebe wurde für mindestens eine weitere Nacht in neutralem Formalin im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 4 Stunden zum Auswaschen des Formalins in Leitungswasser gewässert. Nach Überführen der Histosetten in das Autotechnikon, wurden die in Tabelle 4 beschriebenen Arbeitsschritte zur Gewebeeinbettung in Paraffin automatisch ausgeführt.

Tabelle 4: Protokoll der maschinellen Gewebeeinbettung im Autotechnikon.

Übersicht über die eingesetzten Reagenzien, sowie deren Temperatur und Einwirkdauer.

Arbeitsschritt	Reagenz	Temperatur in °C	Dauer
1	Ethanol 70%	45	1,5 Stunden
2	Ethanol 80%	45	2 Stunden
3	Ethanol 96%	45	2,5 Stunden
4	Ethanol 100%	45	1 Stunde
5	Ethanol 100%	45	2 Stunden
6	Ethanol 100%	45	4 Stunden
7	Methylbenzoat	45	4 Stunden
8	Methylbenzoat	45	3 Stunden
9	Toluol	45	20 Minuten
10	Toluol	45	20 Minuten
11	Paraffin I	60	1 Stunde
12	Paraffin II	60	1 Stunde
13	Paraffin III	60	1 Stunde

Anschließend wurden die Blöcke gegossen und das überschüssige Wachs entfernt. Nun konnten die fertigen Blöcke nach Herabkühlen auf einer Kühlplatte mit dem Schlittenmikrotom in Paraffinschnitte mit einer Dicke von 1µm geschnitten und über ein Wasserbad auf die Objektträger aufgebracht werden. Über Nacht wurden die Objektträger bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet und konnten anschließend gefärbt werden.

Neutrales Formalin (10l): 40g NaH_2PO_4
65g Na_2HPO_4
1000ml 37%iges Formaldehyd
9000ml dH_2O

2.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die schon längere Zeit routinemäßig durchgeführte HE-Färbung wurde zu Beginn von jedem Gewebeblock angefertigt, um im Anschluss das Gewebe auf das Vorhandensein von ausreichend Tumorzellen für die immunhistochemische Färbung und Auswertung untersuchen zu können. Es wurde das im Labor bereits etablierte Färbeprotokoll verwendet.

2.8.3.1 Entparaffinieren der Schnittpräparate

Um die Schnittpräparate mittels HE färben zu können, musste zunächst das gesamte Paraffin aus dem Gewebe gelöst werden. Dazu wurden die Präparate zweimal für je 10 Minuten in Xylol inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Präparate mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und dabei zunächst dreimal je 5 Minuten in 100%igem Ethanol und danach jeweils für 5 Minuten in 96%igem, 80%igem, 70%igem und schließlich 50%igem Ethanol inkubiert. Es folgte eine zweimalige Inkubation für 5 Minuten in dH_2O.

2.8.3.2 Färbeprotokoll

Nach dem Entparaffinieren erfolgte eine dreiminütige Inkubation in Hämatoxylinfarbe. Nach Spülen für 10 Sekunden in dH_2O folgte eine kurze Inkubation für 3 Sekunden in einem 1%igem HCl-Ethanol Gemisch. Es folgte ein erneutes Spülen für 5 Sekunden in dH_2O und danach wurden die Schnittpräparate unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Anschließend folgte ein einminütiges Spülen in dH_2O, gefolgt von einer Inkubation von 10 Sekunden in Eosin. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe wie folgt inkubiert: zweimal jeweils 5 Minuten in 96%igem Ethanol und dreimal jeweils 5 Minuten in 100%igem Ethanol. Nach zweimaligem Inkubieren für jeweils 10 Minuten in Xylol, konnten die Schnittpräparate mit Entellan eingedeckt werden.

2.8.4 Immunhistochemische Färbung

Von jedem Patienten, bei dem ein Gewebeblock mit ausreichend Tumorzellen gefunden werden konnte, wurde nun eine CDK9-Färbung durchgeführt.

2.8.4.1 Entparaffinieren der Schnittpräparate

Um die Schnittpräparate immunhistochemisch mit CDK9-spezifischen Antikörpern zu färben, musste das Gewebe ebenfalls zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden

die Präparate zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Schnittpräparate zur Rehydrierung dreimal für 5 Minuten in 100%iges Ethanol und einmal für 5 Minuten in 70%iges Ethanol gegeben. Danach folgte eine zweimalige Spülung in dH_2O für jeweils 5 Minuten.

2.8.4.2 Antigendemaskierung

Bei der Fixierung mit Formalin werden die Antigene teilweise chemisch verändert und können dadurch eventuell durch den Primärantikörper nicht mehr gebunden werden. Es handelt sich um eine sogenannte Antigenmaskierung [65, 81, 104]. Im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurde deshalb die gängige und bewährte hitzeinduzierte Antigendemaskierung genutzt. Hierunter konnte die Sensitivität der Antigendetektion in der Vergangenheit deutlich verbessert werden [19, 57, 84, 97, 108].

Als Demaskierungslösung wurde Citrat-Puffer in 1-facher Verdünnung genutzt (pH-Wert 6,03). Speziell erfolgte die Hitzedemaskierung jeweils in mit Citrat-Puffer gefüllten Plastikküvetten in der Mikrowelle (genaues Protokoll siehe Kapitel 2.8.4.4).

2.8.4.3 Verwendetes Detektionssystem

Um die Expression von CDK9 detektieren zu können, wurde die bereits im Labor etablierte und bewährte Zweischritt-Technik von N-Histofine ® verwendet. Dabei wird zunächst der jeweils unkonjugierte Primärantikörper auf die Schnitte aufgetragen, der an das Antigen (CDK9) bindet. Nach Waschschritten folgt der Sekundärantikörper, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und mit einer Peroxidase konjugiert ist. Nach weiteren Waschschritten kann durch Zugabe des Chromogen-Substrats das Antigen (also CDK9) als sichtbares farbiges Produkt aus der Enzymreaktion (Peroxidase) mit dem Substrat dargestellt werden [48].

2.8.4.4 Immunhistochemischer Nachweis von CDK9 in entparaffinierten Kolongewebeschnitten

Für die immunhistochemische Färbung von menschlichem Gewebe mit CDK9 existierte bereits ein laborinternes etabliertes Protokoll. Um die beste Verdünnung des Primärantikörpers für Kolongewebe zu etablieren, wurde die Färbung zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Bei einer Verdünnung von 1:150 des Primärantikörpers mit dem Waschpuffer TNT zeigte sich das beste Ergebnis.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in mit Citrat-Puffer (1-fach) gefüllte Plastikküvetten überführt. Die Plastikküvetten wurden in einen mit Leitungswasser gefüllten Dampfkochtopf gestellt und in der Mikrowelle zunächst 15 Minuten bei 450 Watt und dann 10 Minuten bei 270 Watt gekocht. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die Schnitte in Färbeküvetten überführt und 5 Minuten mit dH_2O gewaschen. Anschließend erfolgten Waschschritte für 5 Minuten in PBS und danach 5 Minuten in TNT. Die Schnitte wurden nun auf eine Kunststoffplatte überführt, um sie 20 Minuten mit Peroxidaseblock (Peroxidase-Blocking Solution, 100µl pro Schnitt) zu bedecken. Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang über jeweils 5 Minuten in TNT, um die Schnitte danach für 30 Minuten abermals auf der Kunststoffplatte mit TNB (100µl pro Schnitt) zu bedecken. Nach einem erneuten Waschschritt für 5 Minuten mit TNT, konnten die Schnitte mit dem Primärantikörper CDK9 (1:150 verdünnt in TNT) bestückt werden und über Nacht in der feuchten Kammer (Boden mit TNT-getränkten Tüchern befeuchtet) bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Um zu gewährleisten, dass die Schnitte die gesamte Zeit mit dem Primärantikörper bedeckt bleiben und nicht austrocknen, wurden Deckgläser verwendet. Diese wurden an allen vier Ecken in flüssiges Paraffin getunkt, welches dann ausgehärtet ist. Die Deckgläser wurden anschließend vorsichtig über die Gewebeschnitte auf die Objektträger gelegt und mit einer Pipette wurden jeweils 100µl des verdünnten Primärantikörpers zwischen Objektträger und Deckglas pipettiert. Die Kapillarkräfte sollten über Nacht die Lösung zwischen Objektträger und Deckglas, also direkt über dem Bereich mit dem Gewebeschnitt, halten.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der Färbeküvette dreimal für 5 Minuten mit TNT gewaschen, um den nicht am Antigen gebundenen Primärantikörper von dem Objektträger zu lösen. Danach wurden die Schnitte auf die Kunststoffplatte überführt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit je einem Tropfen Sekundärantikörper N-Histofine MAX PO Rabbit. Nach zwei erneuten Waschschritten für jeweils 5 Minuten in TNT, wurden die Gewebeschnitte mit dem Chromogen-Substrat Dako Liquid DAB+ bestückt. Hierzu wurden pro Schnitt jeweils 100µl aus der Mischung 1ml DAB+ Substratpuffer und 1 Tropfen DAB+ Chromogen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 25 Minuten und wurde durch zwei Waschschritte mit jeweils 10 Minuten in dH_2O gestoppt. Um die auf diese Weise nicht angefärbten Zellen sichtbar zu machen, erfolgte

anschließend ein kurzes Eintunken der Objektträger in Mayers Hämalaunlösung. Nach 10 Sekunden in dH_2O wurden die Gewebeschnitte im Anschluss für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 5 Minuten in 70%igem, 96%igem und dreimal 100%igem Ethanol mit anschließend zweimaliger Inkubation für je 5 Minuten in Xylol. Daraufhin wurden die Schnitte mittels Entellan eingedeckt.

TNT-Waschpuffer (1l):	100ml 1Molares Tris HCl, pH7,6
	30ml 5Molares NaCl
	0,5ml Tween 20
	Auf 1l mit dH_2O auffüllen
TNB-Blockierpuffer (100ml):	10ml 1Molares Tris HCl, pH7,6
	3ml 5Molares NaCl
	0,5ml Tween 20
	0,2g BSA
	Auf 100ml mit dH_2O auffüllen
PBS-Puffer 10fach (1l):	80g NaCl
	2g KCl
	14,4g Na_2HPO_4
	2,4g KH_2PO_4
	800ml dH_20 → pH 7,4 mit HCl einstellen
	Auf 1l mit dH_20 auffüllen

2.8.4.5 Spezifitätskontrollen

Um die Spezifität der angewendeten Methode zu gewährleisten, wurden vorab Negativkontrollen durchgeführt. Dabei wurde auf die Zugabe des Primärantikörpers verzichtet und stattdessen ausschließlich TNT-Puffer verwendet. Hierbei zeigte sich keine Substratreaktion [13, 96]. Die Spezifität des Antikörpers für das Antigen in menschlichem Gewebe wird durch die Firma Cell Signaling Technology gewährleistet.

2.8.4.6 Auswertung der immunhistochemischen Schnitte

Da bei der IHC von CDK9 als Chromogen-Substrat DAB+ eingesetzt wurde, wird die Stärke der CDK9-Expression in den Schnitten anhand der Intensität der Braunfärbung sichtbar. Für die Auswertung wurden zunächst Standardpräparate ausgewählt, denn die Braunintensität der Zellen wurde in der Folge in 4 Kategorien eingeteilt: (0) steht für negativ, also eine blau angefärbte Zelle; (+) bedeutet eine leichte Braunfärbung; (++) steht für eine mittelstarke Braunfärbung und (+++) steht für eine sehr starke Braunfärbung (also CDK9-Expression). Bilder der Standardpräparate für (+), (++) und (+++) sind im Anhang (Abbildung 9) einzusehen.

Um die histologischen Präparate besser auswerten zu können, wurden die mit CDK9 gefärbten Schnittpräparate zunächst unter einem Mikroskop (Olympus) mit einer Kamera abfotografiert. Dabei wurde eine Standardeinstellung festgelegt, um die Belichtung und Kontraste immer einheitlich halten zu können. Da die Intensität der Braunfärbung teilweise auch in einem Präparat also innerhalb des Tumorgewebes eines Patienten stark differierte, wurden in der Folge pro Patient insgesamt 500 repräsentative Tumorzellen beurteilt und einer der folgenden 4 Kategorien zugeordnet. Um einen Score daraus zu bilden, wurde die Anzahl der gezählten Zellen in der jeweiligen Kategorie mit 0 für die Kategorie (0), mit 1 für die Kategorie (+), mit 2 für die Kategorie (++) und mit 3 für die Kategorie (+++) multipliziert und anschließend diese 4 Werte addiert. Folglich konnten bei diesem CDK9-Score Werte zwischen 0 und maximal 1500 entstehen. Der CDK9-Score wurde sowohl für das Normalgewebe als auch für das Karzinomgewebe generiert. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Auswertungen gibt Tabelle 6 im Anhang.

2.8.5 Statistische Methoden

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen der Höhe der CDK9-Expression und dem Überleben der Patienten zu untersuchen. Die Patienten wurden hierfür zunächst in zwei Untergruppen aufgeteilt. Nämlich eine Gruppe mit hoher CDK9-Expression (Score > 569) im Karzinomgewebe und eine Gruppe mit niedriger CDK9-Expression (Score ≤ 569) im Karzinomgewebe. Als Grenze wurde ein CDK9-Score von 569 festgelegt, denn dieser Wert entspricht genau der Hälfte des maximalen Scores, der in diesem Patientenkollektiv erreicht wurde (CDK9-Score von 1138, siehe Tabelle 6 im Anhang).

Bewährt für Überlebenszeitanalysen hat sich die Kaplan-Meier Methode, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Speziell wurde hierbei die Zeit zwischen dem Anfangsereignis (hier Datum der Primär-OP) und dem Zeitpunkt des Auftretens des Endereignisses (hier Tod des Patienten) untersucht. Studienabbrecher, Patienten die nicht mehr zur Nachkontrolle ans Universitätsklinikum Ulm kamen, oder Patienten die am Ende der Ermittlung der Patientendaten (21.04.2016) noch am Leben waren, wurden zensiert. Die Überlebenskurve entsteht, indem die Überlebenswahrscheinlichkeit für jeden einzelnen Tag errechnet wird. Zum Beispiel für Tag 2 die Wahrscheinlichkeit dafür, dass Tag 1 überlebt wird multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit, dass Tag 2 überlebt wird aber unter der Voraussetzung, dass Tag 1 überlebt wurde und so weiter [41, 125].

Um die Unterschiede in den generierten Überlebenskurven zu evaluieren, wurde der dafür bewährte Logrank-Test verwendet. Als Nullhypothese gilt hierbei, dass die Überlebenskurven in allen Gruppen gleich sind. Die Alternativhypothese hingegen besagt, dass es zwischen den Gruppen Unterschiede im Überleben gibt. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt. Bei diesem Test wurde nun die beobachtete Anzahl der Ereignisse (hier Tod des Patienten) mit der unter Annahme der Nullhypothese erwarteten Anzahl an Ereignissen verglichen. Das Statistikprogramm errechnet dann je nach Differenz die Überschreitungswahrscheinlichkeit p. Wenn dieser Wert kleiner oder gleich des gewählten Signifikanzniveaus von 5% ist, wird die Nullhypothese verworfen [39].

Bei 20 Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe das Normalgewebe immunhistologisch untersucht. Mithilfe des Wilcoxon-Tests für Wertepaare wurde untersucht, ob sich die CDK9-Expression zwischen Karzinom und Normalgewebe unterscheidet. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt. Als Nullhypothese gilt, dass es keinen Unterschied in der CDK9-Expression gibt. Die Alternativhypothese besagt, dass es einen Unterschied zwischen Karzinom und Normalgewebe im Hinblick auf die Höhe der CDK9-Expression gibt [40].

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst betrachtet, ob CDK9 in Kolonadenokarzinomen exprimiert wird. Anschließend wurde untersucht, ob die Höhe der CDK9-Expression innerhalb der Kolonkarzinome differiert. Zudem wurde überprüft, ob sich Unterschiede im immunhistochemischen Nachweis der Expression von CDK9 in humanen Adenokarzinomen des Kolons verglichen mit dem jeweiligen Normalgewebe nachweisen lassen. Im Anschluss wurde untersucht, ob durch die unterschiedlich starke Expression von CDK9 innerhalb der Kolonadenokarzinome das Überleben der Patienten beeinflusst wird.

3.1 Patientenkollektiv und immunhistochemische Auswertung der CDK9-Expression

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Kolonkarzinome zeigten sich große Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression zwischen den unterschiedlichen Kolonkarzinomen und teilweise auch innerhalb der einzelnen Tumore. Dies wurde auch bei der Generierung der CDK9-Scores berücksichtigt (siehe Kapitel 2.8.4.6). Es wurden pro Kolontumorpatient 500 Zellen betrachtet und jeweils einer der Kategorien 0 für keine CDK9-Expression, + für eine schwache CDK9-Expression, ++ für eine mittlere CDK9-Expression und +++ für eine starke CDK9-Expression zugeordnet. Anschließend wurde die jeweilige Anzahl an Zellen mit 0 für Kategorie 0, 1 für Kategorie +, 2 für Kategorie ++ und 3 für Kategorie +++ multipliziert und diese Werte anschließend addiert. Insgesamt kann gesagt werden, dass fast alle Kolonkarzinome CDK9 exprimieren. Im CDK9-Score konnten Werte zwischen minimal 3 und maximal 1138 generiert werden. Als Grenze für die Zuteilung hohe CDK9-Expression (CDK9-Score > 569) beziehungsweise niedrige CDK9-Expression (CDK9-Score ≤ 569) wurde 569 festgelegt, da dieser Wert genau der Hälfte des maximal generierten Scores für dieses Patientenkollektiv entspricht.

Abbildung 2 zeigt HE- sowie CDK9-Färbungen von vier Beispielpatienten. Jeweils zwei der Patienten konnten hierbei der Gruppe hohe CDK9-Expression bzw. der Gruppe niedrige CDK9-Expression im Karzinom zugeordnet werden. Die Abbildung soll die Unterschiede in der Stärke der CDK9-Expression verdeutlichen.

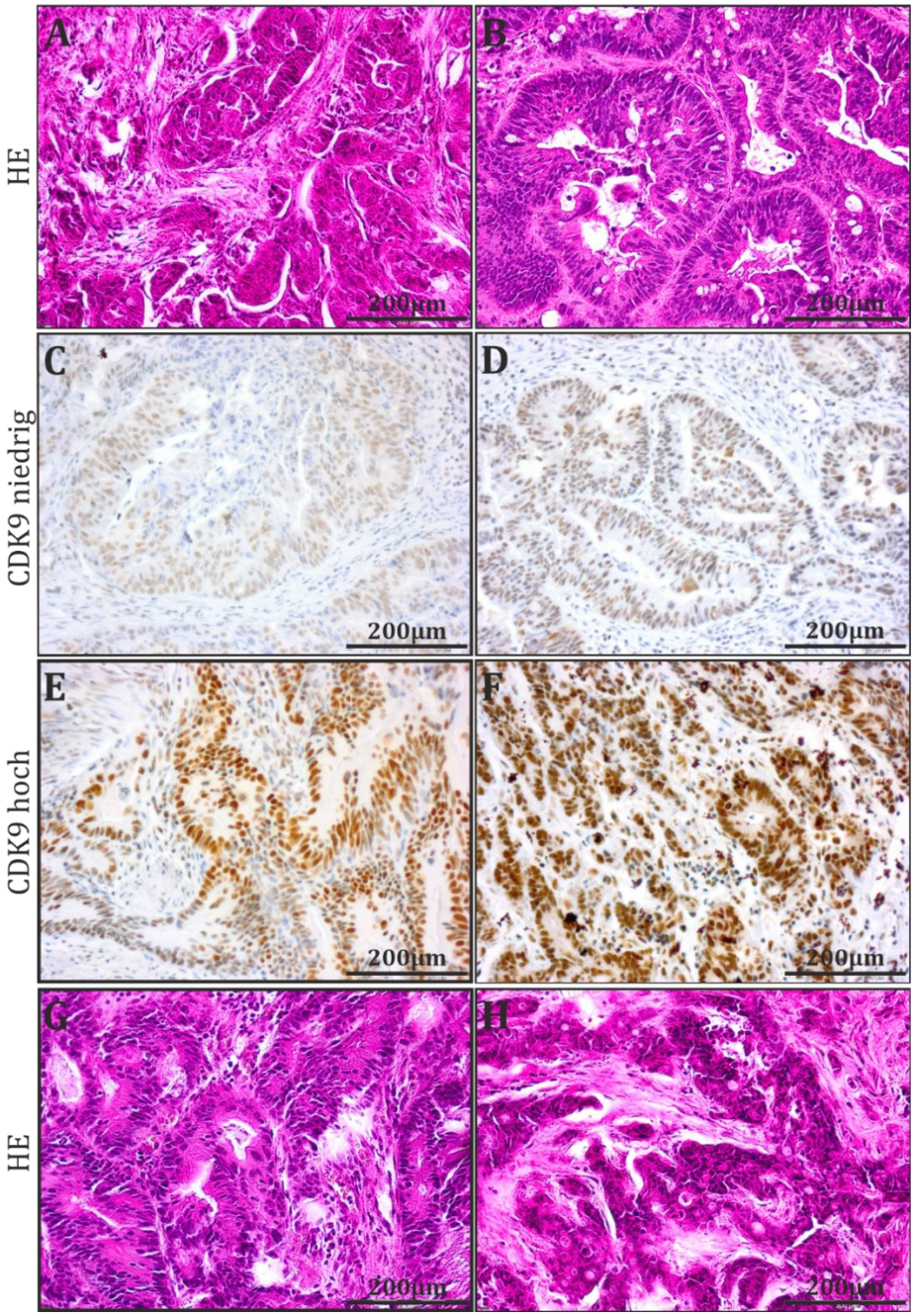

Abbildung 2: HE- und CDK9-Färbungen von Beispielpatienten mit niedriger (CDK9-Score ≤ 569) und hoher (CDK9-Score > 569) CDK9-Expression im Kolontumorgewebe.

In der 1. und 4. Zeile sind jeweils die HE-Färbungen, in der 2. und 3. Zeile die immunhistochemischen CDK9-Färbungen (Antikörper C12F7 der Firma Cell Signaling Technology; Peroxidasereaktion Farbstoff DAB+) in jeweils 16facher Vergrößerung zu sehen. Die Bilder A und C stammen von Paraffinschnitten des Tumorgewebes von Patient 20. Es ergab sich bei diesem Patienten ein CDK9-Score von 350. Die Bilder B und D stammen von Paraffinschnitten des Kolontumorgewebes von Patient 44. Es ergab sich ein CDK9-Score von 452. Diese beiden Patienten konnten folglich in die Kategorie niedrige CDK9-Expression zugeteilt werden. Die Bilder E und G stammen von Paraffinschnitten des Kolontumorgewebes von Patient 142. Es konnte ein CDK9-Score von 855 generiert werden. Die Bilder F und H stammen von Paraffinschnitten des Kolontumorgewebes von Patient 169. Es konnte ein CDK9-Score von 997 generiert werden. Diese beiden Patienten konnten der Kategorie hohe CDK9-Expression zugeteilt werden. Eine Übersicht über die Werte der CDK9-Scores für alle Patienten gibt Tabelle 6 im Anhang. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. DAB+ = 3,3` Diaminobenzidin. HE = Hämatoxylin-Eosin.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die klinischen Daten der Patienten, sowie die CDK9-Expression in den einzelnen Untergruppen. Es wurden Patienten in die Studie aufgenommen, die im Zeitraum von November 2003 bis Oktober 2014 am Universitätsklinikum Ulm primär einer operativen Tumorresektion unterzogen wurden und von denen für die Durchführung der Studie ausreichend Tumorgewebe zur Verfügung stand. Insgesamt konnten 175 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Davon waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung (21.04.2016) 79 Patienten verstorben. Das Alter der Patienten bei Diagnosestellung liegt zwischen 30 Jahren und 94 Jahren und das mediane Alter der Studienpopulation bei Diagnosestellung beträgt 69,5 Jahre. Insgesamt 93 der 175 Patienten waren männlich, die übrigen 82 Patienten waren weiblich. Bezüglich der medianen CDK9-Scores im Karzinom konnten keine relevanten Unterschiede beobachtet werden (Median bei den Männern: 618; Median bei den Frauen: 623).

Bezüglich der Tumorlokalisation im Kolon wurden zwei Gruppen gebildet. Als Grenze wurde hierbei die linke Kolonflexur gewählt. In die Gruppe „rechtes Kolon“ fielen folglich die Karzinome distal der Bauhin’schen Klappe bis einschließlich des Colon transversum. Die linke Kolonflexur und die distalen Abschnitte, einschließlich des Colon sigmoideum, wurden der Gruppe „linkes Kolon“ zugeteilt. Hierbei konnten mehr als doppelt so viele Patienten in der Gruppe mit Tumoren im Bereich des rechten Kolons beobachtet werden. Die medianen CDK9-Scores waren jeweils in der Gruppe „rechtes Kolon“ etwas höher als in der Gruppe „linkes Kolon“. Da bei einem Patienten die Tumorausdehnung sowohl in die Gruppe „linkes Kolon“, als auch in die Gruppe „rechtes Kolon“ zugeteilt hätte werden müssen, und der Patient dadurch in dieser Auswertung doppelt gezählt hätte, wurde der Patient im Rahmen dieser Auswertung in keiner der beiden Gruppen berücksichtigt (Patient 5, siehe Tabelle 7 im Anhang).

Die lokale Tumorausdehnung (T-Stadium) wurde in zwei Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe der lokal eher kleinen Tumoren (T1/T2), sowie die Gruppe der lokal eher fortgeschrittenen Tumoren (T3/T4). Es zeigte sich, dass fast viermal so viele Patienten in die Gruppe mit lokal fortgeschrittenen Tumoren zugeordnet werden konnten. Die Verteilung der Patienten auf die Untergruppen bezüglich des Lymphknotenstatus zeigte sich relativ ausgeglichen. 84 Patienten konnten in die Gruppe mit negativem Lymphknotenstatus (N0) und 90 Patienten konnten in die Gruppe mit positivem

Lymphknotenstatus (N1 und N2) zusammengefasst werden. Bezüglich der Metastasierung der Karzinome konnten mehr als doppelt so viele Patienten in die Gruppe ohne detektierte Metastasen (M0) zugeteilt werden. Im Hinblick auf die Höhe der CDK9-Expression zeigte sich jeweils kein wesentlicher Unterschied. Es war aber in den eher lokalen Stadien (T1/T2, N0 und M0) jeweils die höhere mediane CDK9-Expression, verglichen mit den entsprechend fortgeschrittenen Stadien, zu beobachten. Bei einem Patienten konnte in der Datenbank kein Staging eruiert werden (Patient 23, siehe Tabelle 7 im Anhang). Dieser Patient wurde folglich in dieser Auswertung nicht berücksichtigt. Beim Grading wurden zwei Untergruppen gebildet. Patienten mit dem Grading G1 oder G2 wurden in die Gruppe mit gut differenziertem Karzinom (G1/G2) zusammengefasst. Die Patienten mit einem Grading von G3 oder G4 bilden die Gruppe der schlecht differenzierten Karzinome (G3/G4). Hierbei konnten der Patientengruppe mit gut differenzierten Tumoren circa doppelt so viele Patienten zugeteilt werden, als der Gruppe mit schlecht differenzierten Karzinomen. In Bezug auf die CDK9-Expression zeigten sich keine großen Unterschiede im Median, tendenziell konnten aber höhere Werte in der Gruppe G1/G2 beobachtet werden (Median von 634 bei G1/G2 gegenüber einem Median von 589,5 bei G3/G4). Bei insgesamt 3 Patienten konnte in der Datenbank keine Klassifizierung des Tumors bezüglich des Gradings gefunden werden (Patienten 23, 55, 90 siehe Tabelle 7 im Anhang). Diese Auswertung wurde folglich ausschließlich bei den 172 übrigen Patienten durchgeführt.

Im Rahmen der Auswertung der klinischen Patientendaten wurde außerdem das UICC-Stadium der Patienten betrachtet. Insgesamt 30 Patienten konnten der Gruppe mit UICC-Stadium I zugeteilt werden und jeweils 49, 43 und 52 Patienten in die Gruppen UICC-Stadium II, III sowie IV. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf den Median der CDK9-Expression im Karzinom zwischen den einzelnen UICC-Stadien. In den UICC-Stadien I, III und IV zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der Patienten auf die Gruppe hohe bzw. niedrige CDK9-Expression im Karzinom. Lediglich im UICC-Stadium II zeigten fast doppelt so viele Patienten einen hohen CDK9-Score im Karzinomgewebe. Da wie oben bereits erwähnt bei einem Patienten (Patient 23, siehe Tabelle 7 im Anhang) kein Staging eruiert werden konnte, konnte folglich auch keine Zuteilung zu einem UICC-Stadium für diesen Patienten generiert werden und diese Auswertung erfolgte mit den Daten der 174 übrigen Patienten.

Tabelle 5: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten der Studienpopulation mit Kolonkarzinom (Universitätsklinikum Ulm: 2003–2014).

In der 1. Spalte sind die Untergruppen aufgeführt. Die 2. und 3. Spalte zeigen die Patientenanzahl, den Median, sowie Maximum und Minimum der CDK9-Expression in der entsprechenden Untergruppe. In der 4. und 5. Spalte kann die Patientenverteilung auf die beiden CDK9-Gruppen (niedriger bzw. hoher CDK9-Score; Grenze: 569) eingesehen werden, sowie jeweils der Median der CDK9-Expression. Die Werte beziehen sich auf das Karzinomgewebe. Stand: 21.04.2016. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. Max = Maximum. Min = Minimum. N = Anzahl.

	Gesamt N	**CDK9-Expression [Score]** Median (Min-Max)	**Niedrige CDK9-Expression [Score ≤ 569]** N (Median [Score])	**Hohe CDK9-Expression [Score > 569]** N (Median [Score])
Überleben:				
verstorben	79	567 (3 – 997)	40 (394,5)	39 (767)
lebend	96	643 (143 – 1138)	33 (450)	63 (796)
Geschlecht:				
männlich	93	618 (3 – 1094)	41 (385)	52 (794,5)
weiblich	82	623 (143 – 1138)	32 (467,5)	50 (766,5)
Tumorlokalisation:				
linkes Kolon	55	618 (143 – 1094)	21 (390)	34 (738,5)
rechtes Kolon	119	625 (3 – 1138)	51 (447)	68 (813,5)
Staging:				
T1/T2 *(Primärtumor)*	35	651 (6 – 1080)	15 (412)	20 (850,5)
T3/T4 *(Primärtumor)*	139	618 (3 – 1138)	57 (414)	82 (756,5)
N0 *(regionäre Lymphknoten)*	84	639,5 (6 – 1138)	32 (396)	52 (821,5)
N1/N2 *(regionäre Lymphknoten)*	90	607,5 (3 – 1094)	40 (430)	50 (764)
M0 *(Fernmetastasen)*	122	625,5 (6 – 1138)	49 (430)	73 (807)
M1 *(Fernmetastasen)*	52	614 (3 – 1070)	23 (395)	29 (767)
Grading (Differenzierungsgrad):				
G1/G2	116	634 (143 – 1094)	45 (414)	71 (780)
G3/G4	56	589,5 (3 – 1138)	26 (371,5)	30 (797,5)
UICC-Stadium (Union internationale contre le cancer):				
I	30	620,5 (6 – 1080)	13 (397)	17 (832)
II	49	635 (143 – 1138)	17 (385)	32 (797)
III	43	604 (151 – 1094)	19 (458)	24 (727)
IV	52	614 (3 – 1070)	23 (395)	29 (767)
Gesamtkollektiv:	**175**	**618 (3 – 1138)**	**73 (412)**	**102 (787)**

3.2 CDK9-Expression im Kolon-Normalgewebe im Vergleich zum Kolon-Karzinomgewebe

Bei 20 zufällig ausgewählten Patienten wurde sowohl das Karzinom- als auch das Normalgewebe immunhistochemisch untersucht. In Tabelle 6 im Anhang sind die Werte der jeweiligen CDK9-Scores einzusehen. Es fällt auf, dass der CDK9-Score im Normalgewebe meist niedriger ausfällt als im Karzinom. Lediglich bei 4 Patienten ist der CDK9-Score im Normalgewebe höher als im Karzinom (Patienten 2, 3, 7 und 49 siehe Tabelle 6 im Anhang). Insgesamt konnten für das Normalgewebe CDK9-Scores von 22 (Patient 93) bis zu 519 (Patient 49) beobachtet werden. Bei diesen 20 Patienten ergaben sich im Karzinom CDK9-Scores von 6 (Patient 2) bis 1066 (Patient 170).

Abbildung 3 zeigt Bilder von 2 Beispielpatienten. Es soll verdeutlicht werden, dass sowohl bei hohem CDK9-Score im Karzinom (linke Spalte: Patient 165; CDK9-Score Normalgewebe: 81; CDK9-Score Karzinom: 950), als auch bei eher mittlerem CDK9-Score im Karzinom (rechte Spalte: Patient 89; CDK9-Score Normalgewebe: 150; CDK9-Score Karzinom: 623) das Normalgewebe jeweils weniger stark CDK9 exprimiert.

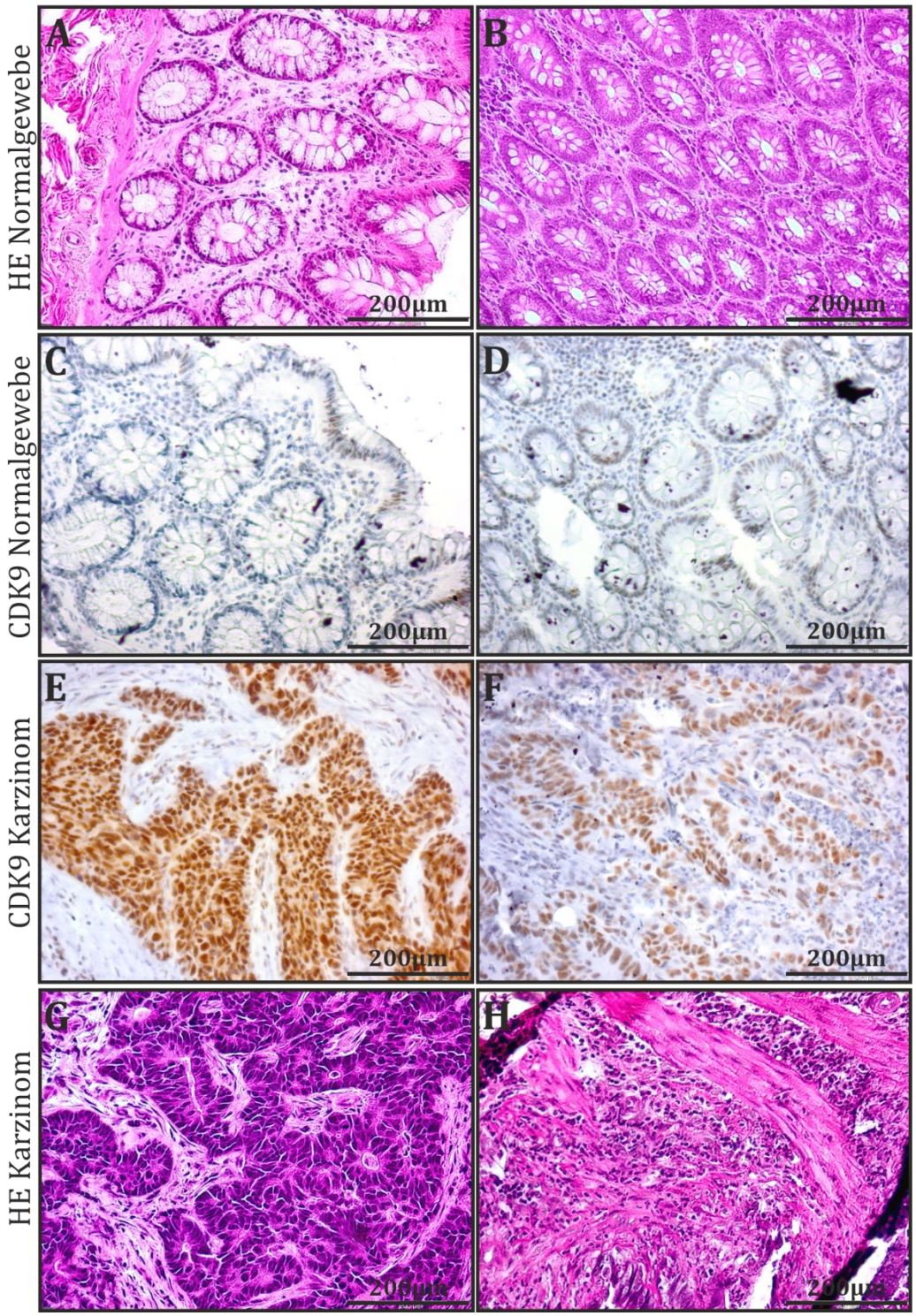

Abbildung 3: HE- und CDK9-Färbungen von Kolontumor- und Normalgewebe.
Die Bilder A, C, E, und G stammen von Patient 165. Die Bilder B, D, F und H stammen von Patient 89. Die obere Zeile zeigt jeweils das Normalgewebe in HE, in der 2. Zeile ist das Normalgewebe in CDK9 (Antikörper C12F7 der Firma Cell Signaling; Peroxidasereaktion Farbstoff DAB+) gefärbt zu sehen und zum Vergleich zeigt Zeile 3 die CDK9-Färbung im Tumorgewebe. In der 4. Zeile ist das Tumorgewebe in HE zu sehen. Für Patient 165 konnte hierbei ein CDK9-Score im Normalgewebe von 81 und im Tumorgewebe von 950 generiert werden. Für Patient 89 konnte ein CDK9-Score im Normalgewebe von 150 und ein CDK9-Score von 623 für das Tumorgewebe generiert werden. Die Bilder sind jeweils in 16facher Vergrößerung dargestellt. Eine Übersicht über die Werte der CDK9-Scores für alle Patienten gibt Tabelle 6 im Anhang. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. DAB+ = 3,3` Diaminobenzidin. HE = Hämatoxylin-Eosin.

Um das unter dem Mikroskop beobachtete genauer quantifizieren zu können, wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für Wertepaare untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von CDK9 im Normalgewebe im Vergleich zum Karzinom bei diesen 20 Patienten gibt. Als Signifikanzniveau wurde zuvor 5% festgelegt. Als Nullhypothese galt die Annahme, dass sich die CDK9-Expression in beiden Gruppen nicht unterscheidet. Die Alternativhypothese besagt folglich, dass es einen Unterschied bezüglich der CDK9-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe gibt. Der Median der CDK9-Scores im Tumorgewebe dieser 20 Patienten liegt bei 535,50. Der Median der CDK9-Scores im Normalgewebe liegt bei 120. Der Wilcoxon-Test ergab eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von p<0,001. Somit kann die Nullhypothese verworfen werden und die niedrigere Expression von CDK9 im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe ist signifikant.

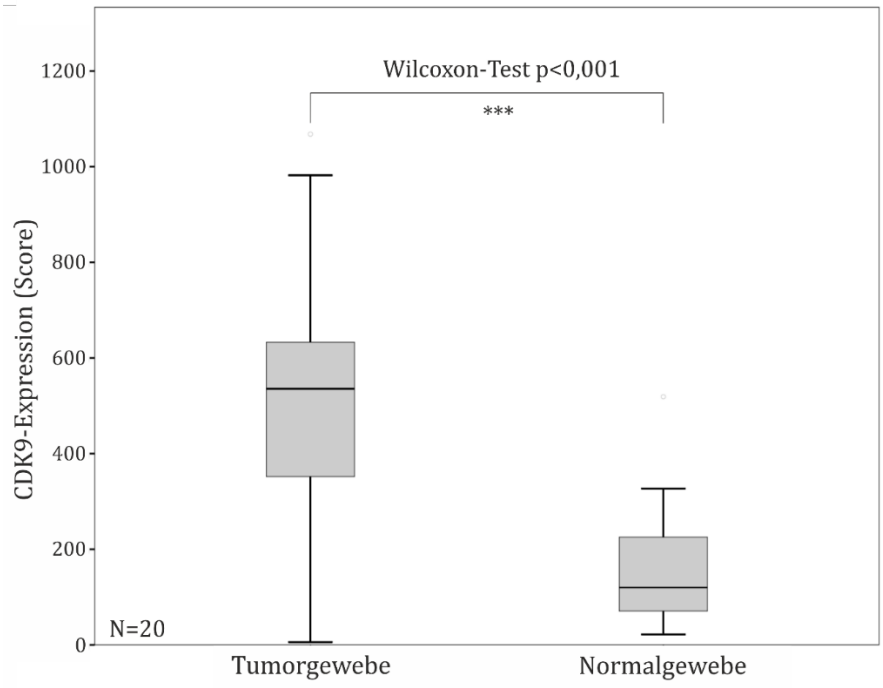

Abbildung 4: Wilcoxon-Test für Wertepaare zum Vergleich der CDK9-Expression im Tumor- und Normalgewebe von 20 Kolontumorpatienten des Universitätsklinikums Ulm (Zeitraum 2003-2014).

Von 20 Patienten wurde die CDK9-Expression im Tumorgewebe mit der CDK9-Expression im Normalgewebe verglichen. Der Wilcoxon-Test für Wertepaare ergab hierbei eine signifikant niedrigere Expression von CDK9 im Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe (p<0,001). Die grauen Balken zeigen die Breite der Wertestreuung der CDK9-Scores an (Ausreißer nicht berücksichtigt). Für das Tumorgewebe ergab sich hierbei ein Median von 535,50, für das Normalgewebe ein Median von 120. Eine Übersicht über die Werte der CDK9-Scores für alle Patienten gibt Tabelle 6 im Anhang. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. N = Patientenanzahl. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3 Prognostische Wertigkeit von CDK9 im Kolonkarzinom

In der immunhistochemischen Betrachtung zeigten sich Unterschiede in der CDK9-Expression innerhalb der Kolonkarzinome des Patientenkollektivs. Um nun zu untersuchen, ob sich die CDK9-Expression in den einzelnen Untergruppen und im Gesamtkollektiv auf das Überleben auswirkt, und CDK9 somit als Prognoseparameter bei Kolonkarzinomen in Betracht kommt, wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven generiert.

3.3.1 Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs

Um einen Überblick über das Überleben der gesamten Studienpopulation zu erhalten, wurde zunächst eine Überlebenszeitanalyse des Gesamtkollektivs angefertigt (Abbildung 5). Es zeigte sich besonders zu Beginn der Beobachtungszeit, also kurze Zeit nach der Primär-OP, ein relativ steiler Abfall der Kurve, was bedeutet, dass besonders zu dieser Zeit das Risiko zu versterben hoch ist. Nach ungefähr 5 Jahren Beobachtungszeit flacht die Kurve dann deutlich ab und es stellt sich in der Zeit von 8 bis 12 Jahren nach der Primär-OP ein Plateau in der Überlebenskurve ein.

Für das in dieser Studie betrachtete Patientenkollektiv zeigt sich hierbei eine 1 Jahres-Überlebensrate von 77%, eine 3 Jahres-Überlebensrate von 64% sowie eine 5 Jahres-Überlebensrate von 58%.

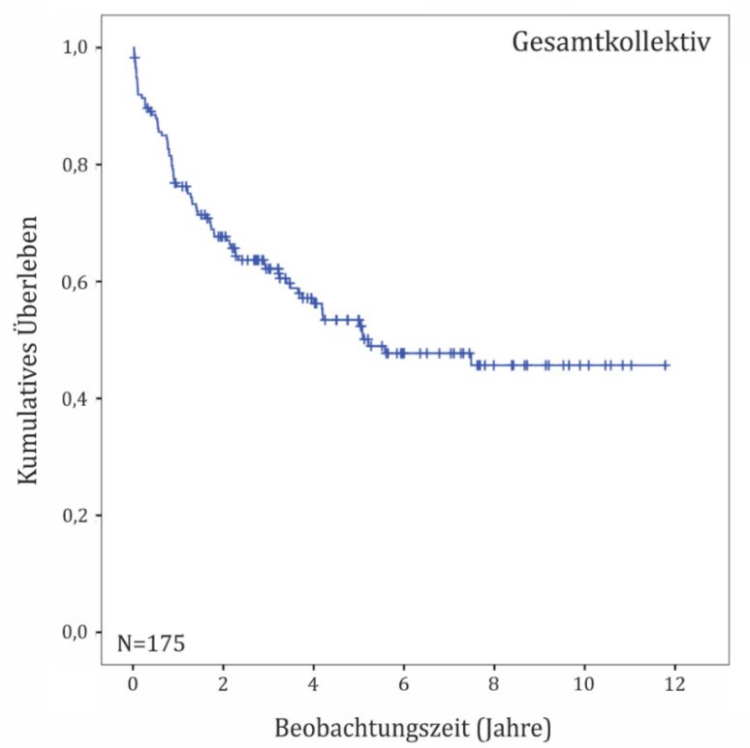

Abbildung 5: Überlebenszeitanalyse aller Kolonkarzinompatienten der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003–2014)

Die x-Achse zeigt die Beobachtungszeit in Jahren. Der Zeitpunkt 0 stellt den Zeitpunkt der Primär-Operation dar. Die y-Achse zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten an. Die senkrechten Striche auf den Überlebenskurven stehen jeweils für zensierte Patienten. Das heißt die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt der Nachbeobachtung noch am Leben, das Endereignis Tod ist also noch nicht eingetreten, oder die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgetreten oder kamen nicht mehr zu weiteren Nachuntersuchungen (lost to follow-up). Eine Übersicht über die Patientendaten gibt Tabelle 7 im Anhang. N = Patientenanzahl.

Das Gesamtkollektiv wurde anschließend auf die Untergruppen CDK9-Expression im Tumorgewebe niedrig, also kleiner gleich 569, sowie CDK9-Expression im Tumorgewebe hoch, also größer 569, aufgeteilt. Es konnten 102 Patienten in die Gruppe mit hoher CDK9-Expression zugeteilt werden. Hierbei zeigte sich ein medianer CDK9-Score von 787. Die übrigen 73 Patienten wurden, mit einem medianen CDK9-Score von 412, der Gruppe mit niedriger CDK9-Expression zugeteilt (Tabelle 5). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Tumorpatienten aus der Gruppe mit hoher CDK9-Expression tendenziell länger leben (Logrank-Test: p=0,087; Abbildung 6). Während in der Gruppe mit der niedrigen CDK9-Expression (blaue Kurve) das mediane Überleben zwischen 4 und 5 Jahren liegt, erreicht die Gruppe mit der hohen CDK9-Expression (grüne Kurve) in den 12 Jahren Nachbeobachtungszeit noch nicht den Punkt, an dem die Überlebenswahrscheinlichkeit nur noch 50% beträgt.

Im Kurvenverlauf der Überlebenszeitanalyse ist zu sehen, dass die Unterschiede im Überleben in Abhängigkeit von der CDK9-Expression zu Beginn der Nachbeobachtungszeit noch nicht eindeutig sind, denn die Kurven liegen hier relativ eng beieinander. Im Laufe der Nachbeobachtungszeit weichen die Kurven dann zunehmend auseinander, mit einem Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom.

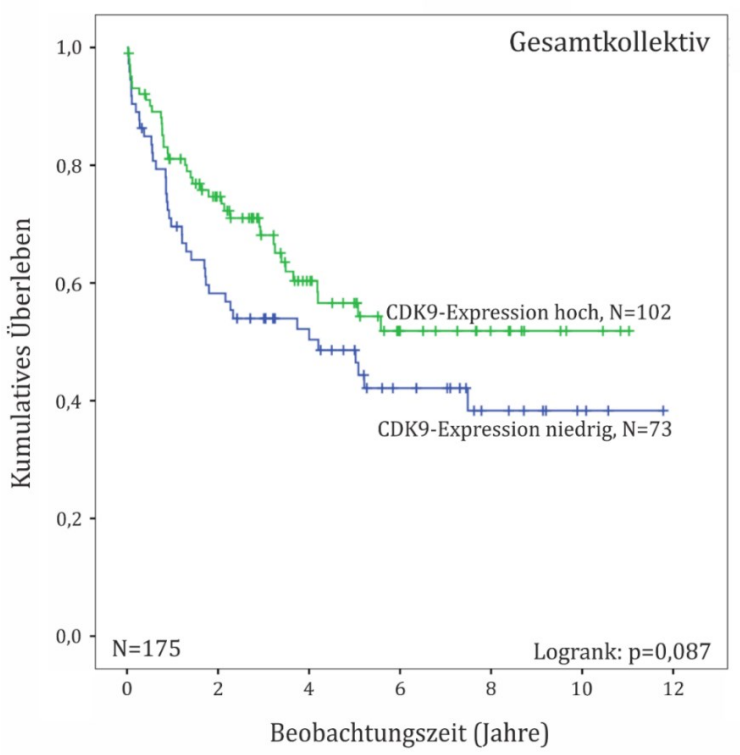

Abbildung 6: Überlebenszeitanalyse aller Kolonkarzinompatienten der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014) in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe.

Die x-Achse zeigt die Beobachtungszeit in Jahren nach der Primär-Operation, an der y-Achse kann die Überlebenschance der Patienten abgelesen werden. Die grüne Kurve steht für die Patienten aus der Gruppe mit hoher CDK9-Expression (CDK9-Score > 569) im Karzinom, hier insgesamt 102 Patienten. Die blaue Kurve zeigt die Überlebenskurve der Patienten mit niedriger CDK9-Expression (CDK9-Score ≤ 569) im Karzinom, also die übrigen 73 Patienten. Die senkrechten Striche auf den Überlebenskurven stehen jeweils für zensierte Patienten. Das heißt die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt der Nachbeobachtung noch am Leben, der Endpunkt Tod ist also noch nicht eingetreten, oder die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgetreten oder kamen nicht mehr zu weiteren Nachuntersuchungen (lost to follow-up). Es zeigte sich, dass die Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom tendenziell länger überleben als die Patienten aus der Gruppe mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom (Logrank-Test: p=0,087). Eine Übersicht über die Patientendaten gibt Tabelle 7 im Anhang. N = Patientenanzahl. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.2 Überlebenszeitanalyse des Patientenkollektivs in Abhängigkeit des Geschlechts und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinom

Anschließend wurden die Patienten anhand ihres Geschlechts in zwei Gruppen unterteilt. In diesen zwei Untergruppen wurde nun untersucht, ob sich das Überleben je nach Höhe der CDK9-Expression signifikant unterscheidet.

Im weiblichen Kollektiv konnte bei 50 Patienten eine hohe CDK9-Expression und bei 32 Patienten eine niedrige CDK9-Expression beobachtet werden. Abbildung 7 zeigt die beiden Überlebenskurven in Abhängigkeit von der CDK9-Expression im Karzinom für das weibliche Patientenkollektiv. Die Kurven weichen in ihrem Verlauf von Beginn an deutlich voneinander ab. Die grüne Kurve zeigt die Patienten mit hoher CDK9-Expression, die blaue Kurve zeigt die Überlebenszeitanalyse für die Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Kolonkarzinom. Zum Ende der Nachbeobachtungszeit haben die weiblichen Patienten aus der Gruppe mit der hohen CDK9-Expression im Karzinom eine Überlebenschance von über 70%, während die Überlebenschance für die weiblichen Patienten aus der Gruppe mit der niedrigen CDK9-Expression im Karzinom zu diesem Zeitpunkt der Nachbeobachtungszeit bei unter 30% liegt. Die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Überlebenskurven sind signifikant (Logrank-Test: p=0,011).

Im männlichen Patientenkollektiv konnten 41 Patienten der Gruppe mit niedriger CDK9-Expression und 52 Patienten in die Gruppe mit hoher CDK9-Expression zugeteilt werden. Die Überlebenswahrscheinlichkeit unterscheidet sich hier je nach Höhe der CDK9-Expression im Karzinom nicht wesentlich voneinander und die beobachteten Unterschiede sind für dieses Patientenkollektiv nicht signifikant (Logrank-Test: p=0,972). Die Überlebenskurven werden in dieser Arbeit nicht abgebildet.

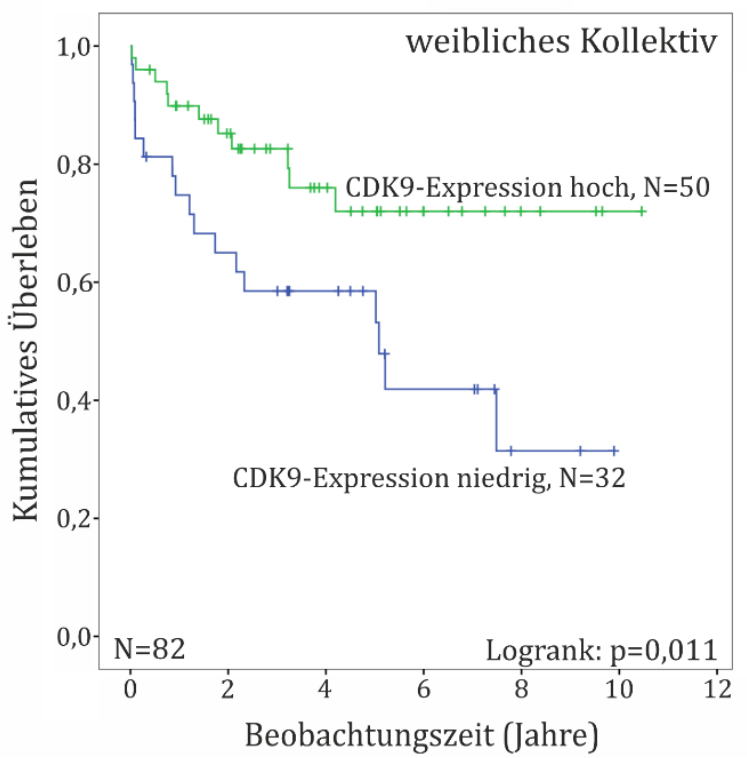

Abbildung 7: Überlebenszeitanalyse des weiblichen Patientenkollektivs mit Kolonkarzinom (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014) in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe.

Auf der x-Achse ist die Beobachtungszeit nach Primär-Operation in Jahren aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patientenkollektivs. Die grüne Überlebenskurve zeigt das Überleben der Patienten mit hoher CDK9-Expression (CDK9-Score > 569), die blaue Kurve zeigt das Überleben der Patienten mit niedriger CDK9-Expression (CDK9-Score ≤ 569) im Karzinom an. Die senkrechten Striche auf den Überlebenskurven stehen jeweils für zensierte Patienten. Das heißt die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt der Nachbeobachtung noch am Leben, der Endpunkt Tod ist also noch nicht eingetreten, oder die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgetreten oder kamen nicht mehr zu weiteren Nachuntersuchungen (lost to follow-up). Die Unterschiede im beobachteten Überleben je nach Höhe der CDK9-Expression im Karzinom sind für das weibliche Patientenkollektiv signifikant (Logrank-Test: p=0,011). Eine Übersicht über die Patientendaten gibt Tabelle 7 im Anhang. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. N = Patientenanzahl. p = Überschreitungs-wahrscheinlichkeit.

3.3.3 Überlebenszeitanalyse des Patientenkollektivs in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinom

Das Patientenkollektiv wurde auch anhand der Tumorlokalisation in zwei Untergruppen unterteilt. Die Grenze der Zuordnung zu „rechtes Kolon“ bzw. „linkes Kolon“ bildet hierbei die linke Kolonflexur. Kolontumoren distal der Bauhin’schen Klappe bis einschließlich des Colon transversum, wurden in die Gruppe „rechtes Kolon“ eingeteilt. Die Patienten mit Kolontumor im Bereich der linken Flexur und distal davon, wurden der Gruppe „linkes Kolon“ zugeteilt.

Abbildung 8 zeigt die Überlebenskurven für Patienten mit einem Tumor im Bereich des rechten Kolons. 68 dieser Patienten konnten der Gruppe mit hoher CDK9-Expression im Tumor zugeteilt werden. Die übrigen 51 Patienten konnten in die Gruppe mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom eingeordnet werden. Die Patientengruppe mit hoher CDK9-Expression im Karzinom zeigt hierbei zu jedem Zeitpunkt eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Unterschiede im Überleben der Patienten mit einem Karzinom im Bereich des rechten Kolons in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression sind hierbei signifikant (Logrank-Test: p=0,037).

Für die Gruppe mit Kolonkarzinom im Bereich des linken Kolons zeigt sich hingegen kein signifikanter Unterschied im Überleben je nach Höhe der CDK9-Expression (Logrank-Test: p=0,989). Die Überlebenskurven werden in dieser Arbeit nicht abgebildet.

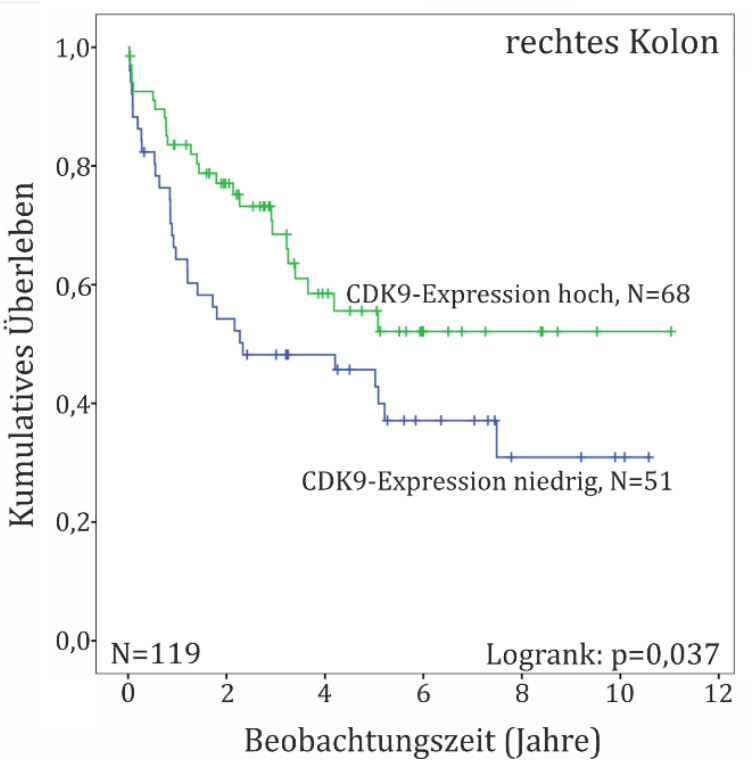

Abbildung 8: Überlebenszeitanalyse von Patienten der Studienpopulation mit Tumoren im Bereich des rechten Kolons (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014) in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe.

Auf der x-Achse ist die Beobachtungszeit nach Primär-Operation in Jahren aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit des jeweiligen Patientenkollektivs. Die grüne Überlebenskurve zeigt das Überleben der Patienten mit hoher CDK9-Expression (CDK9-Score > 569) im Karzinom, die blaue Überlebenskurve zeigt das Überleben der Patienten mit niedriger CDK9-Expression (CDK9-Score ≤ 569) im Karzinom an. Die senkrechten Striche auf den Überlebenskurven stehen jeweils für zensierte Patienten. Das heißt die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt der Nachbeobachtung noch am Leben, der Endpunkt Tod ist also noch nicht eingetreten, oder die Patienten sind zu diesem Zeitpunkt aus der Studie ausgetreten oder kamen nicht mehr zu weiteren Nachuntersuchungen (lost to follow-up). Die Überlebenskurven zeigen das Überleben der Patienten mit Tumoren im Bereich des rechten Kolons an. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher CDK9-Expression gegenüber den Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom (Logrank-Test: p=0,037). Eine Übersicht über die Patientendaten gibt Tabelle 7 im Anhang. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. N = Patientenanzahl. p = Überschreitungswahrscheinlichkeit.

3.3.4 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Staging des Karzinoms und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinomgewebe

Bei der Auswertung wurden die Patienten auch in Untergruppen bezüglich des Stagings, also der TNM-Klassifikation, des Kolontumors unterteilt und dann auf Unterschiede im Überleben der Patienten bezüglich der Höhe der CDK9-Expression im Karzinom untersucht. Im Hinblick auf die Höhe der CDK9-Expression zeigt sich in den Untergruppen jeweils kein wesentlicher Unterschied. Es war aber in den eher lokalen Tumorstadien (T1/T2, N0 und M0) jeweils eine höhere mediane CDK9-Expression,

verglichen mit den entsprechend fortgeschrittenen Tumorstadien, zu beobachten (siehe Tabelle 5).

Wie bereits erwähnt, wurden die Kolontumoren bezüglich des T-Stadiums in zwei Untergruppen zusammengefasst. Die Gruppe der lokal weniger ausgedehnten Karzinome (T1/T2), sowie in die Gruppe der lokal eher ausgedehnten Karzinome (T3/T4). Für die Gruppe der Patienten mit T1/T2 Tumoren, konnte in der Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumor kein signifikanter Unterschied gefunden werden. In der Untergruppe T3/T4 konnten insgesamt 82 Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom und 57 Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom beobachtet werden. Am Ende der Nachbeobachtungszeit zeigt sich ein Vorteil in der Überlebenschance für die Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom. Der beobachtete Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Untergruppe ist signifikant (Logrank-Test: p=0,044).

Bezüglich des Lymphknotenstatus wurden die Patienten ebenfalls in zwei Gruppen unterteilt. Nämlich in die Gruppe mit negativem Lymphknotenstatus (N0), sowie in die Gruppe mit positivem Lymphknotenstatus (N1 oder N2). Hierbei zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe.

Das Patientenkollektiv wurde außerdem im Hinblick auf vorhandene (Gruppe M1) oder nicht vorhandene Fernmetastasen (Gruppe M0) unterteilt. In der Gruppe der Patienten ohne detektierte Metastasen (M0) konnten 73 Patienten mit hoher CDK9-Expression im Tumorgewebe und 49 Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Tumorgewebe beobachtet werden. In dieser Untergruppe konnte tendenziell eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom nachgewiesen werden. Der beobachtete Unterschied ist für dieses Patientenkollektiv jedoch nicht signifikant (Logrank-Test: p=0,286). In der Gruppe der Patienten mit metastasiertem Kolontumor (M1) konnten 23 Patienten in die Gruppe mit niedriger CDK9-Expression im Tumor und 29 Patienten in die Gruppe mit hoher CDK9-Expression im Tumor zugeteilt werden. Auch in dieser Untergruppe zeigt sich eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten mit hoher CDK9-

Expression im Tumor. Die Unterschiede in den beiden Überlebenskurven sind allerdings nicht signifikant (Logrank-Test: p=0,054).

3.3.5 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit vom Grading des Karzinoms und der Höhe der CDK9-Expression im Karzinomgewebe

Wie in Kapitel 3.1 bereits erwähnt, wurden die Patienten bezüglich des Gradings ihrer Karzinome in zwei Untergruppen aufgeteilt. Und zwar in eine Gruppe mit gut differenzierten Karzinomen, also Patienten mit dem Grading G1 oder G2, sowie in eine Gruppe mit schlecht differenzierten Karzinomen, also Patienten mit dem Grading G3 oder G4. In Tabelle 5 ist zu sehen, dass insgesamt 116 Patienten des Kollektivs in die Gruppe mit gut differenzierten Karzinomen zugeteilt werden konnten. 56 Patienten wiederum konnten der Gruppe mit schlecht differenzierten Karzinomen zugeordnet werden. Bezüglich der Überlebenszeitanalyse zeigte sich für die beiden Untergruppen jeweils kein signifikanter Unterschied im Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe. Die Überlebenskurven werden in dieser Arbeit nicht abgebildet.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die meisten Kolonkarzinome CDK9 exprimieren. Bei genauer Betrachtung konnten im Hinblick auf die CDK9-Expression deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kolonkarzinomen beobachtet werden. Folglich zeigte auch der in dieser Arbeit generierte CDK9-Score eine Differenz von minimal 3 bis maximal 1138. Die CDK9-Expression im Normalgewebe im Vergleich zum Karzinomgewebe ergab für 20 zufällig ausgewählte Patienten eine signifikant höhere CDK9-Expression im Karzinomgewebe. Bei der Bestimmung der prognostischen Wertigkeit von CDK9 im Kolonkarzinom zeigte eine Untersuchung des Gesamtkollektivs ein tendenziell besseres Überleben für Patienten mit hoher CDK9-Expression im Karzinom. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In einzelnen Untergruppen des Patientenkollektivs, wie beispielsweise den Patienten mit Karzinom im Bereich des rechten Kolons, konnte jedoch ein signifikant besseres Überleben bei Kolonkarzinomen mit hoher CDK9-Expression beobachtet werden. Eine hohe CDK9-Expression scheint folglich bei Kolonkarzinomen, zumindest in einzelnen Subgruppen, ein positiver Prognoseparameter zu sein.

4 Diskussion

Noch immer sind Kolonkarzinome eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen für beide Geschlechter, was eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Therapie von Kolonkarzinomen erforderlich macht [25, 33]. Entscheidend ist es hierbei, neue Strukturen für eine zielgerichtete Therapie zu finden, um eine möglichst selektive Wachstumshemmung bzw. Apoptose für die Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung der gesunden Zellen zu erreichen und dabei die Therapienebenwirkungen möglichst gering halten zu können. Als Entscheidungshilfe bezüglich der Therapieeskalation dienen Prognosefaktoren. Es ist daher nicht nur entscheidend die Therapiemöglichkeiten weiterzuentwickeln, sondern auch neue Prognosefaktoren zu finden, um die zukünftige Therapie dem individuellen Risikoprofil des Patienten anpassen zu können.

Die Mitglieder der CDK-Familie gelten aufgrund ihrer Beteiligung an vielen wichtigen zellulären Prozessen schon länger als ein vielversprechender Forschungsansatz bezüglich der Pathogenese sowie der Therapie unterschiedlicher Erkrankungen, darunter auch Karzinome [50, 55, 58, 76, 92].

CDK9 ist entscheidend an der Regulation der Transkription beteiligt [37, 80, 110, 117, 123]. Deregulationen in diesem Bereich können folglich zur Tumorentstehung beitragen. Es konnte bereits bei mehreren Tumorarten eine erhöhte Expression von CDK9 nachgewiesen werden [6, 60, 83, 114] und mehrere Studien erbrachten bereits vielversprechende Ergebnisse für den Einsatz von CDK9 Inhibitoren in der Tumortherapie [23, 24, 60, 64, 114, 121].

Ziel dieser Arbeit war es zu evaluieren, ob CDK9 in Kolonkarzinomen exprimiert wird. Zudem sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied in der CDK9-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe gibt und ob sich die CDK9-Expression innerhalb der Kolonkarzinome unterscheidet. Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob CDK9 einen Prognoseparameter in Kolonkarzinomen darstellt.

4.1 Immunhistochemischer Nachweis der CDK9-Expression in Karzinomen

Die meisten Kolonkarzinome exprimieren CDK9. Insgesamt zeigten sich große Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression und es konnten CDK9-Scores von 3 bis 1138 generiert werden. Diese Unterschiede in der CDK9-Expression zeigten sich auch in den einzelnen Subgruppen.

Unterschiede in der CDK9-Expression konnten auch für andere Tumorentitäten nachgewiesen werden. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der CDK9-Expression bei Brustkrebspatienten mit Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie konnte bei 36 Patienten eine hohe Expression und bei 31 Patienten eine niedrige Expression nachgewiesen werden. Auch für die einzelnen Subgruppen (je nach Tumorstaging und je nach Rezeptorstatus des Tumors) konnten jeweils sowohl Patienten mit hoher als auch Patienten mit niedriger CDK9-Expression beobachtet werden [105]. Des Weiteren erbrachte die immunhistochemische Untersuchung der CDK9-Expression bei 54 Patienten mit Adenokarzinomen des Pankreas für die ermittelten CDK9-Scores ebenfalls eine weite Streuung innerhalb der Tumoren. Auch hier konnten in den einzelnen Subgruppen sowohl Karzinome mit hoher als auch mit niedriger CDK9-Expression beobachtet werden. Beim Betrachten der Daten fällt hierbei allerdings auf, dass bei den überlebenden Patienten, sowie bei gut differenzierten Tumoren (G1/G2) jeweils mehr Patienten in die Gruppe mit niedriger CDK9-Expression zugeteilt werden konnten und es zeigte sich, dass CDK9 hier einen negativen Prognoseparameter darstellt [60]. Bei speziellen Knochentumoren, Chordomen, zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der CDK9-Expression innerhalb der Tumore. Bei 24 Patienten konnte eine niedrige CDK9-Expression und bei 31 Patienten eine hohe CDK9-Expression beobachtet werden. In Zellkulturversuchen konnte nach Zugabe eines CDK9 Inhibitors ein reduziertes Zellwachstum sowie eine Zunahme pro-apoptotischer Moleküle und eine Abnahme anti-apoptotischer Moleküle nachgewiesen werden [107].

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Studie zeigte sich zudem, dass bei Kolonkarzinomen in eher lokalen Tumorstadien (T1/T2, N0, M0), sowie bei gut differenzierten Tumoren (G1/G2) jeweils tendenziell höhere CDK9-Scores zu beobachten sind. Dies konnte bisher in anderen Tumorentitäten nicht bestätigt

werden. Bei Patienten mit Osteosarkom und Ovarialkarzinom zeigte sich hingegen bei bereits metastasierten Tumoren eine signifikant höhere CDK9-Expression als bei nicht metastasierten Tumoren [74, 118]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte durch die Auswertung von Tumor-Datenbanken zeigen, dass in Kolorektalkarzinomen im UICC-Stadium 3 und 4 höhere CDK9-mRNA Level nachweisbar sind als im UICC-Stadium 2, was den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie widerspricht [119]. Hier muss jedoch beachtet werden, dass im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit nicht das mRNA Level, sondern das Proteinlevel von CDK9 immunhistochemisch untersucht wurde. Bei der Beurteilung der IHC-Färbungen muss zudem bedacht werden, dass die IHC-Färbung lediglich die Expression von CDK9 widerspiegelt. Das reine Expressionslevel des Proteins sagt allerdings nichts über die Kinaseaktivität aus, denn die Aktivität der CDK-Familie kann nicht nur durch das Binden spezieller Cycline, sondern auch beispielsweise durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung einzelner Aminosäuren verändert werden [26, 30]. Folglich wären weiterführende Untersuchungen erforderlich, um auch die Kinaseaktivität von CDK9 in den jeweiligen Tumorentitäten evaluieren zu können.

4.2 Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression im Normalgewebe und im Tumorgewebe

Um zu untersuchen, ob sich die CDK9-Expression im Normalgewebe und im Karzinomgewebe unterscheidet, wurde bei 20 zufällig ausgewählten Patienten zusätzlich das Normalgewebe immunhistochemisch untersucht und anschließend ein CDK9-Score generiert. Bei diesen 20 Patienten zeigte sich eine signifikant höhere CDK9-Expression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls durch eine immunhistochemische Untersuchung der CDK9-Expression in Kolonkarzinomen für Patienten im UICC-Stadium IV eine deutlich höhere CDK9-Expression im Karzinom verglichen mit dem Normalgewebe zeigen [119]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten auch bei anderen Tumorentitäten ähnliche Ergebnisse beobachten. So zeigten Untersuchungen, dass CDK9 sowohl bei der Differenzierung von Lymphozyten im Rahmen der Immunreaktion als auch bei einigen Lymphomen hoch exprimiert ist [6]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte in Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren sowohl eine erhöhte

Expression von CDK9 als auch von Cyclin T1 nachweisen [83]. Auch Untersuchungen an Tumoren des Gastrointestinaltrakts konnten die Ergebnisse dieser Studie bestätigen. So zeigte sich bei der immunhistochemischen Untersuchung von 18 Pankreas-Tumorpatienten eine signifikant höhere Expression von CDK9 im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe. In Zellkulturversuchen konnte eine deutliche Reduktion der Pankreaskarzinomzellen durch die Behandlung mit einem CDK9 Inhibitor erreicht werden. Als zugrundeliegender Mechanismus konnte hierbei sowohl eine Zellzyklusarrest-Induktion als auch eine Apoptose-Induktion durch ein verändertes Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Moleküle nachgewiesen werden [60]. Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Magen-Adenokarzinomen konnte eine signifikant höhere Expression von Cyclin T1, jedoch nicht von CDK9, im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe nachgewiesen werden [54]. In einer anderen Studie konnte hingegen eine erhöhte CDK9-Expression in Magenkarzinomen verglichen mit dem Normalgewebe nachgewiesen werden [70]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass CDK9 in Zelllinien von Ösophagus-Adenokarzinomen hoch exprimiert ist. Auch im Rahmen dieser Studie konnte an Karzinomzelllinien eine signifikante Reduktion der Zellproliferation, sowie eine Steigerung der Apoptose durch die Behandlung mit einem CDK9 Inhibitor nachgewiesen werden [114]. Zudem konnte bei Zervixkarzinomen und Hepatozellulären Karzinomen jeweils eine höhere Konzentration an CDK9-mRNA nachgewiesen werden, verglichen mit dem jeweiligen Normalgewebe [90, 122]. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass es im Rahmen der Tumorentstehung zu einer Überexpression von CDK9 kommt. In einigen der hier genannten Studien konnte im Rahmen von Zellkulturversuchen zudem eine Hemmung der Zellproliferation sowie eine Apoptoseinduktion für die unterschiedlichen Tumorentitäten durch einen Einsatz von CDK9 Inhibitoren nachgewiesen werden [60, 90, 114, 122]. Auch für Kolorektalkarzinome konnte eine Arbeitsgruppe diesbezüglich bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen. So konnte durch den Einsatz eines CDK9 Inhibitors in Zellkulturversuchen eine Hemmung der Zellproliferation sowie eine Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. In Versuchen mit xenotransplantierten Nacktmäusen konnte durch die Behandlung mit einem CDK9 Inhibitor zudem eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen werden [101]. Somit konnten auch für Kolonkarzinome bereits erste vielversprechende Ergebnisse

bezüglich eines möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatzes von CDK9 Inhibitoren erzielt werden.

4.3 Prognostische Wertigkeit von CDK9 in Tumoren

Ziel war es nun, die beobachteten Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression bezüglich der Prognoserelevanz für Kolonkarzinome einzuordnen. Wie bereits erwähnt, wurde hierzu die bewährte Methode nach Kaplan-Meier zur Generierung von Überlebenskurven genutzt [41, 125].

Nach Erstellung von Kaplan-Meier Kurven in Abhängigkeit von der Höhe der CDK9-Expression im Tumorgewebe, konnten für das Gesamtkollektiv keine signifikanten Unterschiede für das Überleben der Patienten beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich die Tendenz zu besserem Überleben bei hoher CDK9-Expression im Kolonkarzinom.

Ähnliche Untersuchungen wurden bereits für andere Tumore des Gastrointestinaltrakts durchgeführt. Eine Arbeitsgruppe konnte beispielsweise bei 39 Patienten mit Magen-Adenokarzinomen einen Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher Cyclin T1-Expression im Karzinom zeigen [54]. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle von CDK9 als Prognoseparameter bei Brustkrebspatienten mit Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie, die nach dieser Chemotherapie keine komplette pathologische Remission aufwiesen. Hierbei zeigte sich ab dem 3. Jahr der Nachbeobachtungszeit ein signifikant besseres Überleben für die Patienten mit hoher CDK9-Expression, was dafürspricht, dass CDK9 bei diesen Tumoren einen positiven Prognoseparameter für das Langzeitüberleben der Patienten darstellt [105]. Die Überlebenszeitanalyse von 54 Patienten mit einem Pankreaskarzinom ergab hingegen ein signifikant besseres Überleben für die Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom verglichen mit den Patienten mit hoher CDK9-Expression. Dieses Ergebnis galt insbesondere für die Patienten mit gut differenzierten Karzinomen [60]. Auch bei Ovarialkarzinomen, Osteosarkomen und Synovialsarkomen konnte ein signifikant besseres Überleben für Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Tumor beobachtet werden [66, 74, 118]. Eine andere Arbeitsgruppe wertete die Ergebnisse einer Tumor-Datenbank aus. Speziell wurde hierbei das Expressionslevel von CDK9 in 605 Kolorektalkarzinomen ermittelt und ebenfalls mit dem Überleben korreliert.

Hier zeigte sich für Kolonkarzinompatienten mit hoher CDK9-Expression ein signifikant schlechteres Überleben als für Kolonkarzinompatienten mit niedriger CDK9-Expression. Der beobachtete Unterschied war jedoch nur bei einer Überlebenszeit von unter 3 Jahren signifikant [119]. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen in dieser Arbeit, denn hier zeigte sich tendenziell ein besseres Überleben für die Patienten mit hoher CDK9-Expression im Kolonkarzinom. Was ursächlich für die widersprüchlichen Ergebnisse ist, kann aktuell nicht abgeschätzt werden. Zudem kann auch die Ursache für die beschriebenen unterschiedlichen Beobachtungen in den unterschiedlichen Tumorentitäten nicht eruiert werden und weitere Untersuchungen bezüglich der genauen Funktion und der Kinaseaktivität von CDK9 im jeweiligen Karzinom wären nötig. Zusätzlich sind für Kolonkarzinome weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven mit längerer Nachbeobachtungszeit nötig, um abschätzen zu können, ob CDK9 für Kolontumorpatienten einen Prognoseparameter darstellt.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die CDK9-Expression innerhalb der Kolonadenokarzinome deutlich variiert. CDK9 ist in bestimmten Subgruppen von Patienten mit Kolonkarzinomen außerdem ein positiver Prognoseparameter. Dies zeigte sich tendenziell auch in der Gesamtbevölkerung. Um die Prognoserelevanz von CDK9 für Kolonkarzinome abschließend beurteilen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven und mit längerer Nachbeobachtungszeit notwendig. Da es im Vergleich zum Normalgewebe zu einer Zunahme der CDK9-Expression im Karzinom kommt und CDK9 wichtige regulatorische Funktionen in vielen zellulären Prozessen wie beispielsweise der Transkription einnimmt [37, 80, 110, 117, 123], könnte der Einsatz von CDK9 Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz in der zukünftigen Therapie von Kolontumoren darstellen. In diesem Zusammenhang konnte in Studien sowohl bei anderen Tumorarten als auch bei Kolorektalkarzinompatienten eine Reduktion der Tumorzellen durch den Einsatz von CDK9 Inhibitoren in Zellkulturversuchen nachgewiesen werden [23, 24, 60, 64, 114, 121]. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um eine abschließende Aussage bezüglich der Wirksamkeit und Verträglichkeit von CDK9 Inhibitoren für unterschiedliche Tumorentitäten treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Kolonkarzinome sind weltweit für beide Geschlechter eine der häufigsten Tumorarten und dabei auch für eine Vielzahl der jährlichen tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Durch eine Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten soll die Prognose der Patienten mit Kolonkarzinomen stetig verbessert werden und auch bisher resistente Karzinome, weit fortgeschrittene Karzinome, metastasierte Karzinome und auch Tumorrezidive besser für die Therapie zugänglich werden. Ziel sollte hierbei sein, neue Zielstrukturen für eine gezielte und möglichst nebenwirkungsarme Tumortherapie zu entdecken und neue Prognoseparameter zu etablieren, die eine Hilfestellung bei der Therapieentscheidung darstellen können.

Die Mitglieder der CDK (Cyclin-dependent kinase) - Familie spielen eine wichtige Rolle in vielen regulatorischen Prozessen in der Zelle und es ist deshalb nicht erstaunlich, dass CDK9 als solch eine neue Zielstruktur für viele Tumorentitäten in Betracht gezogen wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob CDK9 in Kolonkarzinomen exprimiert wird. Zudem sollte untersucht werden, ob innerhalb der Kolontumore Unterschiede in der Höhe der CDK9-Expression beobachtet werden können und ob sich diese Unterschiede auf das Überleben der Patienten auswirken. Ziel dieser Arbeit war es zudem zu überprüfen, ob ein Unterschied bezüglich der CDK9-Expression im Tumor- verglichen mit dem Normalgewebe nachweisbar ist.

Insgesamt konnten 175 Patienten mit Kolonadenokarzinomen in die Studie aufgenommen werden und das Karzinomgewebe immunhistochemisch untersucht werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die meisten der Kolonkarzinome CDK9 exprimieren. Die generierten CDK9-Scores ergaben einen deutlichen Unterschied in der Höhe der CDK9-Expression zwischen den einzelnen Tumoren. Bei 20 zufällig ausgewählten Patienten wurde zusätzlich zum Tumorgewebe auch das Normalgewebe immunhistochemisch untersucht. Hierbei konnte eine signifikant höhere CDK9-Expression im Karzinomgewebe nachgewiesen werden. Es kommt folglich im Verlauf der Tumorentwicklung zu einer Zunahme der CDK9-Expression im Kolongewebe. Dies konnte ebenfalls bereits für viele andere Tumorentitäten nachgewiesen werden. Um in der Folge zu überprüfen, ob sich die Höhe der CDK9-Expression im Kolontumorgewebe

auf das Überleben der Patienten auswirkt, wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven generiert. CDK9 scheint hierbei für Kolonkarzinome dieses Patientenkollektivs ein positiver Prognoseparameter zu sein. Das ergab sich in einzelnen Subgruppen und auch in der Gesamtpopulation konnte zumindest die Tendenz zu verbessertem Überleben bei hoher CDK9-Expression im Tumor gesehen werden. In anderen Studien konnte CDK9 in unterschiedlichen Tumorentitäten sowohl als positiver als auch als negativer Prognoseparameter ermittelt werden. In einer Studie mit Kolonkarzinomen ergab sich für Patienten mit einer Überlebensdauer unter 3 Jahren hingegen ein besseres Überleben für Patienten mit niedriger CDK9-Expression im Karzinom. Eine abschließende Aussage über CDK9 als möglichen Prognoseparameter in Kolonkarzinomen kann folglich noch nicht getroffen werden. Hierzu sollten weitere Studien mit größerer Studienpopulation und längerer Nachbeobachtungszeit durchgeführt werden.

Für Kolorektalkarzinome konnte neben vielen anderen Tumorarten bereits in Zellkulturversuchen eine Hemmung der Zellproliferation sowie eine Apoptose-Induktion für Tumorzellen durch den Einsatz von CDK9 Inhibitoren nachgewiesen werden. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig bezüglich der Verträglichkeit und Effektivität eines möglichen zukünftigen therapeutischen Einsatzes von CDK9 Inhibitoren für Tumorpatienten.

6 Literaturverzeichnis

[1] Akhtar MS, Heidemann M, Tietjen JR, Zhang DW, Chapman RD, Eick D, Ansari AZ: *TFIIH kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II.* Mol Cell 34: 387-393 (2009)

[2] Allison LA, Moyle M, Shales M, Ingles CJ: *Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases.* Cell 42: 599-610 (1985)

[3] Atchison EA, Gridley G, Carreon JD, Leitzmann MF, McGlynn KA: *Risk of cancer in a large cohort of U.S. veterans with diabetes.* Int J Cancer 128: 635-643 (2011)

[4] Barillari P, Ramacciato G, De Angelis R, Gozzo P, Indinnimeo M, Valabrega S, Aurello P, Fegiz G: *Effect of preoperative colonoscopy on the incidence of synchronous and metachronous neoplasms*. Acta Chir Scand 156: 163-166 (1990)

[5] Barton JB, Langdale LA, Cummins JS, Stelzner M, Lynge DC, Mock CN, Nason KS, Billingsley KG: *The utility of routine preoperative computed tomography scanning in the management of veterans with colon cancer*. Am J Surg 183: 499-503 (2002)

[6] Bellan C, De Falco G, Lazzi S, Micheli P, Vicidomini S, Schürfeld K, Amato T, Palumbo A, Bagella L, Sabattini E, Bartolommei S, Hummel M, Pileri S, Tosi P, Leoncini L, Giordano A: *CDK9/CYCLIN T1 expression during normal lymphoid differentiation and malignant transformation.* J Pathol 203: 946-952 (2004)

[7] Blake MC, Azizkhan JC: *Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo.* Mol Cell Biol 9: 4994-5002 (1989)

[8] Brenner H, Altenhofen L, Stock C, Hoffmeister M: *Prevention, early detection, and overdiagnosis of colorectal cancer within 10 years of screening colonoscopy in Germany.* Clin Gastroenterol Hepatol 13: 717-723 (2015)

[9] Brenner H, Schrotz-King P, Holleczek B, Katalinic A, Hoffmeister M: *Declining bowel cancer incidence and mortality in Germany*. Dtsch Arztebl Int 113: 101–106 (2016)

[10] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C: *Einleitung.* In: TNM Klassifikation maligner Tumoren, Wittekind C (Hrsg), 8. Aufl, Wiley-VCH, Weinheim: 1-23 (2017 a)

[11] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C: *Kolon und Rektum.* In: TNM Klassifikation maligner Tumoren, Wittekind C (Hrsg), 8. Aufl, Wiley-VCH, Weinheim: 97-102 (2017 b)

[12] Burdette-Radoux S, Tozer RG, Lohmann RC, Quirt I, Ernst DS, Walsh W, Wainman N, Colevas AD, Eisenhauer EA: *Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma.* Invest New Drugs 22: 315-322 (2004)

[13] Burry RW: *Specificity controls for immunocytochemical methods.* J Histochem Cytochem 48: 163-165 (2000)

[14] Caan BJ, Coates AO, Slattery ML, Potter JD, Quesenberry CP Jr, Edwards SM: *Body size and the risk of colon cancer in a large case-control study.* Int J Obes Relat Metab Disord 22: 178-184 (1998)

[15] Campbell NA, Reece JB, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R: *Die Grundlagen der Transkription und Translation.* In: Biologie, Kratochwil A, Scheibe R, Wieczorek H (Hrsg), 8. Aufl, Pearson Studium, München, Boston, San Francisco: 439-441 (2009 a)

[16] Campbell NA, Reece JB, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R: *Die molekularen Komponenten des Transkriptionsapparates.* In: Biologie, Kratochwil A, Scheibe R, Wieczorek H (Hrsg), 8. Aufl, Pearson Studium, München, Boston, San Francisco: 444-446 (2009 b)

[17] Campbell NA, Reece JB, Urry L, Cain M, Wasserman S, Minorsky P, Jackson R: *Synthese eines RNA-Transkriptes.* In: Biologie, Kratochwil A, Scheibe R, Wieczorek H (Hrsg), 8. Aufl, Pearson Studium, München, Boston, San Francisco: 446-447 (2009 c)

[18] Canbey Göret C, Göret NE: *Histopathological analysis of 173 consecutive patients with colorectal carcinoma: a pathologist's view.* Med Sci Monit 24: 6809-6815 (2018)

[19] Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, Reynolds F, Gerdes J, Rilke F: *Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections*. J Pathol 171: 83-98 (1993)

[20] Chamadol N, Ninpiethoon T, Bhudhisawasd V, Pairojkul C: *The role of CT scan in preoperative staging of colorectal carcinoma*. J Med Assoc Thai 88: 1847-1853 (2005)

[21] Chao SH, Fujinaga K, Marion JE, Taube R, Sausville EA, Senderowicz AM, Peterlin BM, Price DH: *Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication.* J Biol Chem 275: 28345-28348 (2000)

[22] Chen HS, Sheen-Chen SM: *Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends*. Dis Colon Rectum 43: 1093-1099 (2000)

[23] Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W: *Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death.* Blood 106: 2513-2519 (2005)

[24] Chen R, Wierda WG, Chubb S, Hawtin RE, Fox JA, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W: *Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia.* Blood 113: 4637-4645 (2009)

[25] Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G, Weg-Remers S: *Übersichten zu den Krebsneuerkrankungs- und Krebssterbefällen.* In: Krebs in Deutschland für 2015/2016, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 12. Ausgabe, Berlin: 16-17, 38-41 (2019)

[26] Connell-Crowley L, Solomon MJ, Wei N, Harper JW: *Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro.* Mol Biol Cell 4: 79-92 (1993)

[27] Conroy A, Stockett DE, Walker D, Arkin MR, Hoch U, Fox JA, Hawtin RE: *SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples.* Cancer Chemother Pharmacol 64: 723-732 (2009)

[28] Corden JL, Cadena DL, Ahearn JM Jr, Dahmus ME: *A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II.* Proc Natl Acad Sci USA 82: 7934-7938 (1985)

[29] Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R: *A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association.* Cancer Res 70: 2406-2414 (2010)

[30] De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH: *Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.* Nature 363: 595-602 (1993)

[31] Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: *Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement.* Lancet 336: 357-359 (1990)

[32] Fenlon HM, McAneny DB, Nunes DP, Clarke PD, Ferrucci JT: *Occlusive colon carcinoma: virtual colonoscopy in the preoperative evaluation of the proximal colon*. Radiology 210: 423-428 (1999)

[33] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.* Int J Cancer 136: E359-E386 (2015)

[34] Flynn J, Jones J, Johnson AJ, Andritsos L, Maddocks K, Jaglowski S, Hessler J, Grever MR, Im E, Zhou H, Zhu Y, Zhang D, Small K, Bannerji R, Byrd JC: *Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia 29: 1524-1529 (2015)

[35] Fu TJ, Peng J, Lee G, Price DH, Flores O: *Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription.* J Biol Chem 274: 34527-34530 (1999)

[36] Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC: *A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer.* N Engl J Med 331: 1669-1674 (1994)

[37] Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM: *Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element.* Mol Cell Biol 24: 787-795 (2004)

[38] Garrett MD, Fattaey A: *CDK inhibition and cancer therapy*. Curr Opin Genet Dev 9: 104-111 (1999)

[39] Gaus W, Muche R: *Logrank-Test*. In: Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe, 2. Aufl, Schattauer, Stuttgart: 296-300 (2017 a)

[40] Gaus W, Muche R: *Rangtests*. In: Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe, 2. Aufl, Schattauer, Stuttgart: 302-311 (2017 b)

[41] Gaus W, Muche R: *Überlebenszeitanalyse*. In: Medizinische Statistik: Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe, 2. Aufl, Schattauer, Stuttgart: 188-201 (2017 c)

[42] Gemeinsamer Bundesausschuss 2018: *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses für organisierte Krebsfrüherkennungsprogramme*. https://www.g-ba.de/downloads/62-492-2001/oKFE-RL-2019-12-05-iK-2020-01-01.pdf, 11-16, 27-47 (abgerufen am: 28.01.2020)

[43] Ghia P, Scarfò L, Perez S, Pathiraja K, Derosier M, Small K, McCrary Sisk C, Patton N: *Efficacy and safety of dinaciclib vs ofatumumab in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia*. Blood 129: 1876-1878 (2017).

[44] Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW: *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.* Nature 349: 132-138 (1991)

[45] Graña X, De Luca A, Sang N, Fu Y, Claudio PP, Rosenblatt J, Morgan DO, Giordano A: *PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro.* Proc Natl Acad Sci USA 91: 3834-3838 (1994)

[46] Hanks SK: *Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective.* Genome Biol 4: 111 (2003)

[47] Heath EI, Bible K, Martell RE, Adelman DC, LoRusso PM: *A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors.* Invest New Drugs 26: 59-65 (2008)

[48] Herbst H, Hübner JH: *Die indirekte bzw. 2-Schritt-indirekte Methode*. http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/ (abgerufen am: 29.10.2018)

[49] Hundt W, Braunschweig R, Reiser M: *Evaluation of spiral CT in staging of colon and rectum carcinoma*. Eur Radiol 9: 78-84 (1999)

[50] Iorns E, Turner NC, Elliott R, Syed N, Garrone O, Gasco M, Tutt AN, Crook T, Lord CJ, Ashworth A: *Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer.* Cancer Cell 13: 91-104 (2008)

[51] Jass JR, Sobin LH, in collaboration with pathologists in 9 countries: *Large Intestine.* In: Histological typing of intestinal tumours, 2. Aufl, Springer, Berlin, Heidelberg, New York: 29-40 (1989)

[52] Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP: *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex.* Nature 376: 313-320 (1995)

[53] Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L: *Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies.* Clin Gastroenterol Hepatol 10: 639-645 (2012)

[54] Jin JS, Lin LF, Chen JC, Huang CC, Sheu JH, Chen W, Tsao TY, Hsu CW: *Increased cyclin T1 expression as a favorable prognostic factor in treating gastric adenocarcinoma.* Oncol Lett 10: 3712-3718 (2015)

[55] Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH: *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.* Science 264: 436-440 (1994)

[56] Kanamoto T, Matsuki M, Okuda J, Inada Y, Tatsugami F, Tanikake M, Yoshikawa S, Narabayashi I, Kawasaki H, Tanaka K, Yamamoto T, Tanigawa N, Egashira Y, Shibayama Y: *Preoperative evaluation of local invasion and metastatic lymph nodes of colorectal cancer and mesenteric vascular variations using multidetector-row computed tomography before laparoscopic surgery*. J Comput Assist Tomogr 31: 831-839 (2007)

[57] Kim SH, Kook MC, Shin YK, Park SH, Song HG: *Evaluation of antigen retrieval buffer systems*. J Mol Histol 35: 409-416 (2004)

[58] Kollmann K, Heller G, Schneckenleithner C, Warsch W, Scheicher R, Ott RG, Schäfer M, Fajmann S, Schlederer M, Schiefer AI, Reichart U, Mayerhofer M, Hoeller C, Zöchbauer-Müller S, Kerjaschki D, Bock C, Kenner L, Hoefler G, Freissmuth M, Green AR, Moriggl R, Busslinger M, Malumbres M, Sexl V: *A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis.* Cancer Cell 24: 167-181 (2013)

[59] Komarnitsky P, Cho EJ, Buratowski S: *Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription.* Genes Dev 14: 2452-2460 (2000)

[60] Kretz AL, Schaum M, Richter J, Kitzig EF, Engler CC, Leithäuser F, Henne-Bruns D, Knippschild U, Lemke J: *CDK9 is a prognostic marker and therapeutic target in pancreatic cancer.* Tumour Biol 39: 1-12 (2017)

[61] Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M, Wahl LM, Harris ED, Mikovits JA, Monks AP, Hollingshead MG, Sausville EA, Staudt LM: *Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol.* Genome Biol 2: RESEARCH0041 (2001)

[62] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*, Langversion 2.1, 2019 a, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, http://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/ 106-107, 121-123, 135-137, 141-144, 148-154, 181-184, 193-199 (abgerufen am: 25.02.2019)

[63] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom*, Langversion 2.1, 2019 b, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, http://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/ 108-116 (abgerufen am: 25.02.2019)

[64] Lemke J, von Karstedt S, Abd El Hay M, Conti A, Arce F, Montinaro A, Papenfuss K, El-Bahrawy MA, Walczak H: *Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1.* Cell Death Differ 21: 491-502 (2014)

[65] Leong AS, Gilham PN: *The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens.* Pathology 21: 266-268 (1989)

[66] Li X, Seebacher NA, Xiao T, Hornicek FJ, Duan Z: *Targeting regulation of cyclin dependent kinase 9 as a novel therapeutic strategy in synovial sarcoma*. J Orthop Res 37: 510-521 (2019)

[67] Liang PS, Chen TY, Giovannucci E: *Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis.* Int J Cancer 124: 2406-2415 (2009)

[68] Liu G, Gandara DR, Lara PN Jr, Raghavan D, Doroshow JH, Twardowski P, Kantoff P, Oh W, Kim K, Wilding G: *A phase II trial of flavopiridol (NSC #649890) in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer.* Clin Cancer Res 10: 924-928 (2004)

[69] Lu H, Zawel L, Fisher L, Egly JM, Reinberg D: *Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II.* Nature 358: 641-645 (1992)

[70] Lu Y, Tang L, Zhang Q, Zhang Z, Wei W: *MicroRNA-613 inhibits the progression of gastric cancer by targeting CDK9*. Artif Cells Nanomed Biotechnol 46: 980-984 (2018)

[71] Lundberg AS, Weinberg RA: *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes.* Mol Cell Biol 18: 753-761 (1998)

[72] Lunde BM, Reichow SL, Kim M, Suh H, Leeper TC, Yang F, Mutschler H, Buratowski S, Meinhart A, Varani G: *Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain.* Nat Struct Mol Biol 17: 1195-1201 (2010)

[73] Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B: *Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies.* Inflamm Bowel Dis 19: 789-799 (2013)

[74] Ma H, Seebacher NA, Hornicek FJ, Duan Z: *Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) is a novel prognostic marker and therapeutic target in osteosarcoma.* EBioMedicine 39: 182-193 (2019)

[75] Malumbres M, Barbacid M: *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer 9: 153-166 (2009)

[76] Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ: *Cyclin-dependent kinases: a family portrait.* Nat Cell Biol 11: 1275-1276 (2009)

[77] Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM: *Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer*. Ann Surg 244: 254-259 (2006)

[78] Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: *The protein kinase complement of the human genome.* Science 298: 1912-1934 (2002)

[79] Marshall NF, Price DH: *Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes.* Mol Cell Biol 12: 2078-2090 (1992)

[80] Marshall NF, Peng J, Xie Z, Price DH: *Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase.* J Biol Chem 271: 27176-27183 (1996)

[81] Mason JT, O'Leary TJ: *Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation*. J Histochem Cytochem 39: 225-229 (1991)

[82] Mita MM, Joy AA, Mita A, Sankhala K, Jou YM, Zhang D, Statkevich P, Zhu Y, Yao SL, Small K, Bannerji R, Shapiro CL: *Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer*. Clin Breast Cancer 14: 169-176 (2014)

[83] Moiola C, De Luca P, Gardner K, Vazquez E, De Siervi A: *Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth.* Cell Cycle 9: 3119-3126 (2010)

[84] Morgan JM, Navabi H, Schmid KW, Jasani B: *Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval*. J Pathol 174: 301-307 (1994)

[85] Morson B: *The polyp-cancer sequence in the large bowel.* Proc R Soc Med 67: 451-457 (1974)

[86] Nemunaitis JJ, Small KA, Kirschmeier P, Zhang D, Zhu Y, Jou YM, Statkevich P, Yao SL, Bannerji R: *A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies*. J Transl Med 11: 259 (2013)

[87] Neri E, Giusti P, Battolla L, Vagli P, Boraschi P, Lencioni R, Caramella D, Bartolozzi C: *Colorectal cancer: role of CT colonography in preoperative evaluation after incomplete colonoscopy*. Radiology 223: 615-619 (2002)

[88] Nonet M, Sweetser D, Young RA: *Functional redundancy and structural polymorphism in the large subunit of RNA polymerase II.* Cell 50: 909-915 (1987)

[89] Obrand DI, Gordon PH: *Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma*. Dis Colon Rectum 40: 15-24 (1997)

[90] Pang C, Huang G, Luo K, Dong Y, He F, Du G, Xiao M, Cai W: *miR-206 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells via targeting CDK9*. Cancer Med 6: 2398-2409 (2017)

[91] Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM: *Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor*. Mol Cancer Ther 9: 2344-2353 (2010)

[92] Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH: *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration.* Nature 402: 615-622 (1999)

[93] Patt YZ, Peters RE, Chuang VP, Wallace S, Claghorn L, Mavligit G: *Palliation of pelvic recurrence of colorectal cancer with intra-arterial 5-fluorouracil and mitomycin*. Cancer 56: 2175-2180 (1985)

[94] Peng J, Marshall NF, Price DH: *Identification of a cyclin subunit required for the function of Drosophila P-TEFb.* J Biol Chem 273: 13855-13860 (1998)

[95] Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH: *Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb.* Genes Dev 12: 755-762 (1998)

[96] Petrusz P: *Essential requirements for the validity of immunocytochemical staining procedures.* J Histochem Cytochem 31: 177-179 (1983)

[97] Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B: *Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods*. J Pathol 183: 116-123 (1997)

[98] Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guernec G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E: *Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).* J Natl Cancer Inst 98: 920-931 (2006)

[99] Quaia E, D'Onofrio M, Palumbo A, Rossi S, Bruni S, Cova M: *Comparison of contrast-enhanced ultrasonography versus baseline ultrasound and contrast-enhanced computed tomography in metastatic disease of the liver: diagnostic performance and confidence*. Eur Radiol 16: 1599-1609 (2006)

[100] Rafaelsen SR, Jakobsen A: *Contrast-enhanced ultrasound vs multidetector-computed tomography for detecting liver metastases in colorectal cancer: a prospective, blinded, patient-by-patient analysis*. Colorectal Dis 13: 420-425 (2011)

[101] Rahaman MH, Lam F, Zhong L, Teo T, Adams J, Yu M, Milne RW, Pepper C, Lokman NA, Ricciardelli C, Oehler MK, Wang S: *Targeting CDK9 for treatment of colorectal cancer*. Mol Oncol 13: 2178-2193 (2019)

[102] Ren S, Rollins BJ: *Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit*. Cell 117: 239-251 (2004)

[103] Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M: *Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle*. Nature 448: 811-815 (2007)

[104] Scalia CR, Boi G, Bolognesi MM, Riva L, Manzoni M, DeSmedt L, Bosisio FM, Ronchi S, Leone BE, Cattoretti G: *Antigen masking during fixation and embedding, dissected.* J Histochem Cytochem 65: 5-20 (2017)

[105] Schlafstein AJ, Withers AE, Rudra S, Danelia D, Switchenko JM, Mister D, Harari S, Zhang H, Daddacha W, Ehdaivand S, Li X, Torres MA, Yu DS: *CDK9 expression shows role as a potential prognostic biomarker in breast cancer patients who fail to achieve pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy.* Int J Breast Cancer: Article ID 6945129 (2018)

[106] Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE: *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27^{Kip1}*. Genes Dev 11: 1464-1478 (1997)

[107] Shen S, Dean DC, Yu Z, Hornicek F, Kan Q, Duan Z: *Aberrant CDK9 expression within chordoma tissues and the therapeutic potential of a selective CDK9 inhibitor LDC000067*. J Cancer 11: 132-141 (2020)

[108] Shi SR, Key ME, Kalra KL: *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections*. J Histochem Cytochem 39: 741-748 (1991)

[109] Shiekhattar R, Mermelstein F, Fisher RP, Drapkin R, Dynlacht B, Wessling HC, Morgan DO, Reinberg D: *Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH.* Nature 374: 283-287 (1995)

[110] Shim EY, Walker AK, Shi Y, Blackwell TK: *CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the C. elegans embryo.* Genes Dev 16: 2135-2146 (2002)

[111] Shore SM, Byers SA, Maury W, Price DH: *Identification of a novel isoform of Cdk9.* Gene 307: 175-182 (2003)

[112] Stephenson JJ, Nemunaitis J, Joy AA, Martin JC, Jou YM, Zhang D, Statkevich P, Yao SL, Zhu Y, Zhou H, Small K, Bannerji R, Edelman MJ: *Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer*. Lung Cancer 83: 219-223 (2014)

[113] Tong WG, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey RD, Badros AZ, Popplewell L, Coutre S, Fox JA, Mahadocon K, Chen T, Kegley P, Hoch U, Wierda WG: *Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma.* J Clin Oncol 28: 3015-3022 (2010)

[114] Tong Z, Chatterjee D, Deng D, Veeranki O, Mejia A, Ajani JA, Hofstetter W, Lin S, Guha S, Kopetz S, Krishnan S, Maru D: *Antitumor effects of cyclin dependent kinase 9 inhibition in esophageal adenocarcinoma.* Oncotarget 8: 28696-28710 (2017)

[115] Toriola AT, Kurl S, Laukanen JA, Mazengo C, Kauhanen J: *Alcohol consumption and risk of colorectal cancer: the Findrink study.* Eur J Epidemiol 23: 395-401 (2008)

[116] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: *Genetic alterations during colorectal-tumor development.* N Engl J Med 319: 525-532 (1988)

[117] Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Watanabe D, Handa H: *Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro.* EMBO J 17: 7395-7403 (1998)

[118] Wang J, Dean DC, Hornicek FJ, Shi H, Duan Z: *Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) is a novel prognostic marker and therapeutic target in ovarian cancer*. FASEB J 33: 5990-6000 (2019)

[119] Wang J, Liu J, Tian F, Zhan Y, Kong D: *Cyclin-dependent kinase 9 expression and its association with $CD8^+$ T cell infiltration in microsatellite-stable colorectal cancer*. Oncol Lett 18: 6046-6056 (2019)

[120] Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM: *Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis.* Br J Cancer 100: 611-616 (2009)

[121] Xie G, Tang H, Wu S, Chen J, Liu J, Liao C: *The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 induces apoptosis in breast cancer cells via depletion of Mcl-1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein and displays antitumor activity in vivo.* Int J Oncol 45: 804-812 (2014)

[122] Xu J, Xu S, Fang Y, Chen T, Xie X, Lu W: *Cyclin-dependent kinase 9 promotes cervical cancer development via AKT2/p53 pathway*. IUBMB Life 71: 347-356 (2019)

[123] Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H: *P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation.* Mol Cell 21: 227-237 (2006)

[124] Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, Hasegawa J, Handa H: *NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation.* Cell 97: 41-51 (1999)

[125] Ziegler A, Lange S, Bender R: *Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode.* Dtsch Med Wochenschr 132: e36-e38 (2007)

7 Anhang

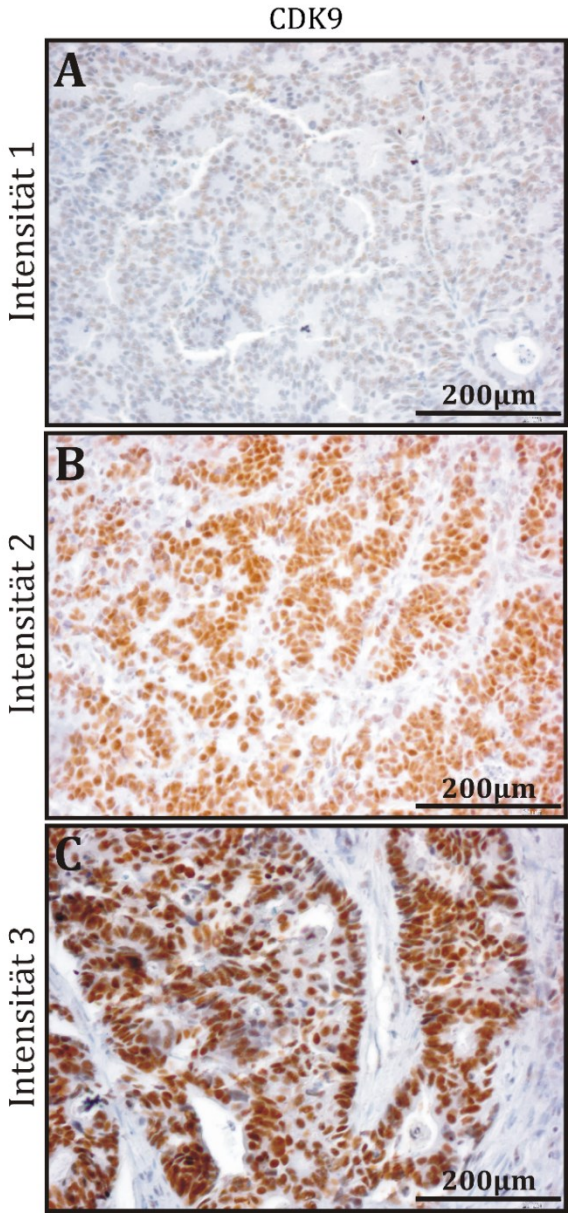

Abbildung 9: Standardbilder der CDK9-Färbungen von Kolontumorpatienten für die CDK9-Auswertung.

Bild A zeigt eine CDK9-Expression (Antikörper C12F7 der Firma Cell Signaling; Peroxidasereaktion Farbstoff DAB+) der Intensität 1 (also + in der Auswertung). Zusätzlich sind hier auch viele CDK9-negative Zellen (blau gefärbt) zu sehen, die mit der Intensität 0 bewertet werden. Bild B zeigt eine CDK9-Expression der Intensität 2 (also ++ in der Auswertung) und Bild C zeigt eine CDK9-Expression der Intensität 3 (also +++ in der Auswertung). CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9. DAB+ = 3,3` Diaminobenzidin.

Tabelle 6: Überblick über die generierten CDK9-Scores des Kolontumor- und Kolonnormalgewebes der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).

In der ersten Spalte ist der jeweilige Patient zu sehen. In Tabelle 7 können die entsprechenden klinischen Daten zu dem jeweiligen Patienten eingesehen werden. Die zweite Spalte zeigt bei den 20 Patienten, bei denen auch das Normalgewebe mit CDK9 gefärbt wurde, den entsprechend generierten CDK9-Score. Die dritte Spalte zeigt jeweils den CDK9-Score im Karzinomgewebe. CDK9 = Cyclin-dependent kinase 9.

Patient	CDK9-Score Normalgewebe	CDK9-Score Karzinomgewebe
1		3
2	129	6
3	232	143
4		151
5		166
6		184
7	204	186
8		205
9		212
10		217
11		228
12		315
13		317
14		324
15		338
16		342
17		347
18		347
19		349
20	103	350
21	71	350
22	244	354
23		356
24		360
25		360
26		369
27		371
28		374
29		385
30		390
31		394
32		395
33		395
34		397
35		401
36		412

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 6: Überblick über die generierten CDK9-Scores des Kolontumor- und Kolonnormal-gewebes der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	CDK9-Score Normalgewebe	CDK9-Score Karzinomgewebe
37	213	414
38		421
39		430
40		441
41		446
42		447
43		450
44		452
45		458
46		461
47		477
48		483
49	519	487
50	52	491
51		495
52		504
53		505
54		511
55		513
56		516
57		518
58	65	519
59		523
60		526
61		529
62		533
63		535
64		538
65		538
66		542
67		548
68	34	552
69		552
70		561
71		561
72		564
73		567
74		571
75	261	573
76		582

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 6: Überblick über die generierten CDK9-Scores des Kolontumor- und Kolonnormal-gewebes der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	CDK9-Score Normalgewebe	CDK9-Score Karzinomgewebe
77		586
78		586
79	111	590
80		591
81		593
82		595
83		604
84		605
85		610
86		614
87		618
88		618
89	150	623
90		625
91		628
92		629
93	22	631
94		633
95		634
96		638
97		642
98		644
99		647
100		648
101		651
102	219	651
103		651
104		656
105		660
106		664
107		677
108		693
109		708
110		709
111		711
112		712
113		723
114		724
115		725
116		728
117		731

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 6: Überblick über die generierten CDK9-Scores des Kolontumor- und Kolonnormal-gewebes der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	CDK9-Score Normalgewebe	CDK9-Score Karzinomgewebe
118		737
119		752
120		767
121		772
122		780
123		784
124		790
125	327	791
126		796
127		801
128		807
129		820
130		821
131		821
132		821
133		822
134		831
135		832
136		833
137		833
138		834
139		840
140		845
141		853
142		855
143		857
144		868
145		869
146		877
147		878
148		892
149		892
150		895
151		896
152		897
153		897
154		909
155		914
156		915
157		922
158		922

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 6: Überblick über die generierten CDK9-Scores des Kolontumor- und Kolonnormal-gewebes der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	CDK9-Score Normalgewebe	CDK9-Score Karzinomgewebe
159		937
160		941
161		941
162		942
163		943
164		948
165	81	950
166		951
167		976
168	71	982
169		997
170	72	1066
171		1070
172		1070
173		1080
174		1094
175		1138

Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).

Die erste Spalte zeigt den Patienten an. Die jeweiligen Ergebnisse der histologischen Auswertung sind in Tabelle 6 einzusehen. Die zweite Spalte zeigt das Geschlecht des jeweiligen Patienten an. „M" steht hierbei für männlich und „F" für weibliche Patienten. Die dritte Spalte gibt die Lokalisation 1 an. Hierbei handelt es sich um die genaue Tumorlokalisation. Die vierte Spalte zeigt die Lokalisation 2, also die Zuteilung zur Gruppe „links" oder „rechts" an. Die Grenze ist hierbei die linke Kolonflexur, ab derer die Tumoren in die Gruppe „links" eingeteilt werden. Spalte 5 zeigt das Grading, die Spalten 6 bis 8 zeigen das Staging (TNM-Klassifikation) der Tumoren. Spalte 9 gibt das jeweilige UICC-Stadium der Karzinome wieder. Spalte 10 gibt das Alter des jeweiligen Patienten zum Zeitpunkt der Primär-Operation an. Spalte 11 zeigt den Beobachtungszeitraum ab dem Zeitpunkt der Primär-Operation für die einzelnen Patienten in Monaten an. Spalte 12 zeigt, ob der entsprechende Patient noch am Leben (Zahl 0), oder verstorben ist (Zahl 1). Patienten, die sich der Nachbeobachtung entzogen haben, gelten hierbei weiter als lebend und die Beobachtungszeit endet am Zeitpunkt der letztmaligen Vorstellung. Stand der Datenerhebung ist der 21.04.2016. M = Metastasen (TNM-Klassifikation). N = regionäre Lymphknoten. OP = Operation. T = Primärtumor. UICC = Union internationale contre le cancer.

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
1	M	Zökum	rechts	3	4	2	1	4	74	10,20	1
2	M	rechte Flexur	rechts	3	2	0	0	1	64	21,61	1
3	F	Sigma	links	2	3	0	0	2	61	62,43	0
4	M	Zökum	rechts	2	3	1	0	3	70	14,47	1
5	M	Colon ascendens + Sigma	rechts + links	2	3	0	0	2	71	104,64	0
6	M	Sigma + Colon descendens	links	2	3	1	0	3	53	91,48	0
7	F	Zökum	rechts	3	2	0	0	1	73	89,38	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
8	M	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	84	50,46	1
9	M	Sigma	links	2	4	0	0	2	40	100,66	0
10	F	Übergang Colon descendens + Sigma	links	3	3	2	0	3	67	57,07	0
11	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	45	141,38	0
12	M	Sigma	links	2	3	0	0	2	60	60,03	0
13	M	Sigma	links	2	3	0	0	2	84	4,51	1
14	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	86	36,51	0
15	M	Colon ascendens	rechts	2	4	2	1	4	52	6,64	1
16	F	Colon transversum	rechts	3	3	0	0	2	72	60,26	1
17	M	Zökum	rechts	4	3	2	1	4	51	2,34	1
18	F	Zökum	rechts	3	4	2	1	4	89	0,63	1
19	F	Zökum	rechts	3	4	2	1	4	67	10,30	1
20	M	Colon ascendens	rechts	3	3	2	1	4	69	11,65	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
21	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	81	1,28	1
22	M	Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	71	16,94	1
23	F	Colon ascendens	rechts						75	38,75	0
24	F	Colon ascendens	rechts	3	4	2	1	4	65	27,96	1
25	M	Colon ascendens	rechts	2	4	2	1	4	80	10,30	1
26	M	rechte Flexur	rechts	3	3	1	0	3	81	63,22	0
27	M	Sigma	links	2	4	2	1	4	62	44,90	1
28	F	Colon transversum	rechts	3	3	2	0	3	69	25,95	1
29	M	Colon transversum	rechts	2	3	0	0	2	80	87,73	0
30	F	Sigma	links	2	3	2	1	4	61	15,63	1
31	F	Zökum	rechts	2	3	2	1	4	79	14,51	1
32	M	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	74	27,27	1
33	F	Sigma	links	2	3	0	1	4	58	20,79	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
34	F	Colon transversum	rechts	2	2	0	0	1	91	89,84	1
35	M	Sigma	links	2	4	2	1	4	66	20,40	1
36	M	Sigma	links	2	2	1	1	4	70	36,48	0
37	M	Zökum	rechts	2	4	1	0	3	35	126,91	0
38	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	61	32,50	0
39	M	rechte Flexur	rechts	3	4	0	0	2	43	67,27	0
40	M	rechte Flexur	rechts	3	4	2	0	3	92	0,39	1
41	F	Colon ascendens	rechts	4	3	1	1	4	58	3,22	1
42	M	Zökum	rechts	2	3	2	1	4	57	7,63	1
43	M	rechte Flexur	rechts	2	3	1	0	3	65	70,10	0
44	F	Colon ascendens	rechts	2	3	1	0	3	66	93,45	0
45	F	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	67	61,02	1
46	M	Colon descendens	links	3	4	0	0	2	75	109,67	0
47	F	Zökum	rechts	2	3	2	0	3	57	36,09	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
48	F	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	88	0,33	1
49	F	Colon ascendens	rechts	2	3	1	0	3	57	84,44	0
50	F	Sigma	links	2	4	0	0	2	86	85,23	0
51	M	Sigma	links	2	4	2	1	4	77	13,13	0
52	F	Zökum	rechts	2	3	2	0	3	65	110,46	0
53	M	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	78	76,28	0
54	F	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	64	1,12	1
55	M	Colon transversum	rechts		3	1	1	4	52	3,32	1
56	F	Zökum	rechts	3	3	0	0	2	68	38,49	0
57	M	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	76	6,45	1
58	F	Colon ascendens	rechts	3	3	2	0	3	42	51,05	0
59	M	Colon ascendens	rechts	2	3	2	1	4	37	10,69	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
60	M	Zökum	rechts	2	3	1	1	4	59	20,63	1
61	M	Sigma	links	1	3	0	0	2	73	10,49	1
62	F	Colon transversum	rechts	2	2	0	0	1	82	39,01	0
63	F	Zökum	rechts	2	3	2	1	4	83	0,89	1
64	F	Zökum	rechts	2	4	2	1	4	86	11,09	1
65	M	Sigma	links	2	3	0	0	2	80	48,03	1
66	F	Colon ascendens	rechts	1	2	0	0	1	74	3,91	0
67	F	Colon ascendens	rechts	3	2	1	0	3	79	53,98	0
68	F	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	73	118,72	0
69	M	Colon ascendens	rechts	2	3	2	0	3	67	29,01	0
70	M	Zökum	rechts	3	2	0	0	1	57	121,05	0
71	M	linke Flexur	links	2	4	0	1	4	72	6,81	1
72	F	Zökum	rechts	3	2	0	0	1	77	62,53	1
73	F	Colon transversum	rechts	2	2	0	0	1	74	1,15	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
74	M	linke Flexur	links	3	4	2	1	4	74	5,00	1
75	F	Sigma	links	2	4	0	0	2	40	48,32	0
76	F	Sigma	links	1	2	0	0	1	57	125,49	0
77	F	Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	56	87,11	0
78	F	Colon descendens	links	2	3	2	0	3	75	27,34	0
79	M	Colon ascendens	rechts	2	2	0	0	1	76	25,63	1
80	M	rechte Flexur	rechts	2	3	0	0	2	93	71,18	0
81	F	Zökum	rechts	4	4	1	0	3	81	54,11	0
82	F	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	79	66,15	0
83	F	Colon ascendens	rechts	3	3	2	0	3	82	61,45	0
84	F	Zökum	rechts	2	4	2	1	4	50	46,35	0
85	M	Sigma	links	3	4	2	1	4	61	0,66	1
86	M	Sigma	links	2	3	0	0	2	82	92,20	0
87	M	linke Flexur	links	2	4	0	0	2	49	130,10	0
88	F	linke Flexur	links	2	4	2	1	4	79	1,32	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
89	M	Zökum	rechts	2	3	1	0	3	58	32,17	0
90	M	Colon ascendens	rechts		3	1	1	4	64	27,20	1
91	F	linke Flexur	links	2	3	2	0	3	73	24,90	1
92	F	rechte Flexur	rechts	3	3	2	0	3	78	71,88	0
93	M	Zökum + Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	77	15,33	1
94	M	Sigma	links	2	4	2	1	4	82	9,14	1
95	F	Zökum	rechts	3	4	1	1	4	79	9,24	1
96	F	Colon transversum	rechts	2	3	1	0	3	84	81,38	0
97	F	Colon transversum	rechts	3	4	1	0	3	64	56,97	0
98	F	Zökum	rechts	2	4	0	1	4	77	14,14	0
99	F	Zökum + rechte Flexur	rechts	4	4	0	0	2	87	21,51	1
100	F	Zökum	rechts	2	3	1	0	3	80	11,15	0
101	M	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	85	0,53	1
102	F	Sigma	links	2	3	0	0	2	68	50,33	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
103	M	Sigma	links	2	3	2	1	4	54	15,76	1
104	F	rechte Flexur	rechts	3	3	1	0	3	88	67,76	0
105	F	Sigma	links	2	3	0	0	2	65	115,82	0
106	F	rechte Flexur	rechts	3	2	0	0	1	77	72,01	0
107	M	rechte Flexur	rechts	2	3	2	0	3	73	0,89	1
108	M	rechte Flexur	rechts	2	3	1	0	3	58	0,46	0
109	M	Sigma	links	2	4	1	1	4	42	19,44	1
110	M	rechte Flexur	rechts	2	3	2	1	4	70	17,27	1
111	M	Zökum	rechts	2	3	0	0	2	52	71,58	0
112	M	linke Flexur	links	2	4	2	1	4	57	3,22	1
113	F	Colon ascendens	rechts	3	3	2	1	4	59	6,09	1
114	M	Sigma	links	2	3	0	1	4	65	66,94	1
115	M	Sigma	links	2	3	0	0	2	68	104,01	0
116	M	Colon ascendens	rechts	2	2	0	0	1	29	104,70	0
117	M	rechte Flexur	rechts	2	3	0	0	2	71	22,70	0
118	F	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	68	60,63	0
119	F	Sigma	links	2	3	0	0	2	54	91,94	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
120	M	Zökum	rechts	2	3	1	1	4	77	6,58	1
121	F	Sigma	links	2	3	0	0	2	53	60,46	0
122	M	rechte Flexur	rechts	2	2	1	0	3	75	19,80	0
123	M	Sigma	links	2	4	2	1	4	67	41,81	1
124	M	Colon ascendens + Colon transversum	rechts	3	4	1	1	4	48	48,72	0
125	F	Sigma	links	2	4	1	0	3	65	95,86	0
126	F	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	67	114,31	0
127	M	Colon ascendens	rechts	3	3	3	1	4	29	101,05	0
128	F	rechte Flexur	rechts	2	2	0	0	1	63	23,68	0
129	F	Colon ascendens	rechts	2	3	1	1	4	72	38,65	1
130	M	Colon transversum	rechts	2	2	0	0	1	49	132,37	0
131	M	Colon descendens	links	2	4	2	1	4	65	41,64	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
132	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	61	59,90	0
133	M	Colon transversum	rechts	2	3	0	0	2	84	23,32	0
134	M	Zökum	rechts	1	3	0	0	2	70	24,61	0
135	F	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	89	30,46	0
136	F	Colon transversum	rechts	2	3	1	0	3	80	11,32	0
137	M	Sigma	links	2	3	2	0	3	45	35,36	0
138	F	Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	75	19,11	0
139	F	Sigma	links	2	3	1	0	3	71	24,57	0
140	F	Zökum	rechts	3	3	2	1	4	74	16,78	1
141	F	Zökum	rechts	3	3	0	0	2	79	38,65	0
142	M	Colon transversum	rechts	2	3	0	0	2	75	9,28	1
143	M	Colon transversum	rechts	2	3	2	1	4	64	1,25	1
144	M	Zökum	rechts	2	4	0	1	4	75	40,72	1
145	F	Zökum	rechts	3	2	0	0	1	88	0,30	1

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
146	F	Colon descendens	links	3	4	0	0	2	48	44,18	0
147	M	Colon ascendens	rechts	3	4	2	1	4	45	9,61	1
148	F	rechte Flexur	rechts	2	3	0	0	2	83	33,32	0
149	M	Colon ascendens	rechts	2	3	1	0	3	69	40,49	0
150	F	Zökum	rechts	2	3	1	0	3	64	39,01	1
151	F	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	75	11,22	0
152	F	Zökum + Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	61	78,06	0
153	M	Colon ascendens	rechts	3	3	1	0	3	58	60,92	1
154	M	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	90	50,20	1
155	F	Colon transversum	rechts	2	2	0	0	1	60	100,63	0
156	M	Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	32	47,40	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
157	M	Colon ascendens	rechts	2	3	0	0	2	77	34,90	1
158	M	Sigma	links	2	2	2	1	4	51	10,72	1
159	M	Sigma	links	2	2	1	0	3	74	9,64	1
160	F	rechte Flexur	rechts	3	4	1	0	3	48	26,45	0
161	M	Colon transversum	rechts	2	4	0	0	2	46	35,16	1
162	F	Colon ascendens	rechts	3	3	1	1	4	55	8,95	1
163	F	Sigma	links	3	4	2	1	4	60	4,74	0
164	M	Sigma	links	2	2	0	0	1	88	10,82	1
165	M	Colon transversum	rechts	3	3	0	0	2	78	32,99	0
166	F	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	52	19,77	0
167	M	Sigma	links	3	3	1	1	4	54	32,80	0
168	M	Zökum	rechts	2	2	0	0	1	81	43,85	1
169	M	Colon transversum	rechts	2	3	0	0	2	60	0,86	1
170	F	Sigma	links	2	2	0	0	1	51	45,13	0

Fortsetzung

Fortsetzung ***Tabelle 7: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten mit Kolonkarzinom aus der Studienpopulation (Universitätsklinikum Ulm: 2003-2014).***

Patient	Geschlecht (M=männlich; F=weiblich)	Lokalisation 1	Lokalisation 2 (in Gruppen rechts und links)	Grading	T	N	M	UICC	Alter bei Primär-OP	Beobachtungszeit (in Monaten); Stand: 21.04.2016	Verstorben 0 = Falsch, 1 = Wahr; Stand: 21.04.2016
171	M	Colon ascendens	rechts	1	3	0	0	2	67	34,64	0
172	F	Zökum	rechts	2	3	1	1	4	70	34,31	0
173	F	Sigma	links	2	2	0	0	1	67	18,13	0
174	M	Sigma	links	2	4	1	0	3	75	71,51	0
175	F	Colon ascendens	rechts	3	3	0	0	2	80	26,97	0

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.