

# Standortbestimmung in der Pathologie des Kolorektalkarzinoms

*Histopathologische, immunhistochemische und molekulare Aspekte*

Beim kolorektalen Karzinom wurden in den letzten Jahren insbesondere auf dem Gebiet der Molekularpathologie grosse Fortschritte erzielt. Heute werden einerseits molekulare Parameter in potenziell neue pathogenetische Klassifikationen integriert, andererseits halten molekulare Biomarker immer mehr Einzug in die Liste der prognostischen und prädiktiven Biomarker.

ALESSANDRO LUGLI



Alessandro Lugli

Im Jahr 2010 wurden beim kolorektalen Karzinom (KRK) weltweit 1,23 Millionen neue Fälle für 2008 registriert, was 9,7% aller Karzinomneuerkrankungen entspricht (1). Beim Mann ist das KRK (nach Karzinomen der Lunge, Prostata und des Magens) das vierthäufigste Karzinom, während bei der Frau das KRK an dritter Stelle liegt (nach Karzinomen der Mamma und der Zervix) (1). Die Forschung hat in den letzten Jahren beim KRK hinsichtlich Klassifikation, Prognose und Prädiktion grosse Fortschritte erzielt, welche für eine Optimierung des prä- und postoperativen Patientenmanagements ausserordentlich wichtig sind. Diesbezüglich leistet die heutige Pathologie im Rahmen einer multidisziplinären «Taskforce» einen wichtigen Beitrag, basierend auf professioneller Handhabung des Gewebes und unterstützt durch moderne Technologie. Das Hauptziel dieser Übersichtsarbeit besteht darin, potenziell neue histologische, immunhistochemische und molekulare Aspekte beim KRK zu durchleuchten, die in der täglichen Diagnostik zur Anwendung kommen, sowie einen zusätzlichen, kurzen Ausblick in eine mögliche Zukunft zu geben.

## ABSTRACT

### Molecular pathology of colorectal cancer

The molecular pathology of colorectal cancer made an important progress in the last years. Indeed, molecular factors are slowly included in new potential pathogenetic classifications of colorectal cancer. Additionally, the potential prognostic and predictive value of molecular markers are recognized. The aim of the present article is an overview on diagnostics, pathogenesis, prognosis and prediction in colorectal cancer.

**Keywords:** molecular markers, prognosis and prediction in colorectal cancer.

## Histopathologische und immunhistochemische Aspekte

### TNM-Klassifikation

Die 7. Auflage der TNM-Klassifikation der Union internationale contre le cancer (UICC) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) stellt zum gegenwärtigen Zeitpunkt den Goldstandard für die tägliche Diagnostik dar (2, 3). Das Tumorstadium wird durch die histologische Bestimmung der Tumordinfiltrationstiefe in der Kolonwand beziehungsweise darüber festgelegt. Die Bestimmung des Nodalstadiums (N) basiert auf der Anzahl der Metastasen in den resezierten und untersuchten Lymphknoten. Obwohl gemäss der Klassifikation mindestens 6, jedoch optimal 12 Lymphknoten untersucht werden sollten, gibt es in den letzten Jahren mehrere Publikationen, die postulieren, dass auch die Anzahl der resezierten beziehungsweise untersuchten Lymphknoten eine prognostische Rolle spielt (4). Unabhängig davon gilt in vielen Instituten für Pathologie die Regel, dass alle perikolischen Lymphknoten untersucht werden müssen, um ein optimales postoperatives Management zu garantieren (5).

In der letzten Auflage der TNM-Klassifikation wurden die sogenannten «Satellitenknötchen» («tumor deposits») als zusätzlicher Faktor eingeführt. Die Satellitenknötchen sind Tumoraggregate, die von der Tumormasse deutlich abgetrennt und meistens im perikolischen Fettgewebe zu detektieren sind. Nicht selten ist histologisch schwierig zu unterscheiden, ob es sich um Lymphknotenmetastasen oder Gefässinfiltrationen handelt, da die Kontur dieser Knötchen häufig unregelmässig erscheint (Abbildung 1A). Solche Knötchen werden in der neuen TNM-Klassifikation als pN1c klassifiziert, wodurch Tumore, die zwar als pN0-Stadium klassifiziert wurden, in eine höhere Kategorie aufgenommen werden.

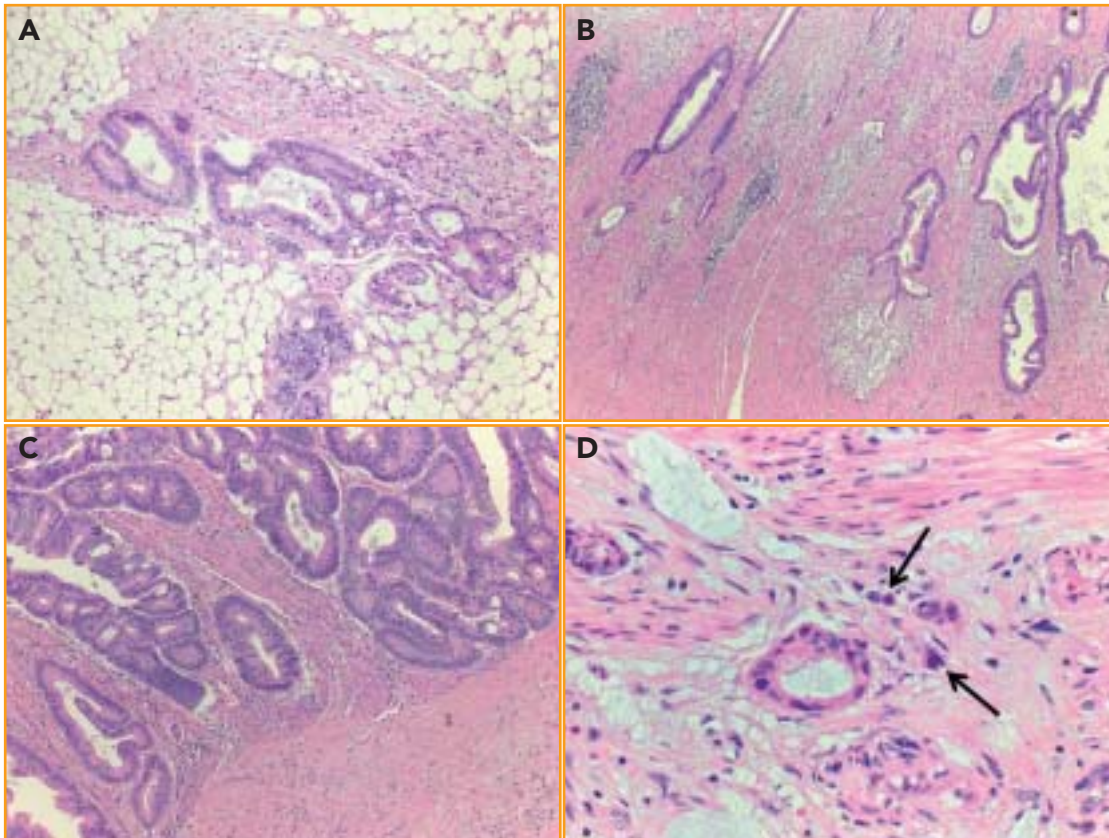


Abbildung: Hämatoxylin- und Eosinfärbungen von kolorektalen Karzinomen:

- A: Satellitenknötchen im perikolischen Fettgewebe mit unregelmässiger Konfiguration und ohne erkennbare Lymphknotenstruktur (10-fache Vergrösserung)
- B: Infiltratives Wachstumsmuster (5-fache Vergrösserung)
- C: Expansives Wachstumsmuster (10-fache Vergrösserung)
- D: Einzelne «tumor buds» (Pfeil) in Nachbarschaft einer Karzinomdrüse an der Tumorinvasionsfront (40-fache Vergrösserung)

Während das T- und N-Stadium am Resektat bestimmt werden können, basiert das M-Stadium häufig auf den bildgebenden Verfahren mit allfälliger biptischer Diagnosesicherung.

Die TNM-Klassifikation erlaubt somit eine praktische, histomorphologisch basierte Stadieneinteilung. Alle KRK-Fälle ohne Lymphknotenmetastasen werden je nach T-Stadium als Stadium I oder II bezeichnet, während KRK-Fälle mit Lymphknotenmetastasen dem Stadium III und diejenigen mit Fernmetastasen dem Stadium IV zugeordnet werden. Normalerweise erhalten Patienten im Stadium III eine adjuvante Therapie im Gegensatz zu Stadium-II-Patienten. Eine gewisse Problematik liegt darin, dass in gewissen Fällen Stadium-II-Patienten eine schlechtere Überlebensrate als Stadium-III-Patienten zeigen. Folglich ist die aktuelle Forschung des KRK unter anderem auch darauf fokussiert, neue Biomarker zu entdecken, welche eine bessere prognostische Einteilung der KRK-Patienten, insbesondere in therapeutisch relevanten Situationen, erlauben.

#### L- und V- Stadien

Eine intramurale und/oder extramurale lymphatische

(L) oder vaskuläre (V) Tumorinfiltration sollte bei jeder Biopsie und jedem Resektat eines KRK beschrieben werden, da gemäss Literatur beide Parameter den unabhängigen prognostischen Faktoren zuzuordnen sind (6). Speziell bei Karzinomen, welche in vollständig entfernten Adenomen detektiert werden, können das L- und V- Stadium für das weitere Prozedere entscheidend sein. Deswegen sollten in schwierigen Fällen Spezialfärbungen (z.B. Elastica Van Gieson) oder immunhistochemische Nachuntersuchungen (z.B. D2-40 und CD34) zur besseren Visualisierung der Blut- und Lymphgefässe zur Anwendung kommen.

#### Histologische Subtypen

Die histologische Subtypisierung spielt beim KRK viel mehr eine pathogenetische als eine prognostische oder prädiktive Rolle. Gemäss der WHO-Klassifikation 2010 unterscheidet man folgende histologische Subtypen: kribriform, medullär, mikropapillär, muzinös, serratiert und siegelringzellig (1). Bei dieser Unterteilung ist speziell der muzinöse Subtyp, der durch eine > 50%ige Schleimbildung definiert wird, hervorzuheben. Falls muzinöse KRK mit einer Mikrosatellitenstabilität einhergehen, werden sie als «high

grade», bei Mikrosatelliteninstabilität als «low grade» bezeichnet, auch wenn in beiden Fällen der Tumorgrad mit G3 angegeben wird (1).

### Tumorgrad

Der Tumorgrad wird am histologischen Schnitt unter Berücksichtigung der Prozentzahl der Drüsenformation angegeben, was zu einer Unterteilung in gut (> 95% Drüsen), mässig (50–95% Drüsen) und schlecht differenzierte Karzinome (0–49% Drüsen) führt. Da die Reproduzierbarkeit dieses Auswertungssystems limitiert ist, wurde in den letzten Jahren vorgeschlagen, gut und mässig differenzierte Karzinome als «low grade» und schlecht differenzierte als «high grade» zu bezeichnen.

### Perineuralscheideninfiltration

Im Gegensatz zum Prostatakarzinom hat die Perineuralscheideninfiltration erst in den letzten Jahren beim KRK an Bedeutung gewonnen. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass sich die Perineuralscheideninfiltration als unabhängiger prognostischer Faktor herauskristallisiert (7).

### Wachstumsmuster und «tumor budding»

Hinsichtlich Wachstumsmuster unterscheidet man eine expansive («pushing margin») (Abbildung 1B) von einer infiltrativen («infiltrating margin») Konfiguration (Abbildung 1C) an der Tumordinvasionsfront. Ein expansives Wachstumsmuster ist häufig mit einer Mikrosatelliteninstabilität assoziiert, kommt gelegentlich aber auch bei mikrosatellitenstabilen KRK vor. In beiden Fällen korreliert eine expansive Konfiguration im Gegensatz zum infiltrativen Wachstumsmuster mit einer besseren Überlebensrate (8).

Der Faktor «tumor budding» ist definiert als Tumoreinzelle oder als Tumoraggregat mit bis zu fünf Zellen an der Invasionsfront (Abbildung 1D) und ist von Wachstumsmuster, Tumorgrad und Satellitenknötchen klar zu unterscheiden. «Tumor budding» ist in vielen Studien mit einer höheren Infiltrationstiefe, mit lokoregionären und Fernmetastasen, mit lymphatischer und vaskulärer Tumordinfiltration sowie unabhängig davon mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert. Die pathogenetische und prognostische Bedeutung wird dadurch untermauert, dass trotz Fehlens eines standardisierten Auswertungssystems zahlreiche Studien unter Nutzung unterschiedlicher Systeme zu den gleichen Ergebnissen kommen. Aufgrund der Assoziation mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und des möglichen Stammzellcharakters wird «tumor budding» in der Literatur als vielversprechender pathogenetischer und prognostischer Faktor angesehen (9).

### Zirkumferenzieller Resektionsrand

Der zirkumferenzielle Resektionsrand (ZRR) wird als

chirurgisch entfernte, nicht peritonealisierte Oberfläche des KRK-Resektates definiert. Bei der totalen, mesorektalen Exzision (TME), insbesondere beim Rektumkarzinom, spielt der ZRR für die Prädiktion eines Lokalrezidivs, für Fernmetastasen und für die Prognose eine wichtige Rolle (10). Dementsprechend wird gemäss den Richtlinien der Schweizerischen Gesellschaft für Pathologie (SGPath) eine spezielle Aufarbeitung des TME-Präparates empfohlen (5).

### Regressionsgrad nach neoadjuvanter Therapie

Bei den präoperativ behandelten Rektumkarzinomen liefert die Beurteilung des Regressionsgrades am Operationspräparat ein objektives Mass für das Ansprechen des Tumors auf die Therapie. In der Literatur werden unterschiedliche Regressionsgrade vorgeschlagen, wobei diejenigen von Dworak und Mandard am häufigsten angewendet werden (11). Beim Regressionsgrad werden die vitalen Tumoran-teile und der Fibrosegrad beurteilt.

### Immunhistochemische Aspekte

Die Immunhistochemie (IHC) ist heute eine etablierte und wichtige Visualisierungsmethode (bezüglich Proteinebene, Immunphänotyp) in der klinischen Pathologie. Beim KRK kommt die IHC insbesondere in drei Situationen zur Anwendung:

▲ *Diagnosesicherung bei unklarem morphologischem Bild in der Biopsie und bei Metastasen mit unklarem Primärtumor:* Das typische und am häufigsten angewandte immunhistochemische Profil umfasst die Marker CK20, CK7 und CDX2. Die neoplastische Zellpopulation ist beim KRK positiv für CDX2 und CK20, jedoch negativ für CK7. Mikrosatelliten-instabile KRK können jedoch für CDX2 und CK20 negativ sein, was in gewissen Fällen in der Unterscheidung zu einer Ovarialkarzinometastase zu Schwierigkeiten führen kann (12).

▲ *Bestimmung des Mikrosatellitenstatus:* Mittels der Marker MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 kann immunhistochemisch der Mikrosatellitenstatus bestimmt werden. Der Ausfall der nukleären Reaktivität einer dieser vier Marker weist auf eine Mikrosatelliteninstabilität hin (MSI-H), wobei die Negativität für MLH1 und PMS2 (Mechanismus der Methylierung) eher für ein sporadisches MSI-H KRK und eine Negativität für MSH2 und/oder MSH6 (Mechanismus der Mutation) eher für ein hereditäres MSI-H KRK (HNPCC) spricht. Interessanterweise zeigen alle Mikrosatelliten-instabilen KRK eine ähnliche Morphologie, die durch folgende histopathologische Alterationen gekennzeichnet ist: expansives Wachstumsmuster, fokale Schleimbildung, Nachweis zahlreicher intratumoraler T-Lymphozyten, medullärer histologischer Subtyp und eine peritumorale, «Crohn-ähnliche» Entzündung, sodass die Indikation zur Abklärung

bezüglich des Mikrosatellitenstatus bereits histopathologisch erfolgen kann (13).

- ▲ **Detektion immunologischer Faktoren:** Ein mögliches Zukunftsszenario, bei welchem die IHC beim KRK zu einer weiteren Anwendung kommen könnte, ist die Bestimmung des «Immunscores». In den letzten 5 bis 10 Jahren hat das Modell der EMT und somit die Tumormikroumgebung (tumor microenvironment) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Speziell die Darstellung der begleitenden T-Zell-Population mittels CD3 (Marker für die gesamte T-Zell-Population), CD8 (Marker für die zytotoxischen T-Zellen) und CD45RO (Marker für die T-Helferzellen) als etablierter immunhistochemischer Marker in der täglichen Routine zeigt eine immunologische Begleitreaktion, die in zahlreichen Publikationen als unabhängiger prognostischer Faktor vorgeschlagen wurde (14). Die Bestimmung dieser Reaktion kann mit einem Immunscore zusammengefasst und nachgewiesen werden (15).

### Molekularpathologische Aspekte

#### Pathogenese und Transduktionswege

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es keine einheitliche standardisierte molekulare Klassifikation des KRK. Trotzdem gibt es wichtige pathogenetische Aspekte, welche eine solide Basis für eine zukünftige molekulare Klassifikation legen.

Im bis jetzt klassischen Modell gibt es zwei pathogenetische KRK-Gruppen, welche auf folgenden Mechanismen beruhen:

- ▲ **Chromosomale Instabilität:** 85% aller KRK basieren auf der Adenom-Karzinom-Sequenz, welche durch konsekutive Mutationsschritte definiert wird. Auf die Mutation des APC-Gens folgen die Mutationen des KRAS und des TP53-Gens und schliesslich die Deletion von Chromosom 18q (16). In dieser Gruppe ist die autosomal dominant vererbte Erkrankung der familiären, adenomatösen Polyposis (FAP) zu unterscheiden, welche zirka 1% aller KRK-Fälle ausmacht und durch Hunderte bis Tausende von Kolonadenomen charakterisiert ist.
- ▲ **Mikrosatelliteninstabilität:** Bei 15% aller KRK liegt ein Ausfall eines Reparaturgens vor, wobei spontane somatische Mutationen nicht mehr behoben werden und es somit zu einer genomischen Instabilität kommt. 12% dieser Fälle sind sporadischer und 3% hereditärer Natur (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer, HNPCC). Die Unterscheidung zwischen sporadisch und hereditär ist nur mittels PCR und unter Berücksichtigung der klinischen Angaben (Amsterdam- bzw. revidierte Bethesda-Kriterien) möglich. Der Mikrosatellitenstatus «MSI low» ist eine rein molekulargenetische PCR-Diagnose und sollte nicht mit Immunhistochemie diagnostiziert werden.

Im Jahr 2007 hat Jeremy Jass ein Modell vorgeschlagen, welches auf klinischen, morphologischen und molekularen Charakteristika beruht und 5 Gruppen umfasst (17):

- ▲ **Gruppe 1 (12% aller KRK):** chromosomal stabil, MLH1-Methylation, MSI-H, BRAF-Mutation, «CpG Island Methylator Phenotype high» (CIMP-high). Diese Gruppe reflektiert die sporadische Mikrosatelliten-Instabile KRK, deren Vorläuferläsionen häufig serratierte Adenome sind.
- ▲ **Gruppe 2 (8% aller KRK):** chromosomal stabil, nur partielle MLH1-Methylation, Mikrosatelliten-stabil (MSS/MSI-L), BRAF-Mutation, CIMP-high. Im klassischen Modell werden diese KRK nicht als eigenständige Gruppe aufgeführt.
- ▲ **Gruppe 3 (20% aller KRK):** chromosomal instabil, MGMT-Methylation, MSS/MSI-L, KRAS-Mutation, CIMP-low. Diese KRK können pathogenetisch in keine der beiden Gruppen im klassischen Modell zugeordnet werden und entstehen sowohl aus klassischen Adenomen (tubulär, tubulovillös und villös) als auch aus serratierten Polypen (sessiles serratiertes Adenom und traditionelles serratiertes Adenom). Deswegen wird dieser Mechanismus in der Literatur auch «alternativer Transduktionsweg» genannt.
- ▲ **Gruppe 4 (57% aller KRK):** chromosomal instabil, MSS/MSI-L, CIMP-negativ. Diese KRK werden im klassischen Modell in der Gruppe «chromosomale Instabilität» eingeteilt.
- ▲ **Gruppe 5 (3% aller KRK):** chromosomal stabil, MSI-H, CIMP-negativ, BRAF-Wildtyp. Diese Gruppe entspricht den hereditären Mikrosatelliten-Instabilen KRK.

2010 haben Barbara Leggett und Vicki Whitehall eine Übersicht über die Pathogenese des KRK veröffentlicht, die sich überwiegend auf die sporadischen Karzinome bezieht und drei Transduktionswege vorschlägt (18):

- ▲ Serratiertes Transduktionsweg:
  - MSI-H, CIMP-high, BRAF-mutiert (entspricht Jass-Gruppe 1)
  - MSS, CIMP-high, BRAF-mutiert (entspricht Jass-Gruppe 2).
- ▲ Alternativer Transduktionsweg:
  - MSS, CIMP-low, KRAS-mutiert (entspricht Jass-Gruppe 3)
- ▲ Traditioneller Transduktionsweg:
  - MSS, CIMP-negativ, BRAF-Wildtyp, KRAS-Wildtyp (entspricht Jass-Gruppe 4).

2012 publizierte das Cancer Genome Atlas Network in der Zeitschrift «Nature» eine interessante Arbeit, in welcher die KRK in drei Gruppen eingeteilt werden, die auf bekannten Transduktionswegen beruhen (19):

- ▲ **Gruppe 1:** WNT- und TGF-Beta-Transduktionsweg (Funktion: Proliferation, Stamm/Progenitor-Phänotyp)

- ▲ Gruppe 2: PIK3CA- und RTK-RAS-Transduktionsweg (Funktion: Proliferation, Zellüberleben, Translation)
- ▲ Gruppe 3: P53-Transduktionsweg (Funktion: Proliferation, Zellüberleben).

Diese Studie bietet interessante Aspekte für mögliche therapeutische Ansätze wie zum Beispiel für WNT-Transduktionsweg-Inhibitoren oder für die Proteine des PIK3CA- und RTK-RAS-Transduktionswegs (IGF2, IGFR, ERBB2, ERBB3, MEK, AKT, MTOR).

Erst kürzlich hat eine Forschergruppe aus Oxford basierend auf 906 KRK im Stadium II und III eine neue molekulare Einteilung der KRK vorgeschlagen, welche 7 Gruppen umfasst (20):

- ▲ Gruppe 1: MSI-H- und/oder BRAF-mutiert
- ▲ Gruppe 2: Chromosomal instabil und/oder TP53-mutiert mit KRAS- und PIK3CA-Wildtyp
- ▲ Gruppe 3: KRAS- und/oder PIK3CA-mutiert, chromosomal instabil, TP53-Wildtyp
- ▲ Gruppe 4: KRAS- und/oder PIK3CA-mutiert, chromosomal stabil, TP53-Wildtyp
- ▲ Gruppe 5: NRAS-mutiert
- ▲ Gruppe 6: keine Mutationen
- ▲ Gruppe 7: andere.

In dieser Studie wurde auch der prognostische Wert dieser Einteilung untersucht, wobei sich insbesondere die Gruppen 1 und 3 als unabhängige Faktoren für die Überlebensrate der Patienten manifestierten.

### Zusammenfassung

Man muss zur Kenntnis nehmen, dass es verschiedene, vor allem «pathogenetische» molekulare Klassifikationen gibt mit nur partiell prognostischem und prädiktivem Wert. Die oben aufgeführten Klassifikationen stellen eine Auswahl aus der Literatur dar und sind in *Tabelle 1* vereinfacht aufgeführt.

### Klinische Anwendung

Durch den Fortschritt in der molekularbiologischen Forschung des KRK und der molekularpathologischen Technologie nimmt die Molekularpathologie durch die Bestimmung molekularer Biomarker in der Diagnostik des KRK einen wichtigen Platz ein. An dieser Stelle sind insbesondere der Mikrosatellitenstatus und die Moleküle des RAS-Transduktionsweges zu erwähnen.

### Mikrosatellitenstatus (MS):

Zur Diagnose von sporadischen MSI-H- sowie von HNPCC-Fällen ist die Bestimmung des MS unerlässlich. Gemäss den revidierten Bethesda-Richtlinien aus dem Jahre 2004 ist die MS-Testung in folgenden Situationen indiziert (21):

- 1) KRK-Diagnose bei einem Patienten, der < 50 Jahre alt ist
- 2) Vorhandensein von synchronen/metachronen KRK oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren, unabhängig vom Alter

- 3) KRK mit MSI-H-typischer Histologie bei einem Patienten > 60 Jahre
- 4) ein oder mehrere Verwandte ersten Grades mit einem KRK und einem HNPCC-assoziierten Tumor, einer der Tumore im Alter < 50 Jahre diagnostiziert
- 5) Verwandte ersten oder zweiten Grades mit KRK und einem HNPCC-assoziierten Tumor, unabhängig vom Alter.

Bei klinischem und/oder histopathologischem Verdacht auf ein MSI-H-KRK kann als erster Schritt eine immunhistochemische Untersuchung (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) durchgeführt werden. Bei Positivität aller vier Marker ist das Vorliegen eines MSI-H-KRK eher unwahrscheinlich. Wenn MLH1 und PMS2 negativ sind, kann eine BRAF-Mutations- und eine MLH1-Methylierungsanalyse durchgeführt und bei positivem Ergebnis beider Untersuchungen ein sporadisches MSI-H-KRK diagnostiziert werden. Bei negativem Ergebnis hingegen oder bei einer MSH2- und/oder MSH6-Negativität in der Immunhistochemie ist eine humangenetische Beratung und Diagnostik zur Abklärung eines möglicherweise vorliegenden HNPCC-Syndroms (Synonym: Lynch-Syndrom) angezeigt.

Der MS hat nicht nur diagnostische Bedeutung, sondern scheint auch eine prognostische und eine prädiktive Bedeutung zu haben. In der Literatur wird in vielen Studien gezeigt, dass MSI-H-KRK eine deutlich bessere Prognose als MSS-KRK aufweisen (22). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Patienten mit einem MSI-H-KRK von einer adjuvanten Therapie mit 5-FU eher nicht profitieren (23).

In der Klinik relevant sind zurzeit:

- ▲ **RAS-Transduktionsweg:** Die Anwendung einer Anti-EGFR-Therapie vor allem bei Patienten mit Stadium-IV-KRK hat in den letzten Jahren den Fokus auf mehrere Moleküle des RAS-Transduktionsweges verstärkt. Beim KRK sind insbesondere KRAS, BRAF, PTEN und PIK3CA zu nennen.
- ▲ **KRAS-Status:** Die Mutationsfrequenz beim KRK liegt bei zirka 40%, wobei häufiger Codon 12/13, weniger die Codons 61, 117 und 146 betroffen sind. In der Molekularpathologie wird zur Bestimmung einer allfälligen KRAS-Mutation die PCR-Methode (vor allem Sanger-Sequenzierung oder Pyrosequenzierung) angewandt. Patienten mit einem KRAS-Wildtyp-Status sprechen eher auf eine Therapie mit einem Anti-EGFR-Medikament an als solche mit einer nachgewiesenen Mutation (24). Die Ursache jedoch, weshalb gewisse Patienten mit einer KRAS-Mutation dennoch ansprechen und solche mit einem KRAS-Wildtyp-Status nicht, ist zurzeit unklar. Mögliche Hypothesen sind die KRAS-Heterogenität im Primärtumor selbst oder zwischen Primärtumor, Lokal- und Fernmetastasen (25, 26). Gewisse KRK-Fälle mit spezifischen KRAS-Mutationen wie zum Beispiel

Tabelle 1:

**Auswahl von möglichen molekularen Klassifikationen beim kolorektalen Karzinom**

Charakteristika	Klassisches Modell	Jass-Modell	Leggett-Whitehall-Modell	Cancer-Genome-Atlas-Network-Modell	Oxford-Modell
Publikationsjahr	1990	2007	2010	2012	2012
Anzahl KRK-Gruppen	2	5	4	3	7
Molekulare Parameter	APC, KRAS, p53, CSS, MSS	CSS, MSS, KRAS, BRAF, CIMP, MGMT	CSS, MSS, KRAS, BRAF, CIMP	WNT, RAS-MAPK, PIK3CA, TGF-Beta, P53 und DNA Mikrosatelliten-Transduktionsweg	CSS, MSS, KRAS, BRAF, NRAS, PIK3CA, TP53
Prognostischer Wert	+	(-)	(-)	(-)	(+)
Prädiktiver Wert	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
Anwendung im klinischen Alltag	+	-	-	(+)	-

CSS: Chromosomaler Stabilitätsstatus  
 MSS: Mikrosatellitenstatus  
 +: Ja; -: Nein; (+): partiell; (-): unklar

KRAS G13D scheinen eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Ansprechen zu haben (27). Kürzlich wurde dazu in einigen Studien postuliert, dass erworbene KRAS-Mutationen und somit eine Anti-EGFR-Therapie-Resistenz die Ursachen sein könnten (28, 29). Hinsichtlich des prognostischen Wertes von KRAS sind die Resultate in der Literatur eher widersprüchlich, sodass KRAS vielmehr prädiktiv als prognostisch zu sein scheint (24).

- ▲ **BRAF-Status:** Die Frequenz der V600E-Mutation des BRAF-Gens beim KRK beträgt zirka 10% und wird ebenfalls mittels PCR detektiert. Im Gegensatz zur KRAS- scheint die BRAF-Mutation mit einer schlechteren Prognose einherzugehen. Der prädiktive Wert im Rahmen einer Anti-EGFR-Therapie ist möglich und wurde in mehreren Studien untersucht, wobei die Evidenz im Vergleich zum KRAS-Status geringer zu sein scheint. Eine weitere therapeutische Anwendungsmöglichkeit wäre jedoch die Applikation von BRAF-Inhibitoren (24).
- ▲ **PIK3CA und PTEN:** Im RAS-Transduktionsweg ist PTEN der Inhibitor des Signales PIK3CA zu AKT, sodass dessen Verlust eine Aktivierung der Signalweges auslöst. Der PTEN-Verlust kommt in 30% aller KRK vor und wird immunhistochemisch untersucht, die PIK3CA-Mutations-Frequenz liegt bei zirka 20% und wird mittels PCR analysiert. Beide molekularen Alterationen werden ebenfalls als potenzielle Prädiktoren der Anti-EGFR-Therapie in Betracht gezogen. Prognostisch scheint jedoch nur PIK3CA eine potenzielle Rolle zu spielen (24).
- ▲ **CpG-Island-Methylation-Phänotypen (CIMP):** Zirka die Hälfte aller Protein-kodierenden Gene enthalten CG-reiche Regionen in den Promoto-

ren, welche «CpG-Inseln» genannt werden. Aberante DNA-Methylierung führt zu einer Funktionsstörung der Tumorsuppressorgene. Seit 1988 besteht die Vermutung, dass der CIMP-Status eine wichtige Rolle in der Pathogenese des KRK spielt. Unterdessen wird CIMP in den vorgeschlagenen molekularen Klassifikationen integriert, wobei dessen prognostischer und prädiktiver Wert zum aktuellen Zeitpunkt unklar ist. Eine Ursache dürfte die noch fehlende Standardisierung der Methodik sein, um den Status CIMP-low und CIMP-high genau zu definieren (30).

**Prognostische und prädiktive Faktoren**

Obwohl die pathologische TNM-Klassifikation als Goldstandard für das postoperative Management der KRK-Patienten angesehen werden kann, ist die daraus resultierende prognostische Einteilung in die Stadien I bis IV teilweise suboptimal, da in gewissen Fällen bei Patienten mit tieferen Stadien eine schlechtere Überlebenszeit als bei Patienten mit höheren Stadien beobachtet werden kann. Folglich sind weitere prognostische Biomarker notwendig, welche eine bessere prognostische Unterteilung ermöglichen. Obwohl viele Studien neue potenzielle Biomarker untersuchen, werden relativ wenige davon im klinischen Alltag eingesetzt. Ursachen dafür können die fehlende Reproduzierbarkeit, Standardisierung und Validierung sein. Die im Jahre 2005 veröffentlichten REMARK-Richtlinien sind eine sehr gute Stütze, Biomarker so zu erforschen, dass ein zukünftiger Einsatz in der täglichen Diagnostik wahrscheinlicher ist (31). Die CAP (College of American Pathologists) hat im Jahr 1999 eine Evidenzskala für prognos-

tische Biomarker beim KRK vorgeschlagen, welche 2012 aktualisiert wurde (32). Die Skala umfasst folgende Einteilung:

- ▲ *Kategorie I: Definitiver prognostischer Faktor, der auf zahlreichen Studien beruht und im klinischen Alltag etabliert ist.*
  - TNM-Stadium
  - L- und V-Stadium
  - Residualtumor (R-Status)
  - Serum-CEA.
- ▲ *Kategorie IIA: Vielversprechender prognostischer Faktor, der auf zahlreichen Studien beruht und im Pathologiebericht erwähnt werden sollte. Die Etablierung im klinischen Alltag ist noch nicht erfolgt.*
  - Tumorgrad
  - zirkumferenzieller Resektionsrand
  - Tumorregressionsgrad nach neoadjuvanter Therapie.
- ▲ *Kategorie IIB: Vielversprechende Daten, jedoch noch ungenügend für Kategorie I oder IIA.*
  - histologischer Subtyp
  - Mikrosatellitenstatus und intratumorale Lymphozyten
  - 18q-Deletion
  - Tumorwachstumsmuster
  - «tumor budding»
  - Perineuralscheideninfiltration (Pn-Status).
- ▲ *Kategorie III: Noch nicht genügend untersucht hinsichtlich prognostischen Werts.*
  - molekulare Marker
  - Mikrogefässdichte
  - Adhäsionsmoleküle
  - peritumorale Fibrose und Entzündung
  - neuroendokrine Differenzierung
  - Proliferation.
- ▲ *Kategorie IV: Kein prognostischer Wert basierend auf zahlreichen Studien.*
  - Tumorgrosse
  - makroskopische Tumorkonfiguration

Im Gegensatz zu den prognostischen Faktoren gibt es bei den prädiktiven Faktoren keine etablierten histopathologischen oder immunhistochemischen Marker. Auf molekularer Ebene hingegen sind der Mikrosatellitenstatus und insbesondere die Moleküle des RAS-Transduktionswegs (KRAS, BRAF, PTEN, PIK3CA) zu erwähnen.

Der prognostische und prädiktive Wert der häufig benutzten histopathologischen, immunhistochemischen und molekularen Faktoren ist in *Tabelle 2* zusammengefasst.

### Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel und der Fokus des vorliegenden Artikels liegen in der Standortbestimmung der histopathologischen, immunhistochemischen und molekularen

Tabelle 2:

### Prognostische und prädiktive Faktoren beim kolorektalen Karzinom

Faktor	Prognostisch	Prädiktiv	Evidenzskala*
<b>Histomorphologisch</b>			
T-Stadium	+	-	I
N-Stadium	+	-	I
M-Stadium	+	-	I
L/V-Stadium	+	-	I
Histologischer Subtyp	(+)	-	IIB
Tumorgrad	+	-	IIA
Tumorregressionsgrad (nach neoadjuvanter Behandlung)	+	-	IIA
Zirkumferenzieller Resektionsrand	+	-	IIA
Perineuralscheideninfiltration	+	-	IIB
Wachstumsmuster	+	(-)	IIB
«Tumor Budding»	+	(-)	IIB
<b>Immunhistochemisch</b>			
CDB	+	(-)	IIB
MSI-H	+	(+)	IIB
<b>Molekular</b>			
EGFR	-	(-)	III
KRAS	(-)	+	III
BRAF	+	(+)	III
PIK3CA	(-)	(+)	III
PTEN	-	(+)	III
CIMP	(-)	(+)	III

+: Ja; -: Nein; (+): partiell; (-): unklar

\*Kategorien gemäss CAP (College of American Pathologists) 1999 (aktualisiert auf [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) 2012)

Biomarker aus der Sicht der Pathologie. Nicht unerwähnt bleiben darf, dass die Liste der im klinischen Alltag eingesetzten Biomarker beim KRK in den nächsten Jahren sicher erweitert werden wird. Insbesondere werden neue Technologien zum Einsatz kommen, die es möglich machen, Biomarker am histologischen Schnittpräparat auf mRNA- und miRNA-Ebene zu visualisieren, was eine deutliche Erleichterung in der praktischen Arbeit des modernen Pathologen bedeuten würde.

In der täglichen Routine sollte ein akkurater pathologischer Bericht eines diagnostizierten KRK folgende Informationen enthalten:

- ▲ TNM-Stadium, L- und V-Stadium, Tumorgrad, Wachstumsmuster (evtl. «tumor budding»), Pn-Stadium, histologischer Subtyp
- ▲ Beurteilung des oralen, aboralen und Gefässabsetzungsrandes
- ▲ beim Rektumkarzinom: Beurteilung des Regressionsgrades und des zirkumferenziellen Resektionsrandes

- ▲ bei klinischer und/oder morphologischer Indikation: Mikrosatellitenstatus
- ▲ bei klinischer Indikation: KRAS- und BRAF-Mutationsanalyse. ▲

Prof. Dr. med. Alessandro Lugli  
Institut für Pathologie  
Universität Bern  
Inselspital  
3010 Bern  
E-Mail: alessandro.lugli@pathology.unibe.ch

### Quellen:

1. Bosman FT, Carneiro F, et al.: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. IARC 2010. 3<sup>rd</sup> edition: 131–182.
2. Edge S, Byrd DR, et al.: AJCC Cancer Staging Manual. Springer 2010: 7<sup>th</sup> edition: 143–64.
3. Sobin LH, Gospodarowicz M, et al. TNM Classification of Malignant Tumors. Blackwell Publishing Ltd 2010. 7<sup>th</sup> edition: 100–05.
4. Compton CC: Optimal pathologic staging: defining stage II disease. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22 Pt 2): 6862s–6870s.
5. Lugli A, Tornillo L, et al.: Kolon & Rektum. Qualitätsrichtlinien der Schweizerischen Gesellschaft für Pathologie (SGPath) 2010; Kapitel 2.
6. Betge J, Pollheimer MJ, et al.: Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012; 118(3): 628–38.
7. Liebig C, Ayala G, et al.: Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5131–37.
8. Morikawa T, Tanaka N, et al.: Predictors of lymph node count in colorectal cancer resections: data from US nationwide prospective cohort studies. *Arch Surg* 2012; 147(8): 715–23.
9. Lugli A, Karamitopoulou E, et al.: Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(11): 1713–17.
10. Nagtegaal I D, Quirke P: What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer? *J Clin Oncol* 2008; 26(2): 303–12.
11. Tischoff I, Tannapel A: Regression grading in gastrointestinal tumors. *Pathologe* 2012; 33(1): 53–60.
12. Lugli A, Tzankov L, et al.: Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol* 2008; 21(11): 1403–12.
13. Jenkins MA, Hayashi S, et al.: Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48–56.
14. Galon J, Costes A, et al.: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960–64.
15. Galon J, Franck P, et al.: Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10(1): 205.
16. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759–67.
17. Jass JR.: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113–30.
18. Leggett B, Whitehall V.: Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2088–2100.

## Merkmale

- ▲ **Beim KRK** gibt es zurzeit keine etablierte und standardisierte molekulare Klassifikation.
- ▲ **Die in der Literatur** vorgeschlagenen Klassifikationen beruhen überwiegend auf dem Mikrosatelliten- und CIMP-Status und auf Molekülen des RAS-Transduktionsweges wie zum Beispiel KRAS, BRAF und PIK3CA.
- ▲ **In der täglichen Routine** des Pathologen kommen histopathologische, immunhistochemische und molekulare Biomarker zum Einsatz.
- ▲ **Einen prognostischen Wert** haben insbesondere histopathologische und immunhistochemische Biomarker, während molekulare Marker eher in der Prädiktion des Ansprechens auf eine spezifische Therapie eine Rolle spielen.

19. The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407): 330–37.
20. Domingo E, Ramamoorthy R, et al.: Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. *J Pathol* 2013 (in press).
21. Umar A, Boland CR, et al.: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–68.
22. Popat S, Hubner R, et al.: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23(3): 609–18.
23. Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073–87: e2073.
24. Pritchard CC, Grady WM: Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011; 60(1): 116–29.
25. Richman SD, Chambers P, et al.: Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011; 34(1–2): 61–66.
26. Baldus SE, Schaefer KL, et al.: Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 790–99.
27. Tejpar S, Celik I et al.: Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 2012; 30(29): 3570–77.
28. Misale S, Yaeger R, et al.: Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532–36.
29. Diaz LA Jr, Williams RT, et al.: The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537–40.
30. Curtin K, Slattery ML, et al.: CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int* 2011; 902674: 1–8.
31. McShane LM, Altman DG, et al.: Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(16): 1180–84.
32. Compton CC, Tanabe KK, et al.: Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com) 2012; 1–42.