

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Alterationen des Mismatch-Reparaturgens hMLH1
bei sporadischen kolorektalen Karzinomen
- eine molekularbiologische und immunhistochemische Analyse**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Ulf Karsten Pommrich
Osterburg
2006

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Pommrich, Ulf Karsten:

Alterationen des Mismatch-Reparaturgens hMLH1 bei sporadischen kolorektalen Karzinomen - eine molekularbiologische und immunhistochemische Analyse

2006. 86 Bl.: 26 Abb., 8 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat:

Das sporadische kolorektale Karzinom (KRK) entwickelt sich meist über eine Adenom-Karzinom-Sequenz. Für circa 15% der sporadischen KRK wird jedoch eine Mikrosatelliteninstabilität und der Funktionsverlust der Mismatch-Reparaturgene wie hMLH1 als Ursache der Tumorgenese angenommen. In der vorliegenden Arbeit wurden 154 sporadische KRK untersucht. Von 147 Patienten wurden aus Paraffingewebe mit vier Stenzen pro Tumor hergestellte Microarrays immunhistochemisch bezüglich der Proteinexpression von hMLH1 untersucht. 97,3% der Fälle waren auswertbar, davon wurden bei 66,7% vier Stenzen gleich bewertet, dazu gehörten alle 25 negativen und weitere 70 positive Fälle. Bei 18,9% sind drei und bei 9,8% zwei Stenzen sowie bei nur 4,9% eine Stanze positiv ausgewertet worden. 100% des als Vergleich genutzten Nichttumorgewebes zeigte eine positive Expression des hMLH1, bei 16,3% der Tumoren war jedoch keine Expression mehr nachweisbar. Bei diesen Patienten ohne Expression wurden signifikant mehr Fernmetastasen gefunden ($p=0,018$). Bei 63 Fällen wurde bisulfidbehandelte DNA mit einer methylierungsspezifischen PCR hinsichtlich der Hypermethylierung der Promotorregion von hMLH1 überprüft. Diese wurde bei sechs Patienten (9,5%) gefunden, fünf dieser Fälle waren Frauen, vier Fälle waren mikrosatelliteninstabil. Das Durchschnittsalter lag sowohl bei positiver Hypermethylierung als auch bei negativer Expression von hMLH1 tendenziell höher als bei der Vergleichsgruppe. Bei 55 Patienten wurden beide Untersuchungen durchgeführt, 66,7% aller Tumoren mit positiver Promotormethylierung zeigten eine fehlende hMLH1-Expression ($p=0,002$).

Schlüsselwörter:

hMLH1, Kolorektale Karzinome, sporadische kolorektale Karzinome, Kolonkarzinom, Promotorhypermethylierung, Tissue Microarray, Microarray, Bisulfidbehandlung, methylierungsspezifische PCR, MSI, HNPCC

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Kolorektale Karzinome	5
1.1.1. Definition und Epidemiologie	5
1.1.2. Tumorgenese und Formen.....	5
1.1.2.1. Ätiologie.....	5
1.1.2.2. Kolorektale Adenome.....	6
1.1.2.3. Sporadische kolorektale Karzinome.....	6
1.1.2.4. Hereditäre kolorektale Karzinome	8
1.1.3. Klassifikation und Lokalisation.....	10
1.2. Epigenetik.....	12
1.2.1. Definition.....	12
1.2.2. Chromatin und Histone	12
1.2.3. DNA-Methylierung	13
1.2.4. Genom-Methylierung und Tumorgenese	14
1.3. Mikrosatelliteninstabilität und Mismatch-Reparaturgene	17
1.3.1. hMLH1 und hMSH2	17
1.3.2. Mikrosatelliteninstabilität.....	18
1.3.3. Funktion der Mismatch-Reparaturgene.....	18
1.4. Aufgabenstellung.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Untersuchungskollektiv.....	21
2.2. Molekularbiologische Untersuchungen.....	21
2.2.1. DNA-Präparation.....	21
2.2.2. Bisulfidbehandlung der DNA.....	23
2.2.3. Methylierungsspezifische PCR	26
2.2.4. Elektrophorese und Silberfärbung.....	27
2.2.5. Mikrosatellitenanalyse.....	29
2.3. Immunhistochemie	31
2.3.1. Herstellung der Tissue Microarrays und der Paraffinschnitte.....	31

2.3.2.	Immunhistochemische Färbung des hMLH1	31
2.4.	Auswertung	33
2.5.	Statistische Datenverarbeitung	34
3.	Ergebnisse	35
3.1.	Charakterisierung des Untersuchungskollektives	35
3.2.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	39
3.2.1.	Promotormethylierung von hMLH1	39
3.2.2.	Untersuchungen der Mikrosatelliteninstabilität	42
3.3.	Immunhistochemische Untersuchungen.....	44
3.3.1.	Expression von hMLH1	44
3.3.2.	Validierung der Microarrays	50
3.4.	Kombinierte Auswertung der Ergebnisse.....	50
4.	Diskussion	53
5.	Zusammenfassung.....	66
I.	Literaturverzeichnis.....	68
II.	Danksagung.....	79
III.	Erklärung.....	80
IV.	Lebenslauf.....	81
V.	Anhänge.....	82

Abkürzungsverzeichnis

AP-2	– Adapter Protein Complex AP-2
APC	– Adenomatöse Polyposis Coli
BAT25	– Mikrosatelliteninstabilitätsmarker BAT 25, Mononukleotidmarker
BAT26	– Mikrosatelliteninstabilitätsmarker BAT 26, Mononukleotidmarker
cDNA	– Complementary Deoxyribonucleic Acid
c-Myc	– Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
CpG	– 5'-Cytosin-Guanin-3' Basenfolge
D17S250	– Mikrosatelliteninstabilitätsmarker D17S250, Dinukleotidmarker
D2S123	– Mikrosatelliteninstabilitätsmarker D2S123, Dinukleotidmarker
DAPK	– Death Associated Protein Kinase
DCC	– Deleted in Colon Cancer
DNA	– Deoxyribonucleic Acid
E2F	– E2F Transcription Factor
E-cadherin	– Epithelial-cadherin
EXO1	– Exonuclease 1
FAM	– Fluoreszenzfarbstoff
FAP	– Familiäre Adenomatöse Polyposis
H2A, H2B, H3, H4	– Histon 2A, 2B, 3 und 4
HCC	– Hepatocellular Carcinoma
HE	– Hämatoxylin-Eosin
(h)MLH1 + 3	– (Human) MutL Homolog 1 + 3
(h)MSH2, 3, 4, 5, 6	– (Human) MutS Homolog 2, 3, 4, 5, 6
HNPCC	– Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
(h)PMS1 + 2	– (Human) Postmeiotic Segregation Increased Protein 1 + 2
ICD-O	– International Classification of Diseases for Oncology
K-ras	– Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	– Kolorektales Karzinom
LOH	– Lost Of Heterozygoty
M	– Molarität (Stoffmengenkonzentration)
MECP 1 + 2	– Methyl-CpG-binding Protein 1 + 2
MGMT	– O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

MMR	– Mismatch Repair (DNA-Reparatursystem)
mRNA	– Messenger Ribonucleic Acid
MSI-H	– Mikrosatelliteninstabilität - High
MSI-L	– Mikrosatelliteninstabilität - Low
MSS	– Mikrosatellitenstabil
MutHLS	– DNA Mismatch-Reparatursystems bei Escherichia coli
mutH	– Teil des MutHLS-Systems (Endonuclease)
mutL	– Teil des MutHLS-Systems (Reparaturaktivator)
mutS	– Teil des MutHLS-Systems (Mismatchdetektion)
p14(ARF)	– Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (Alternate open Reading Frame)
p16(INK4A)	– Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor
p53	– Tumorsuppressor p53
PCNA	– Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	– Polymerase Chain Reaction
pH	– Potentia Hydrogenii - negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RKI	– Robert Koch Institut
RNA	– Ribonucleic Acid
SMAD2 + 4	– Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2 + 4
TAMRA	– Fluoreszenzfarbstoff
TCF-1	– T-Cell Factor 1
TNM	– Tumor Nodus (Lymphknoten) Metastase - Klassifikation
U./Min.	– Umdrehungen pro Minute
UICC	– Union Internationale Contre Le Cancer
WHO	– World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Kolorektale Karzinome

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist ein maligner, epithelialer Tumor des Kolons oder Rektums, der die Lamina muscularis mucosae durchbrochen hat und somit in die Submucosa eingedrungen ist (Hamilton et al. 2000). Es zählt zu den häufigsten malignen Neoplasien des Menschen und ist eine Erkrankung des hohen Alters und der industrialisierten Länder Europas sowie Nord- und Südamerikas. Laut WHO gab es im Jahre 1996 weltweit 875.000 Fälle eines KRK. Mit steigendem Alter nimmt auch die Inzidenzrate stetig zu. Die Inzidenz in Deutschland lag 2002 bei 88,3 / 100.000 Einwohner bei Männern bzw. 84,9 / 100.000 Einwohner bei Frauen. Sie ist damit die höchste Inzidenz bei Frauen und die vierthöchste Inzidenz bei Männern im europäischen Vergleich. 2002 gab es nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes 71.400 Neuerkrankungen an Darmtumoren in Deutschland, das sind 16,8 % aller Tumorneuerkrankungen. Männer und Frauen waren dabei gleich stark betroffen, das mittlere Erkrankungsalter waren 69 Jahre bei Männern bzw. 75 Jahre bei Frauen. Darmtumoren sind nach Krebsneuerkrankungen der Prostata bei Männern (22,3%) bzw. der Brustdrüsen bei Frauen (26,8%) die zweithäufigste Tumorneuerkrankung in Deutschland. Im selben Jahr gab es bei einer Gesamtzahl von nahezu 210.000 Krebssterbefällen in Deutschland insgesamt fast 29.000 Fälle (über 14.000 Männer und annähernd 15.000 Frauen) mit der Todesursache Darmtumor – das entspricht 13,8%. Nur 10,5 % dieser 29.000 Fälle waren unter 60 Jahre alt. Damit sind Darmtumoren auch bei den Krebssterbefällen nach Lungentumoren bei Männern (26,3%) und Brustdrüsentumoren bei Frauen (17,8%) die zweithäufigste Tumortodesursache beider Geschlechter in Deutschland. (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI 2006).

1.1.2. Tumorgenese und Formen

1.1.2.1. Ätiologie

Insbesondere in Ländern mit westlichem Lebensstil und dem dort üblichen kalorienreichen Essen mit viel raffiniertem Zucker und rotem Fleisch sowie tierischen Fetten ist die Inzidenz von KRK hoch. Außerdem scheinen der Genuss von Alkohol und das Rauchen

weitere Risikofaktoren darzustellen. Als protektiv sind dagegen vor allem pflanzliche Produkte wie Obst und Gemüse, faserreiche Kost und körperliche Aktivität zu bewerten, jedoch sind insbesondere die faserreichen Nahrungsmittel inzwischen wieder in Frage gestellt worden (Asano et al. 2002, Mai et al. 2003, Neagoe et al. 2004, Campos et al. 2005). Außerdem besteht ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Tumors bei Personen mit den unter 1.1.2.4. beschriebenen genetisch vererbten APC- und MMR-Mutationen, bei chronisch inflammatorischen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie bei Patienten mit anderen Tumorleiden oder nach dem Erhalt einer therapeutischen Beckenbestrahlung (van Hogezaand et al. 2002, Casimiro 2002).

1.1.2.2. Kolorektale Adenome

Die eigentliche Vorstufe des kolorektalen Karzinoms ist das sogenannte Dickdarmadenom, eine adenomatöse, gutartige Neubildung der Dickdarmmukosa. Das Adenom, das 75% aller Polypen ausmacht, geht dabei von den Drüsenzellen der Mukosa aus und wächst in den meisten Fällen exophytisch als tubuläres, villöses oder tubulovillöses Adenom in Form eines Polypen in das Darmlumen hinein, zu einem geringeren Anteil bildet sich auch ein flaches Adenom. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sowohl die Größe als auch die Histologie des Polypen einen eigenständigen Risikofaktor darstellt. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass ein größeres und villöses Adenom ein höheres Karzinomrisiko besitzt als ein kleines und tubuläres Adenom. Besonders Polypen die größer als 2 cm sind, haben ein hohes Risiko, eine karzinomatöse Entartung zu entwickeln (Hermanek et al. 1983).

1.1.2.3. Sporadische kolorektale Karzinome

Die häufigste Form des KRK ist das sporadische kolorektale Karzinom, dabei entwickelt sich durch Umweltfaktoren und genetische Einflüsse bedingt ein Adenom in der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz zu einem malignen KRK. Dieses hatte bereits Morson 1974 aufgrund klinischer und morphologischer Grundlagen beschrieben. Molekularbiologisch haben insbesondere Fearon und Vogelstein dieses Modell der Tumorgenese weiterentwickelt (Morson 1974, Fearon et al. 1990b). Dabei wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Multistep-Karzinogenese handelt, bei der vor allem das Onkogen K-ras und die drei Tumorsuppressorgene p53, DCC und APC betroffen sind.

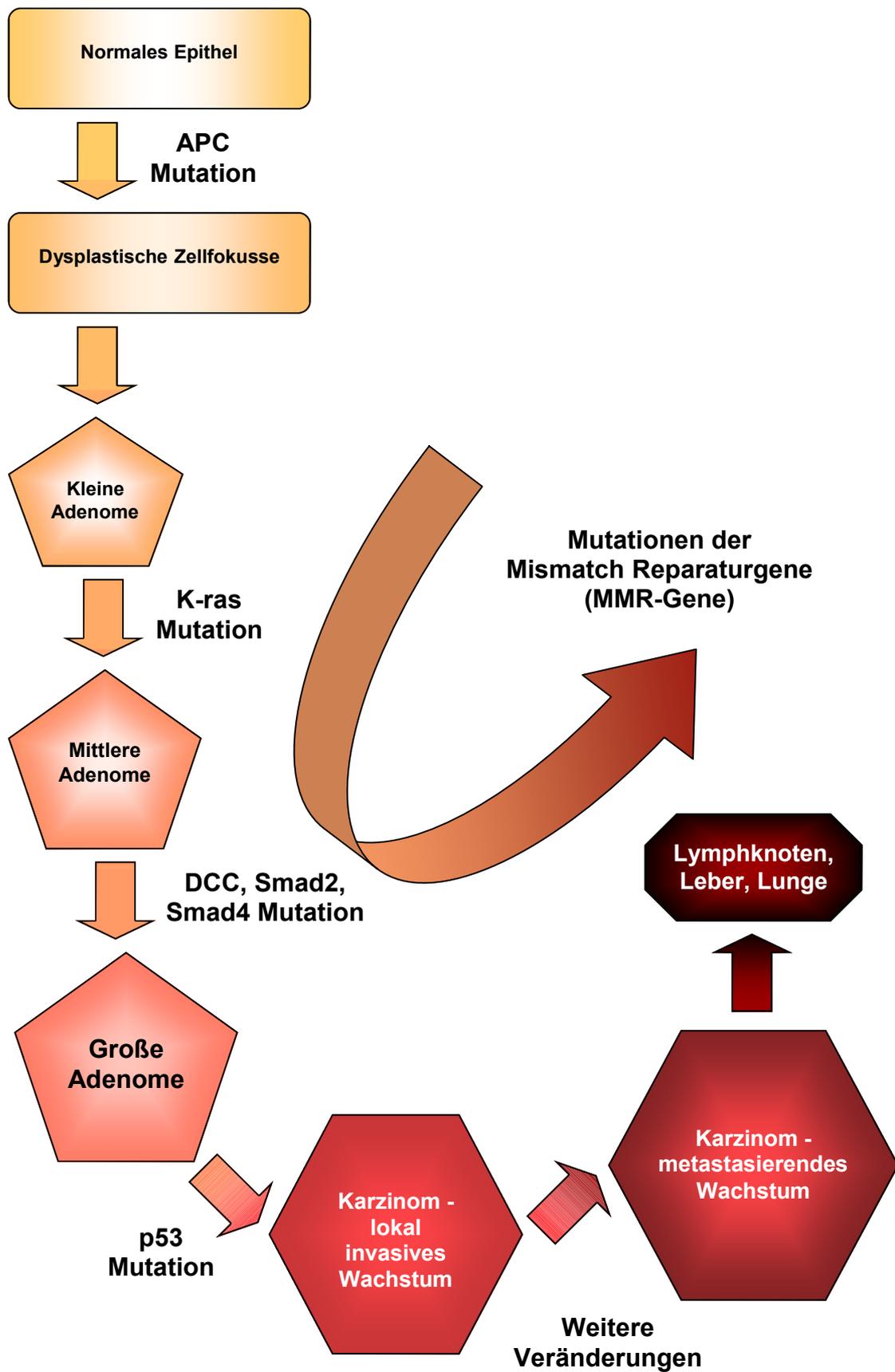


Abbildung 1.1. - Adenom-Karzinom-Sequenz in Anlehnung an die Arbeit von Kinzler und Vogelstein (Kinzler et al. 1996)

Diese Stufen der Karzinogenese sind sehr gut erforscht und zur Veranschaulichung in Abbildung 1.1. dargestellt. Es wird angenommen, dass die Mutation des APC-Gens, welches auf dem Chromosom 5q lokalisiert ist, den neoplastischen Prozess startet (Narayan et al. 2003). Durch den Ausfall der negativen Kontrolle und damit der Suppression kommt es zur verstärkten Expression der Onkogene β -Catenin und TCF-1. Damit beginnt das verstärkte Wachstum des Epithelgewebes (Friedrich et al. 2003). Kommt es dann zur Mutation des K-ras-Onkogen (Kirstin-ras, Chromosom 12p) beginnt eine anhaltende Proliferation der Zelle (Malumbres et al. 1998). Eine weitere Mutation im DCC-Gen (Deleted in Colorectal Cancer, Chromosom 18q) führt dann zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsionsfähigkeiten der Zelle. Somit kann sich die Zelle aus dem Zellverband lösen (Fearon et al. 1990a, Chuong et al. 1994). Durch die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 verliert die Zelle am Ende des Prozesses ihre Fähigkeit, sich selbst zu reparieren und die Apoptose zu initiieren (Shaw et al. 1992, Tamura et al. 1995). Die maligne Entartung der Zelle ist so endgültig besiegelt.

Früher wurde vermutet, dass eine Mutation der sogenannten MMR-Genen (Mismatch-Reparaturgene) hMLH1, hMSH2, hPMS1 oder hMSH6 zu einer Beschleunigung des Prozesses führen können, da durch den Verlust dieser Gene eine Kontrollfunktion der genauen Replikation der DNA verloren geht und es leichter zu einer Genmutation kommen kann. Inzwischen wurde dieser Weg der Karzinomentstehung, der mit Mikrosatelliteninstabilität durch MMR-Gendeaktivierung verbunden ist, aber als eigenständiger Weg der Karzinomentstehung angesehen (Gryfe et al. 1997, Reinacher-Schick et al. 2002).

1.1.2.4. Hereditäre kolorektale Karzinome

Im Unterschied zu den sporadischen Tumoren liegt bei den hereditären Karzinomen bereits eine über die Keimbahn vererbte Mutation vor, die zu einer Karzinom-Disposition führt. Dabei wird im Rahmen des „Two-Hit-Modells“ nach Knudson davon ausgegangen, dass neben der genomischen noch weitere somatische Mutationen im Laufe des Lebens des Patienten auftreten müssen, um zur Karzinomentstehung zu führen (Knudson 1971, Knudson 1996). Dabei sind meist jüngere Patienten von Karzinomen betroffen, jedoch handelt es sich lediglich um eine Prädisposition, die zwar mit einem vielfach höheren Risiko der Karzinomentwicklung behaftet ist, jedoch nicht bei jedem Patienten auch zwangsläufig zu

einer Karzinomentstehung führt. Einen Überblick über die autosomal-dominant erblichen kolorektalen Tumordispositionskrankheiten soll die Abbildung 1.2. verschaffen.

Die beiden wichtigsten Formen der hereditären Karzinome sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC). Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) kommt es bereits vor dem 30. Lebensjahr zu einem starken Wachstum von kolorektalen Adenomen mit nahezu einhundertprozentiger Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Karzinoms. Als Ursache für diese Erkrankung wurde die Keimbahnmutation des Adenomatösen Polyposis-Coli – kurz APC – Gens gefunden (Grodin et al. 1991).

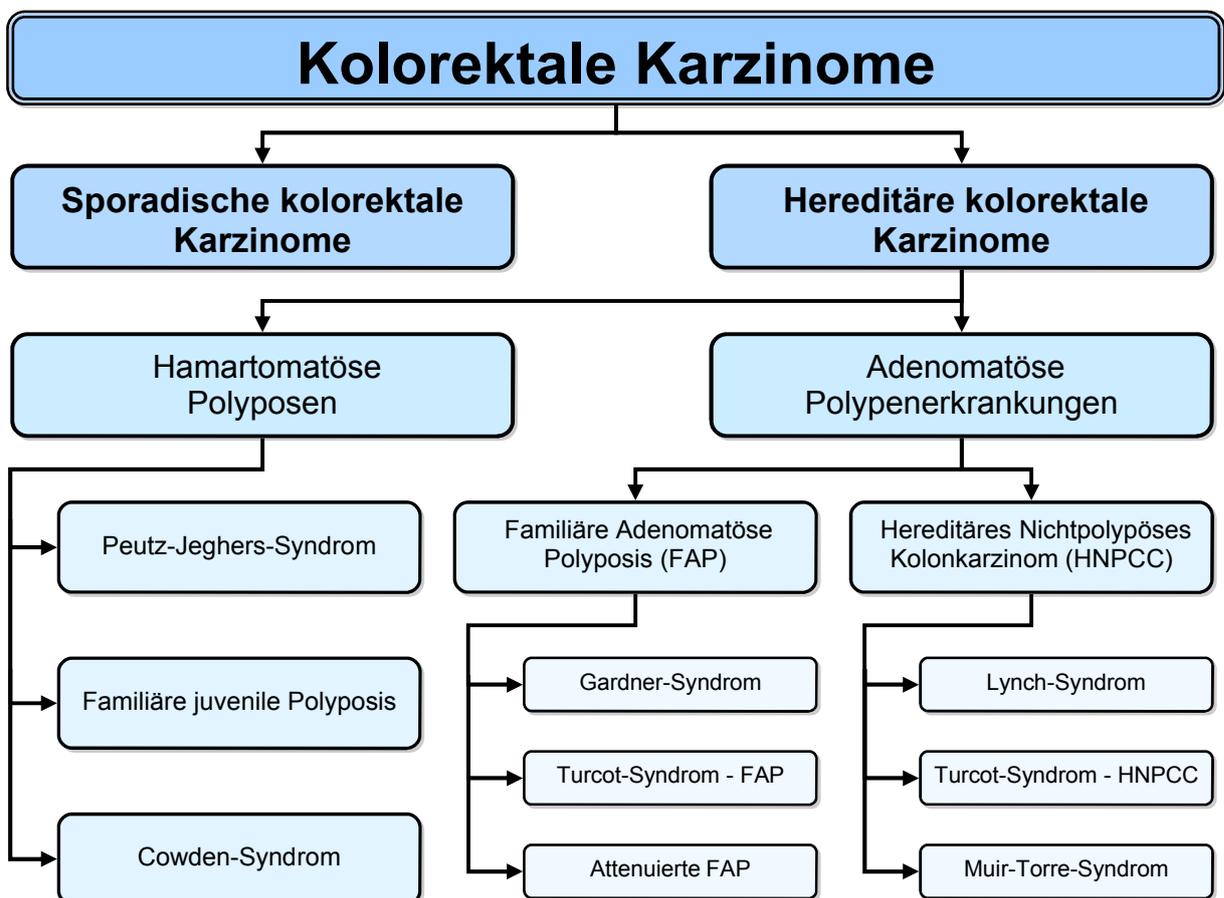


Abbildung 1.2. - Überblick über die autosomal-dominant erblichen kolorektalen Tumordispositionskrankheiten in Anlehnung an die Arbeit von Caspari (Caspari et al. 2000)

Beim hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC) kommt es zu einem familiär gehäuften Auftreten von KRK. Da bei dieser Gruppe von Erkrankungen ursächlich in den meisten Fällen ein Defekt der Mismatch-Reparaturgene hMLH1 und hMSH2, selten auch in hMSH6, hPMS1 oder hPMS2, gefunden wurde, soll auf diese Erkrankung etwas genauer eingegangen werden (Wijnen et al. 1997). Bei 80 – 90% der HNPCC spiegeln sich die dadurch entstehenden Instabilitäten und Fehler bei der DNA Replikation in einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) wieder (Kullmann et al. 1996).

Die Klinik unterscheidet sich nicht von dem Bild bei einem sporadischen Kolonkarzinom. Das HNPCC soll nach den sogenannten „Amsterdam II Kriterien“ diagnostiziert werden, diese wurden von der „International Collaborative Group on HNPCC“ 1990 festgelegt und 1999 überarbeitet (Vasen et al. 1999). Ein HNPCC ist demnach zu diagnostizieren, wenn:

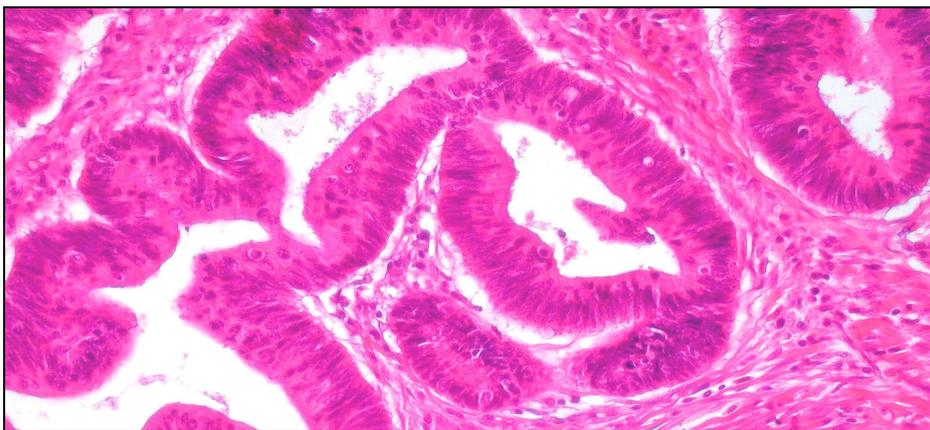
- drei oder mehr Verwandte an einem histologisch gesicherten KRK oder extrakolonischen Tumor (Endometrium, Dünndarm und ableitende Harnwege) leiden und mindestens eine dieser Personen mit dem Patienten erstgradig verwandt ist,
- die KRK-Anamnese zwei Generationen umfasst sowie eine FAP ausgeschlossen wurde und
- zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mindestens einer der Betroffenen jünger als 50 Jahre ist.

Treten nur kolorektale Karzinome in Rahmen eines HNPCC auf, spricht man vom Lynch-Syndrom Typ 1. Oft bilden sich jedoch auch weitere, extrakolonische Tumoren, insbesondere Endometriumkarzinome sind häufig (Lynch et al. 1998, Millar et al. 1999).

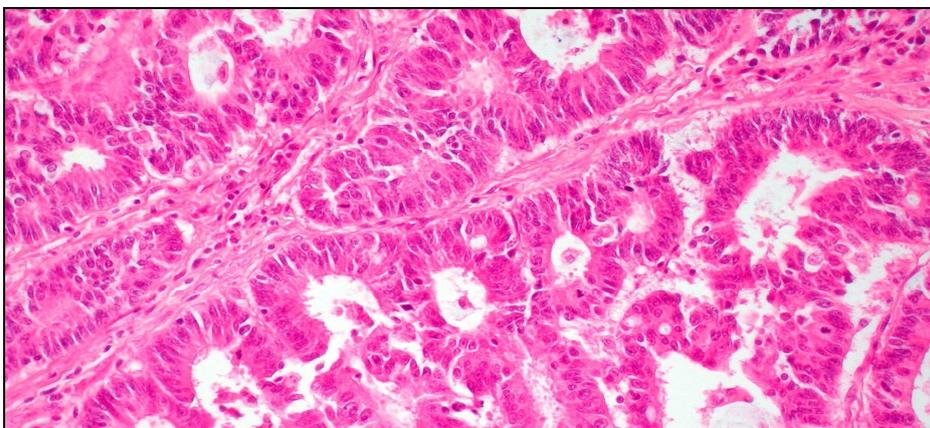
1.1.3. Klassifikation und Lokalisation

Die Einteilung der KRK erfolgt nach ihrer Lokalisation im Kolon, nach ihrer Histomorphologie, dem TNM-Stadium und nach der bereits beschriebenen Ursache in Form einer genetischen Disposition bzw. spontanen Mutationen. Die klinische und pathologische Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Methode der UICC (International Union Against Cancer). Zusätzlich wurde besonders im englischsprachigen Raum auch die Einteilung nach Dukes verwendet, die aber inzwischen auch dort an Bedeutung verloren hat. Dabei werden die Infiltrationstiefe des Primärtumors, das Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen sowie die Fernmetastasen beurteilt. Die Tumorerkrankung wird dementsprechend in ein bestimmtes Stadium eingeteilt, auf dessen Grundlage dann die

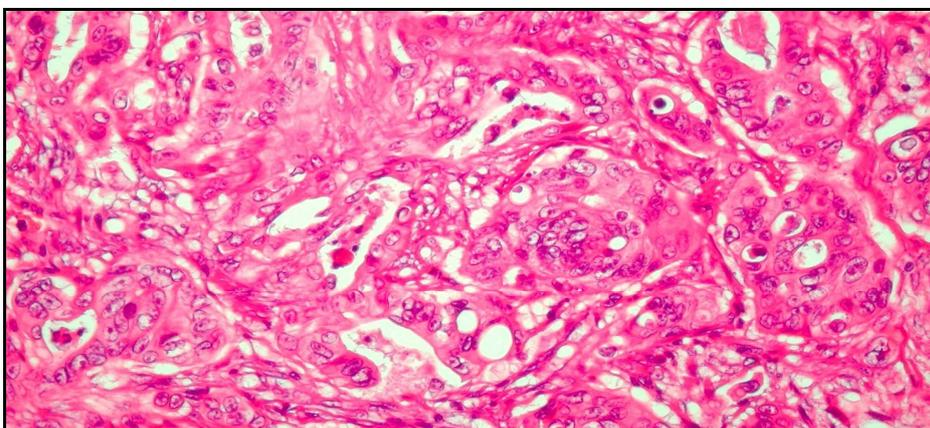
Therapie des Karzinoms geplant werden kann. Beim Grading wird der Differenzierungsgrad des Primärtumors festgelegt, die Abbildung 1.3. zeigt je einen Grad I, II und III-Tumor. Die Tabellen 1.1. und 1.2. (Anlage 1) stellen die TNM-Einteilung und das Grading in einer Übersicht dar. Die histomorphologische Beurteilung der KRK zeigt in den meisten Fällen ein tubuläres oder mucinöses Adenokarzinom, weitere Formen sind undifferenzierte Karzinome, kleinzellige Karzinome, Siegelringzellkarzinome, medulläre Karzinome sowie squamöse und adenosquamöse Karzinome (Taylor et al. 1999, Hamilton et al. 2000, Wittekind et al. 2002).



Grad I
(Fallnummer 52)



Grad II
(Fallnummer 50)



Grad III
(Fallnummer 4)

Abbildung 1.3. – Differenzierungsgrade von kolorektalen Karzinomen (HE-Färbung, 200x)

Gut zwei Drittel der sporadischen KRK entstehen distal der Flexura lienalis, nur ein Drittel im proximalen Teil des Kolons. Die meisten dieser distalen Karzinome sind im Sigmoid und Rektum zu finden (Gervaz et al. 2005, Goh et al. 2005, Strul et al. 2006). Einige Studien haben gezeigt, dass insbesondere Tumoren mit molekularbiologischen Veränderungen wie K-ras Mutationen und Mikrosatelliteninstabilität verstärkt im proximalen, rechtsseitigen Kolon entstehen (Catalano et al. 2005; Benatti et al. 2005). Die WHO-Einteilung der Lokalisation kolorektaler Karzinome umfasst zehn verschiedene Bereiche. Zunächst wird zwischen Kolon (ICD-O C18), dem kolorektalen Übergang (ICD-O C19) und dem Rektum (ICD-O C20) unterschieden. Das Kolon wird dann wiederum in acht Segmente aufgeteilt – Caecum (C18.0), Appendix (C18.1), Colon ascendens (C18.2), Flexura hepatica (coli dextra, C18.3), Colon transversum (C18.4), Flexura lienalis (coli sinistra, C18.5), Colon descendens (C18.6) und Colon sigmoideum (C18.7) (Wittekind et al. 2002).

1.2. Epigenetik

1.2.1. Definition

Mit der Funktion der DNA aufgrund ihrer Basenfolge beschäftigt sich die Genetik. Die Epigenetik hingegen befasst sich mit den weiteren Faktoren und Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, dass es zur Regulation dieser Gene kommt. Es wird erforscht, wie, wann und warum sie ein- bzw. ausgeschaltet werden, ohne dass dabei die DNA-Sequenz selbst verändert wird. Denn grundsätzlich enthalten alle Zellen des Körpers die gleiche Erbinformation in Form der DNA, es werden jedoch zell- und bedarfspezifisch nur bestimmte Teile davon expremiert (Holliday 1989).

1.2.2. Chromatin und Histone

Einer der Mechanismen der Regulation von Genen ist das Chromatin. Es besteht aus kleinen, basischen Proteinen, den sogenannten Histonen, den nichthistonischen Proteinen und der DNA. Die Kernhistone bestehen jeweils aus zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Man unterscheidet Euchromatin, eine lockere Form mit hoher Genaktivität, und Heterochromatin, eine dichtgepackte Form mit nur sehr geringer Genaktivität. Bei der Zellteilung wird das Chromatin noch weiter verdichtet und es bilden sich die Chromosomen. Ein weiterer Mechanismus ist die Histon-Modifikation. Dabei kommt es zu dynamischen oder statischen

Veränderungen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Methylierungen der Histone, was wiederum über eine Veränderung der Verpackungsdichte der DNA zur Regulation von Genaktivitäten führt (Jenuwein et al. 2001, Seo et al. 2003, Lippmann et al. 2004, Wang et al. 2004).

1.2.3. DNA-Methylierung

Die dritte Möglichkeit der Expressionsregulation ist die DNA-Methylierung, eine Modifikation der DNA selbst. Ihre Bedeutung ist vielfältig und sie ist involviert in einige Schlüsselfunktionen des Genoms. Beispielhaft zu nennen ist hier das sogenannte Imprinting, ein Phänomen bei dem nur das maternale oder paternale Allel eines Gens aktiv ist (Constancia et al. 1998). Bedeutsam ist sie auch bei der X-Chromosom-Inaktivierung und der Tumorgenese sowie der Deaktivierung von parasitären, retroviralen DNA-Sequenzen (Walsh et al. 1998). Die DNA-Methyltransferase kann Cytosin methylieren, dadurch gibt es neben den bekannten Basen Adenin, Thymin, Guanin zwei Formen von Cytosin, unmethyliertes Cytosin und 5-Methylcytosin. Diese Methylierung kann aber nur in CpG-Konstellation erfolgen, das heißt nur an einem Cytosin, das direkt vor einem Guanin steht (5'-CG-3'). Durch die Methylierung des Cytosins in der Promotorregion eines Gens kommt es zur Regulation der Genexpression. Die Methylierung wirkt wie ein An/Aus-Schalter, da Transkriptionsfaktoren wie c-Myc, AP-2 oder E2F für die Translation nicht mehr an den Promotor binden können (siehe Abbildungen 1.4. und 1.5.) (Singal et al. 1999). Des Weiteren erhöht sich durch die Methylierung von CpG-Cytosinen auch die Affinität für methylbindende Proteine wie MeCP1 und MeCP2, welche nicht sequenzspezifisch aber spezifisch für methylierte DNA sind. Diese konkurrieren dann mit den Transkriptionsfaktoren um die methylierte Bindungsstelle (Boyes et al. 1992). Eine weitere Theorie geht davon aus, dass die methylbindenden Proteine außerdem mit anderen Proteinen wie der Histondeacetylase verknüpft sind. Diese spaltet Acetylgruppen von der Aminosäure Lysin in den Histonen ab und verfestigt so die Bindung zwischen der DNA und den Histonen zusätzlich. Wahrscheinlich führt die Kombination aus DNA-Methylierung und Histondeacetylierung zum Silencing von Genen (Ng et al. 1999, Rice et al. 2001).

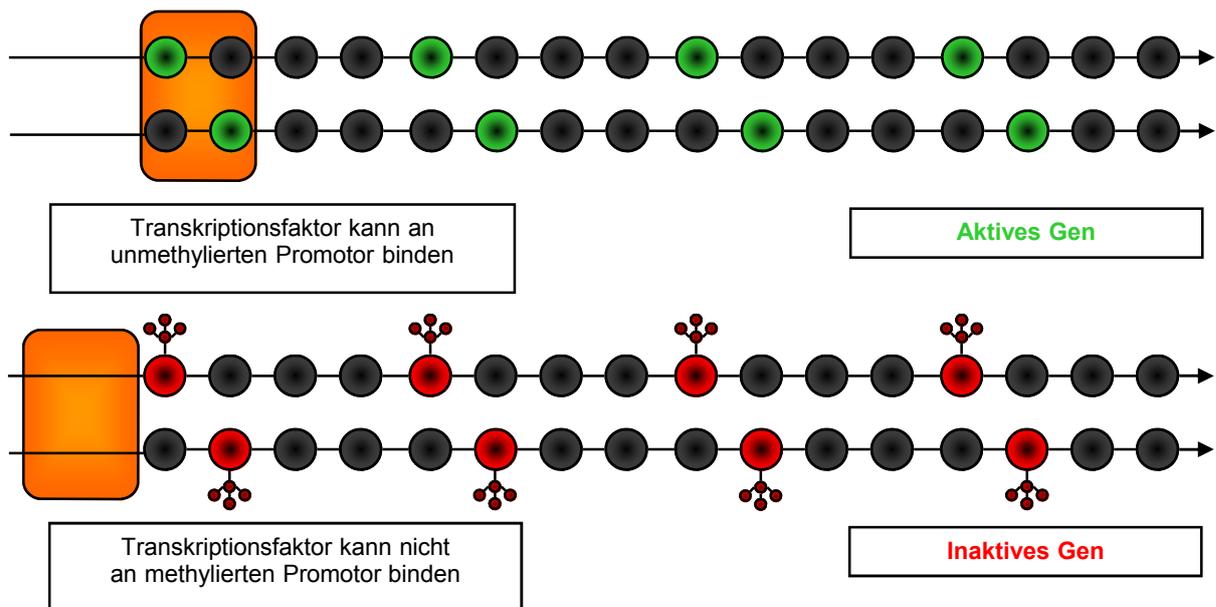


Abbildung 1.4. - Modell der Gendeaktivierung durch Promotormethylierung in Anlehnung an Singal und Ginder (Singal et al. 1999)

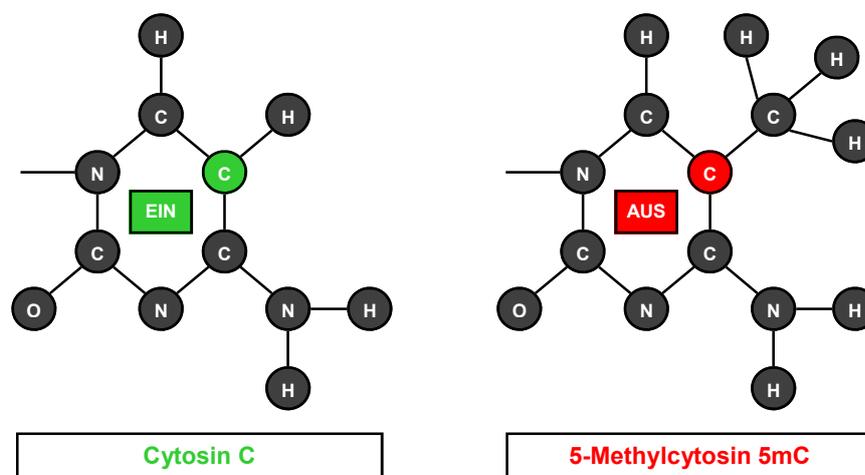


Abbildung 1.5. - Cytosin und 5-Methylcytosin in Anlehnung an die Arbeit von Bestor (Bestor 2000)

1.2.4. Genom-Methylierung und Tumorgenese

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass DNA-Methylierungen und DNA-Demethylierungen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren spielen. Schnell konnte nachgewiesen werden, dass die DNA-Methyltransferase in Tumoren bis zu 3000mal aktiver ist als in

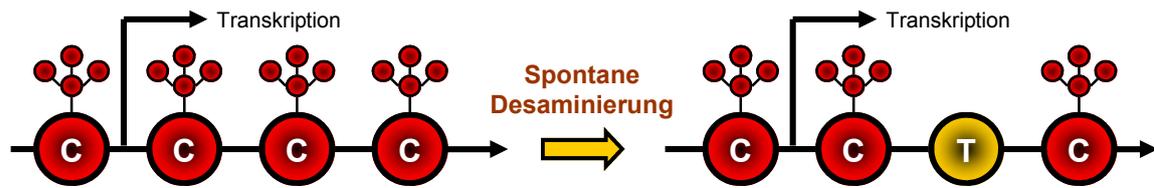
Nichttumoren (Kautiainen et al. 1986). Ein im Allgemeinen hypomethyliertes Genom mit Regionen von Hypermethylierungen, insbesondere den unter 1.2.3. beschriebenen CpG-Regionen, wird in vielen Tumorzellen gefunden (Deng et al. 2006). Einige der verschiedenen Mechanismen, die zur Tumorgenese beitragen können, sind in der Abbildung 1.6. dargestellt und sollen hier kurz erläutert werden.

Im Tumorgewebe gibt es eine hohe Mutationsrate innerhalb von CpG-Sequenzen. Wie im Teil A dargestellt, kommt es durch eine hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosin zur Entstehung der Base Thymin und dadurch zu einem DNA-Mismatch von Thymin zu Guanin, das dem unmethylierten Cytosin auf der DNA normalerweise gegenüberliegt. Eine solche Punktmutation von 5-Methylcytosin ist häufig die Ursache einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (Magewu et al. 1994, Yang et al. 1995).

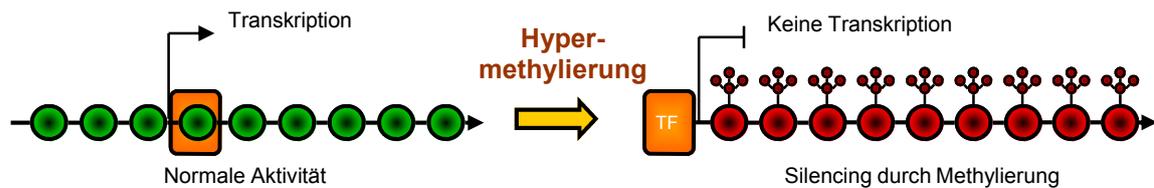
Bei B sieht man die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung, wie es z.B. beim Tumorsuppressorgen p16 gezeigt wurde. Durch die Hypermethylation können Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden und das Gen wird nicht mehr expremiert (Myohanen et al. 1998).

Wie bereits erwähnt wurde, scheint eine globale Hypomethylierung von Tumorgewebe schon in einem frühen Tumorstadium aufzutreten. Außerdem kommt es durch die in C gezeigte Demethylierung spezieller Onkogenregionen zur Expression der dort lokalisierten Gene, als Beispiel ist hier das Proto-Onkogen K-ras beim kolorektalen Karzinom zu nennen (Gryfe et al. 1997).

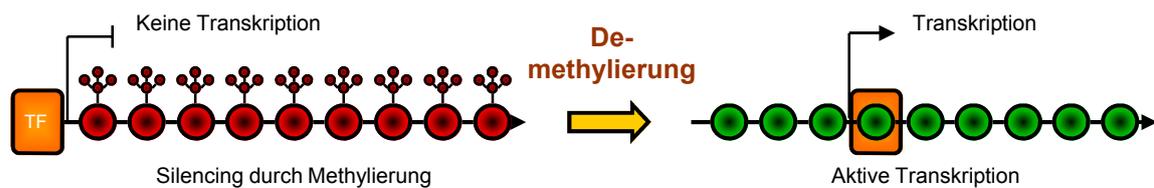
Außerdem kann es zur Induktion von chromosomaler Instabilität durch fehlende de-novo-Methylaseaktivität kommen, dieses soll der Teil D der Abbildung 1.5. veranschaulichen. Lengauer postulierte 1997, dass ein Methylierungsfehler in Kolonzellen mit funktionsfähigen Mismatch-Reparaturgenen zu einer Instabilität der Chromosomen führt und dadurch während der Zellteilung ganze Chromosomen verloren gehen können. Dadurch kommt es zur notwendigen genetischen Instabilität, die zur Tumorentstehung und zum Tumorwachstum führen können (Lengauer et al. 1997).



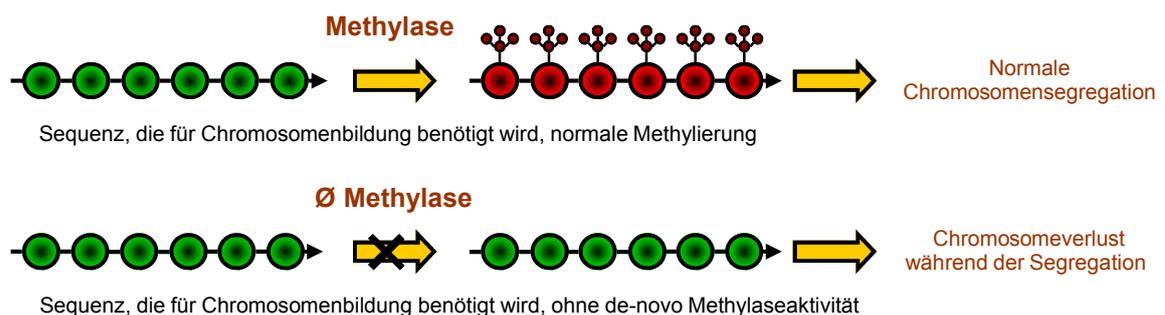
A Onkogenetische Punktmutation eines 5-Methylcytosins zu Thymin durch spontane Desaminierung, z.B. Tumorsuppressorgen p53



B Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch Hypermethylierung z.B. Tumorsuppressorgen p16



C Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Demethylierung z.B. K-ras bei Kolorektalen Karzinomen



D Chromosomeninstabilität aufgrund fehlerhafter DNA-Methylierung

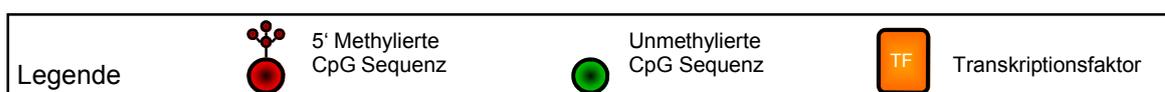


Abbildung 1.6. - Darstellung verschiedener Mechanismen, wie DNA-Methylierungen zur Tumorgenese beitragen können, in Anlehnung an Singal (Singal et al. 1999)

1.3. Mikrosatelliteninstabilität und Mismatch-Reparaturgene

1.3.1. hMLH1 und hMSH2

Das HNPCC war lange Zeit ein Krankheitsbild, bei dem zwar eine erbliche Komponente vermutet wurde, jedoch die genaue Ursache unbekannt war. Erst 1993 fand Lindblom mit Mikrosatellitenmarkeranalysen in großen HNPCC Familien erste eindeutige Hinweise, dass der Defekt auf dem Chromosom 2p16 oder 3p21 liegen könnte (Lindblom et al. 1993). Im selben Jahr entdeckte Aaltonen bei der Suche nach Allelverlusten auf dem Chromosom 2p16, dass es nicht wie erwartet einen Allelverlust sondern neue Mikrosatellitenallele gab, die der Patient in seinen Nichttumorzellen nicht besaß. Man schloss auf eine generelle Genominstabilität bei der Replikation oder Reparatur von kurzen, sich wiederholenden Sequenzen (Aaltonen et al. 1993). Des Weiteren wurde entdeckt, dass auch Bakterien und Hefen mit defekten MMR-Genen wie mutL oder mutS die gleichen Mikrosatelliten-Instabilität zeigten wie HNPCC-Patienten. Strand kam daher zu dem Schluss, dass ein Defekt in homologen menschlichen Mismatch-Reparaturgenen (MMR-Genen) von mutL oder mutS die Ursache für das HNPCC sei (Strand et al. 1993).

Das „Human MutL Homolog 1“ (hMLH1) befindet sich auf dem Chromosom 3p21-23 (Bronner et al. 1994). Es umfasst circa 58 Kilobasen DNA und enthält 19 Exons (Kolodner et al. 1995). Weitere MutL homologe Gene sind hMLH3, hPMS1 und hPMS2. Das Protein MLH1 formt mit einem der Proteine MLH3, PMS1 oder PMS2 ein Heterodimer (Kondo et al. 2001). Es konnte keine enzymatische Aktivität des MLH1 Proteins selbst nachgewiesen werden, daher ist es wahrscheinlich ein Verbindungsprotein, das für die Bindung anderer Proteine an den Heterodimerkomplex eine wichtige Rolle spielt (Mitchell et al. 2002).

Das zweite, wichtige Gen „Human MutS Homolog 2“ (hMSH2) befindet sich auf dem Chromosom 2p21 und ist das homologe humane Gen von mutS (Fishel et al. 1993). Es enthält 16 Exons auf circa 74 Kilobasen DNA (Kolodner et al. 1994). Weitere MutS homologe Gene sind hMSH3 und hMSH6. Außerdem gibt es noch MSH4 und MSH5, diese scheinen jedoch meiosespezifisch und nicht in die MMR involviert zu sein (Hollingsworth et al. 1995). Ähnlich dem MLH1 formt auch das MSH2 ein Heterodimer mit den MutS homologen Proteinen MSH6 oder MSH3 (Marti et al. 2002).

1.3.2. Mikrosatelliteninstabilität

Als Mikrosatelliten bezeichnet man einfache, repetitive Sequenzen des Genoms, die jeweils eine Länge von bis zu sechs Basen besitzen. Bei der Mikrosatelliteninstabilität kommt es zur Verlängerung oder Verkürzung dieser Sequenzbereiche, als Ursache dafür wurden Defekte im unter 1.3.3. beschriebenen DNA-Mismatch-Repair-Pathway gefunden. So kommt es bei der molekularbiologischen Untersuchung durch die veränderte Länge der DNA und damit auch der PCR-Produkte dieser Sequenzen zur Veränderung des Bandenmusters bei der Elektrophorese (Weber et al. 1989).

Sporadische kolorektale Karzinom mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H (MSI high)) unterscheiden sich morphologisch, klinisch und auch molekular von Karzinomen, die Mikrosatellitenstabil sind (MSS). Zwischen 15 und 20% der sporadischen KRK zeigen eine MSI und besitzen große Ähnlichkeit mit den in 90% MSI-positiven HNPCC-assoziierten Karzinomen. MSI-positive sporadische KRK liegen häufiger proximal der linken Kolonflexur, sind oft vom muzinösen Typ, haben eine starke lymphozytäre Infiltration des Tumors und zeigen eine besondere solid-medulläre Wachstumsform. Außerdem scheinen Patienten mit MSI, insbesondere im Stadium II und III, eine bessere Prognose zu besitzen (Bubb et al. 1996, Bocker et al. 1996, Jass et al. 1998, Benatti et al. 2005).

Für die Diagnostik der MSI sind fünf Mikrosatelliten besonders geeignet. Dabei handelt es sich um die Mononukleotidmarker BAT25 und BAT26 sowie die Dinukleotidmarker D2S123, APC sowie D17S250, die beim zweiten HNPCC-Expertentreffen in Bethesda als Primerpanel zur besseren, standardisierten MSI-Analyse festgelegt wurden. Für die Diagnose MSI-H müssen mindestens zwei dieser fünf Marker eine Instabilität zeigen. Ist nur ein Marker instabil, spricht man von MSI-L (MSI low). Aber auch die Testung von BAT26 allein besitzt eine hohe Sensitivität für MSI-H Tumoren (Bocker et al. 1997, Loukola et al. 2001).

1.3.3. Funktion der Mismatch-Reparaturgene

Die Mismatch-Reparaturgene (MMR-Gene) erzeugen Genprodukte, die eine wichtige Rolle auf dem DNA-Mismatch-Repair-Pathway spielen. Die Abbildung 1.7. soll die Funktion der MMR-Gene veranschaulichen.

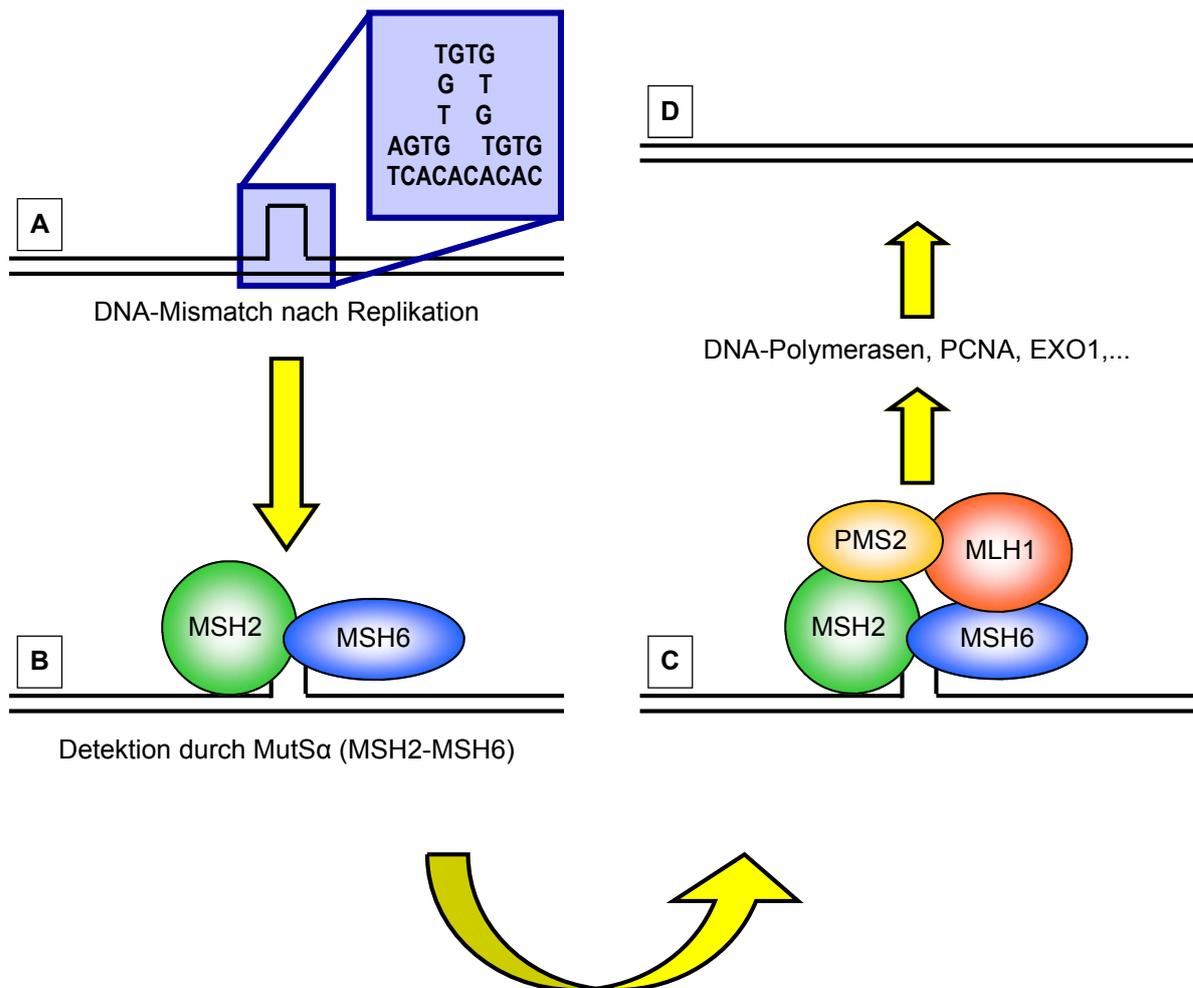


Abbildung 1.7. – DNA-Mismatch-Repair-Pathway in Anlehnung an die Arbeiten von Kinzler und Marti (Kinzler et al. 1996, Marti et al 2002)

Die in (A) dargestellten DNA-Mismatchdefekte können bei Replikationsfehlern, durch Basenmodifikation oder auch spontan auftreten. Die Initiierung (B) des Reparaturprozesses können die Komplexe MutSα (MSH2-MSH6) und MutSβ (MSH2-MSH3) übernehmen. Der Unterschied besteht dabei in den Fähigkeiten der Komplexe, den DNA-Mismatch zu erkennen. Während MutSα an Base-Base- und Insertions-Deletions-Mismatches binden kann, bindet MutSβ nur an Insertions-Deletions-Mismatches (Genschel et al. 1998). Im nächsten Schritt (C) binden Komplexe des MLH1 an das MutSα oder MutSβ. Dabei ist MutLα (MLH1-PMS2) das häufigste Heterodimer des MLH1, die anderen Komplexe MLH1-PMS1 und MLH1-MLH3 spielen nur eine untergeordnete Rolle. Zusammen aktivieren die MutS- und MutL-Heterodimere dann weitere Faktoren für die Reparatur des DNA-Mismatches. Eine mögliche Funktion haben hier das „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA), die

Exonuclease 1 (EXO1) und die DNA-Polymerasen delta und epsilon. Im MutHLS-Weg bei *Escherichia coli*, dem Ursprung dieses Modells der MMR-Genfunktion, übernimmt die MutH-Endonuclease diese Reparaturfunktion. Ein Analogon dazu konnte aber beim Menschen bisher nicht gefunden werden. Nach der Reparatur ist die normale DNA-Doppelhelix (D) wiederhergestellt. Die Hauptaufgabe der MMR-Genprodukte liegt also nach dem heutigem Erkenntnisstand im Erkennen von Mismatchdefekten und in der Initiierung der Reparatur (Marti et al. 2002).

1.4. Aufgabenstellung

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Mutationen des hMLH1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung kolorektaler Karzinome bei HNPCC-Patienten spielen. Eine fehlerhafte Funktion der Mismatch-Reparaturgene kann aber auch zur Entstehung sporadischer KKK führen. Da in Familien mit einer hereditären Störung der Funktion des hMLH1 ein wesentlich erhöhtes Risiko der Entwicklung eines Karzinoms besteht, erscheint es wichtig, die Ursache der Fehlfunktion von hMLH1 zu finden. Während die Mutation bei diesen Familien die wichtigste Ursache darstellt, scheinen bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen andere Mechanismen, insbesondere die der Epigenetik, für die Deaktivierung im Vordergrund zu stehen.

Diese vorliegende Arbeit soll anhand eines Magdeburger Kollektivs von 154 Patienten zeigen,

- mit welcher Häufigkeit bei sporadischen Karzinomen eine fehlende Proteinexpression von hMLH1 immunhistochemisch nachweisbar ist,
- welche Rolle die Hypermethylierung der Promotorregion von hMLH1 dabei spielt,
- ob eine nachgewiesene Hypermethylierung immer zu einer fehlenden Expression führt,
- welcher Zusammenhang zwischen klinischen und klinisch-pathologischen Parametern und der immunhistochemischen Expression sowie der molekularbiologisch nachgewiesenen Hypermethylierung des Promotors von hMLH1 besteht und
- ob durch die Arbeit mit Microarrays mit vier 0,6mm Stanzen eine validierte Aussage zur hMLH1-Expression möglich ist.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungskollektiv

Für diese Arbeit wurde am Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg ein Kollektiv von 154 Patienten untersucht. Die Präparate stammen von Patienten, die zwischen 1995 und 2005 in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Magdeburg behandelt wurden. Dabei wurden sowohl die Tumoren als auch - soweit vorhanden - das zugehörige Nichttumorgewebe untersucht. Der Nichttumor wurde mindestens 15cm vom Tumor entfernt entnommen. Von 147 Patienten wurde in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet, um Microarrays für die immunhistochemische Untersuchung anzufertigen. Von 63 Fällen wurde aus tiefgefrorenen Gewebeproben DNA präpariert und molekularbiologisch untersucht.

2.2. Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1. DNA-Präparation

An technischen Geräten wurden eine Zentrifuge Centrifuge 5403 und eine Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 der Eppendorf AG, Hamburg, ein Mikroskop Olympus CHK von Olympus Optical Co., Taiwan, ein Thermomixer 5437 der Firma Eppendorf AG, Hamburg, ein IKA Minishaker MS2 (Shaker zum Vortexen) von IKA Works Inc., Wilmington NC, USA, und ein GeneQuant RNA/DNA-Calculator der Firma Pharmacia, Cambridge, England, verwendet. Das Aqua dest. wurde für alle Arbeiten mit dem Millipore Milli-Q UF Plus Wasserreinigungssystem gewonnen (Millipore Corp., Billerica MA, USA). Absolutes Ethanol, Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol, Trihydroxymethylaminomethan (TRIS-base), Na-Acetat 3M, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Natriumchlorid (NaCl) stammen von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe. Außerdem wurden Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Proteinase K von Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, und Dodecylsulfat Na-Salz (SDS) von der Firma SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, bezogen.

Die DNA wurde aus Gewebe präpariert, das bei -80°C gelagert wurde. Mit einem Einwegskalpell wurde ein stecknadelkopfgroßes Stück Gewebe in ein Pipettiergefäß zusammen mit 450µl OLD-T-Puffer, 50µl 10% SDS und 5µl Proteinase K gegeben. Dieser

OLD-T-Puffer wurde vorher aus 0,484g TRIS-base, 0,877g NaCl, 0,931g EDTA und 100ml Aqua dest. hergestellt. Dieser Ansatz wurde gut gevortext und über Nacht in den auf 50°C temperierten Thermomixer gegeben und dabei leicht gerüttelt. Es kam zur Zellyse des Gewebes. Am 2. Tag wurden nach dem Vortexen 505µl Phenol hinzugegeben und das Röhrchen drei Minuten mit der Hand geschüttelt. Danach kam das Pipettierröhrchen für zehn Minuten bei 7.000 U./Min. und 4°C in die Zentrifuge, anschließend wurde die obere Phase langsam mit der Pipette abgesaugt und in ein neues Pipettierröhrchen gegeben. Der Rest konnte verworfen werden. Dieser Vorgang wurde nach der erneuten Zugabe von 505µl Phenol wiederholt (drei Minuten mit der Hand schütteln, zehn Minuten Zentrifugieren mit 7000 U./Min.). Nachdem der Überstand wiederum in ein neues Röhrchen pipettiert wurde, erfolgte die Zugabe von 505µl eines 24:1 Gemisches Chloroform / Isoamylalkohol und erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 7.000 U./Min. und 4°C. Der Überstand wurde in ein 2ml Tube pipettiert und danach konnten 25µl 3M Na-Acetat und 1260µl absolutes Ethanol zugegeben werden. Das Röhrchen wurde nun langsam mit der Hand geschwenkt, bis sich eine deutlich sichtbare DNA-Flocke (hochmolekulare DNA) bildete. Diese konnte mit einem Glasstäbchen aus der Lösung entnommen und um das Stäbchen gewickelt werden. Die restliche Lösung wurde nicht verworfen und später weiterpräpariert. Zuerst gab man aber circa 1ml 70%iges Ethanol über die DNA am Glasstab und danach wurde diese DNA für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Spitze des Glasstabes mit der getrockneten DNA wurde dann in ein neues Pipettierröhrchen mit 400µl DEPC-Wasser gegeben, der Glasstab wurde dabei abgebrochen und die Spitze verblieb im Röhrchen. DEPC-Wasser (100µl DEPC und 1000ml Aqua dest.) ist ein besonderes DNase- und RNase-freies Wasser und wird zur Aufbewahrung der DNA verwendet. Die niedermolekulare DNA, die sich noch im dem Röhrchen befand, aus dem die hochmolekulare DNA-Flocke entnommen wurde, lagerte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag kam dieses Pipettierröhrchen dann für fünf Minuten bei 7000 U./Min. in die Zentrifuge. Nach dem Abgießen des Überstands und nach der Zugabe von 1ml 70%iges Ethanol wurde erneut fünf Minuten bei 7000 U./Min. zentrifugiert, der Überstand konnte wieder abgegossen und das Röhrchen dann für 15 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet werden. Es wurden nun 50µl DEPC-Wasser hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann war auch die niedermolekulare DNA für die weiteren Schritte fertig präpariert.

Diese DNA lag jedoch aufgrund der unterschiedlichen Gewebemengen der jeweiligen Präparate in jedem Röhrchen in einer anderen Konzentration vor. Um gleiche Mengen von

DNA bei den weiteren methodischen Schritten verwendet zu können, wurden jeweils 40µl einer 100ng/µl konzentrierten Lösung hergestellt. Dafür wurde die Konzentration an frisch präparierter DNA mit Hilfe des RNA/DNA-Calculators optisch bestimmt. Es wurden 65 µl und 5µl DNA Lösung in einem Pipettierröhrchen gemischt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag konnte dann die dsDNA Menge in µg/ml (=ng/µl) gemessen werden. Der abgelesen Wert wurde zum Ausgleich der Verdünnung wieder mit 14 multipliziert und nach dem Gleichsatz „100ng : X = gemessener Wert in ng/µl : 1“ der Wert X errechnet. X wurde dann mit 40µl multipliziert, das Ergebnis war die Menge an DNA-Lösung, die in ein neues Pipettierröhrchen gegeben wurde und dann auf 40µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt wurde.

2.2.2. Bisulfidbehandlung der DNA

Für die Bisulfidbehandlung wurde das CpGenome DNA Modifikation Kit der Firma Qbiogene Inc., Irvine CA, USA, verwendet. Neben den darin enthaltenen Reagenzien und der TE-Pufferlösung wurden Natriumhydroxid 99% und Ethanol 99,8% von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 2-Mercaptoethanol von SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, und methylierte Standard-DNA von Qbiogene Inc., Irvine CA, USA, genutzt. An technischen Geräten wurde die bereits beschriebene Eppendorf Centrifuge 5403, der IKA Minishaker MS2 und eine Knick-pH-Einstabmesskette SE100 mit dem pH-Meter 765 Calimatic von Knick Elektrische Messgeräte GmbH & Co., Berlin, verwendet.

Bei der Bisulfidbehandlung von DNA wird die unmethylierte Base Cytosin durch Desaminierung und Sulfonamierung in Uracil umgewandelt. Die methylierte Base 5-Methylcytosin bleibt hingegen unverändert. Daher unterscheidet sich die DNA-Sequenz nach der Behandlung in Abhängigkeit von der Methylierung der DNA. Eine anschließende methylierungsspezifische PCR und eine Elektrophorese zeigen dann, ob eine methylierte DNA vorliegt. Dabei werden zwei verschiedene Primerpärchen für methylierte („M“-Primer) und unmethylierte („U“-Primer) Promotorregionen verwendet, die jeweils nur an die methylierte oder die durch die Bisulfidbehandlung veränderte Promotorregion binden können. Diesen Zusammenhang soll die Abbildung 2.1. anschaulich machen.

Es wurde eine 3M Natriumhydroxidlösung aus 0,5g NaOH und 4,15ml Aqua dest. hergestellt. Für jede Probe wurden 227mg vom Reagenz I in 571µl Aqua dest. gelöst und mit circa 20 µl 3M NaOH-Lösung und mit der Hilfe des pH-Meters auf den pH 5,0 eingestellt. Als

Negativkontrolle erfolgte die Mitbehandlung von präparierter Blut-DNA und als Positivkontrolle von methylierter Standard-DNA von Qbiogene. Die DNA-Modifikation startete mit 10µl DNA (Konzentration 100ng/µl), 2µl vom Reagenz IV, 88µl Aqua dest. und 7µl des 3M NaOH-Lösung, die in ein 2ml Pipettierrohrchen gegeben und gut gevortext wurden. Das Röhrchen kam für 10 Minuten in den 37°C warmen Heizblock. Dadurch denaturierte die DNA. Dann wurden 550µl des gelösten Modifikationsreagenz I hinzugegeben und für 16 Stunden ohne Schütteln inkubiert. In dieser Zeit werden unmethylierte Cytosinbasen sulfoniert und desaminiert. Am nächsten Tag wurden folgende Lösungen hergestellt: 90%iges und 70%iges Ethanol sowie eine 20mM NaOH / 90% Ethanol-Lösung aus 900µl absolutes Ethanol, 93,4µl Aqua dest. und 6,6µl der 3M NaOH-Lösung. Zuerst wurden 20ml DEPC-Wasser und 1µl Mercaptoethanol gemischt. Zu 750µl dieser Mischung wurden dann 1,35g des Reagenz II gegeben und solange geschüttelt, bis sich eine klare Lösung ergab. Nachdem man das Modifikationsreagenz III durch Vortexen resuspendiert, wurden 5µl vom Reagenz III sowie 750µl vom gelösten Reagenz II zur DNA gegeben und kurz gemixt. Im Reagenz III befinden sich kleine Carrierpartikel, an die sich die DNA mit Hilfe des Reagenz II bindet. Nach der zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur konnte der Mix eine Minute bei 7.500 U./min. zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen werden. Nun kamen 1ml 70%iges Ethanol hinzu, danach folgte kurzes Vortexen und Zentrifugieren wie beim letzten Schritt, der Überstand wurde abgegossen und das Spülen mit Ethanol noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit 15.000 U./min. drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. 50µl 20mM NaOH / 90% Ethanol-Lösung wurden hinzugegeben, danach gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt wird die Umwandlung von Cytosin in Uracil durch Desulfonierung abgeschlossen. Nun wurde eine Minute bei 7.500 U./min. zentrifugiert, zum Überstand kamen 1ml 90%iges Ethanol hinzu, das Ganze wurde gevortext und nach erneutem Zentrifugieren konnte der Überstand abgekippt werden. Ein zweites Mal wurde 1ml 90%iger Ethanol zugegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun musste fünf Minuten mit 15.000 U./min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und dann das Pellet 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet werden. Dieses Pellet wurde dann in 50µl TE-Pufferlösung resuspendiert. Nach der Inkubation bei 55°C für 15 Minuten im Thermoblock wurde für drei Minuten mit 15.000 U./min. zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Pipettierrohrchen überführt. Durch die Wärme löste sich die DNA vom Carrier in den TE-Puffer. Im Pipettierrohrchen befand sich nun die bisulfidbehandelte DNA für die PCR.

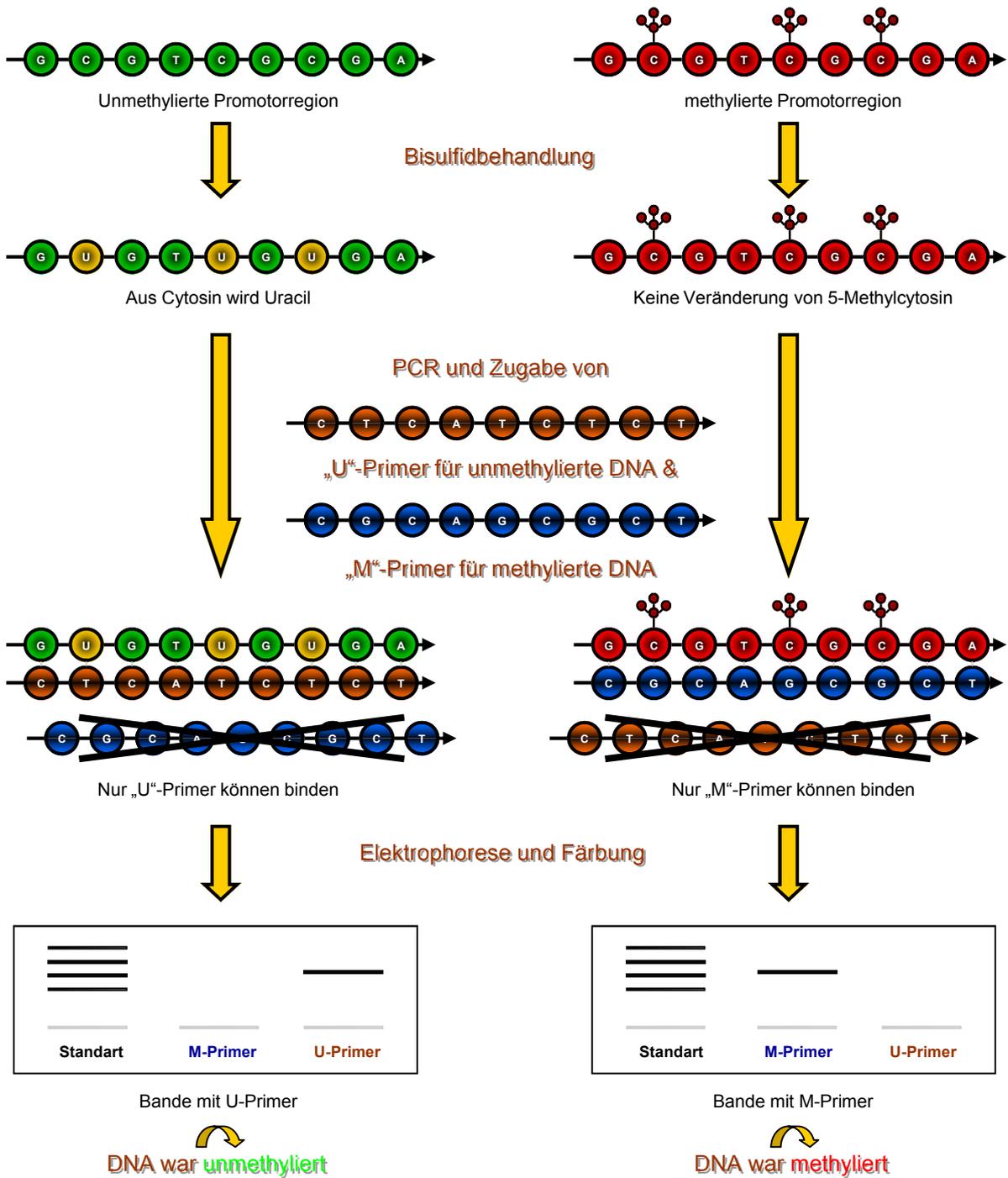


Abbildung 2.1. - Funktionsweise der Bisulfidbehandlung

2.2.3. Methylierungsspezifische PCR

Für die PCR wurden Peltier Thermal Cycler PTC-200 der Firma MJ Research Inc., Watertown MA, USA, und IKA Minishaker MS2 (Vortex) von IKA Works Inc., Wilmington NC, USA, genutzt. Außerdem kamen das HotGoldstar Kit mit DNA-Polymerase (5U/μl), MgCl₂ (25mM), und 10fach Pufferlösung der Firma Eurogentec, Seraing, Belgien, sowie ein DNA Polymerisations Mix (Nucleotide) von Amersham Biosciences, Piscataway NJ, USA, zur Verwendung. Die Primer (Tabelle 2.1.) stammen vom TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin.

Primername	Primertyp	5'→3' Sequenz	Länge der PCR-Produkte
MLH1 F MLH1 R	Unmethyliert, vorwärts Unmethyliert, rückwärts	gAAgAgTggATAgTgATTTTTAATgT ATCTCTTCATCCCTCCCTAAAACA	85 bp
MLH1mF MLH1mR	Methyliert, vorwärts Methyliert, rückwärts	gAAgAgTggATAgTgATTTTTAATgT TCTTCgTCCCTCCCTAAAACg	78 bp

Tabelle 2.1. – Primer für die methylierungsspezifische PCR

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sollte die bisulfidbehandelte DNA nun exponentiell vervielfacht werden, um in der Elektrophorese eine Bandendarstellung zu erreichen, wie sie in Abbildung 2.1. gezeigt wird. Für die PCR wurden folgende Substanzen in ein Pipettierrohrchen gegeben und gut gevortext: 3,5μl der bisulfidbehandelten DNA, 1,5μl MgCl₂, 2,5μl Pufferlösung, jeweils 1,25μl des Primers F und R (entweder „U“-Primer MLH1 F und MLH1 R für unmethylierte DNA oder „M“-Primer MLH1mF und MLH1mR für methylierte DNA), 2,0μl Nucleotide, 0,1μl DNA-Polymerase und 12,9μl Aqua dest. Dieser 25μl Ansatz wurde dann in das PTC-200 gestellt. Das Gerät durchlief automatisch verschiedene Temperaturen in Zyklen, dadurch konnte die Polymerase die DNA vervielfachen. Zuerst startet das Gerät mit zehn Minuten bei 95°C, dadurch wurde die Polymerase aktiviert. Danach kamen 35 Zyklen mit jeweils einer Minute bei 95°C (Denaturierung), danach einer Minute bei 60°C (Annealing) und anschließend zwei Minuten bei 72°C (Extension). Nachdem die Zyklen durchlaufen wurden, folgten nochmals zehn Minuten bei 72°C bevor das System die fertigen PCR-Produkte auf 10°C abkühlt. So wurden von jeder präparierten DNA jeweils eine PCR mit dem „M“- und eine mit dem „U“-Primerpärchen durchgeführt. Diese konnten anschließend auf ein Elektrophoresegel aufgetragen werden.

2.2.4. Elektrophorese und Silberfärbung

Zur Elektrophorese wurde das Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL in Verbindung mit dem Multiphor II und Multitemp III von Pharmacia Biotech, Cambridge, England, verwendet. Außerdem kamen ein Variomag Elektrorührer Mono von H+P Labortechnik GmbH, München, für die Gelherstellung und ein Schwenker „Rocky“ (Hersteller unbekannt) für die Gelfärbung zum Einsatz. Die Chemikalien TEMED p.a., Rotiphorese Gel A, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Isopropanol 98%, Salpetersäure 65%, Silbernitrat 99,9%, Natriumcarbonat 99%, Bromphenolblau Na-Salz und Glycerol 99,5% wurden von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen. Die Ameisensäure 99%, Formalinlösung 37% und Essigsäure 96% wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, erworben. Außerdem wurden Trihydroxymethylaminomethan (TRIS-base), Borsäure, die Sample Application Pieces und die Elektrophoresefolie GEL-FIX PAG der Firma SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, sowie Piperazine Diacrylamide (PDA) von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA, verwendet. Außerdem wurde 0,5M EDTA-Lösung der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, und die DNA Längenstandards VIII von Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, genutzt.

Für die Elektrophorese wurden folgende Lösungen hergestellt:

- 14%iges Acryl-PDA (500ml 30%iges Rotiphorese Gel Acrylamidlösung, 7,45g PDA und 564ml Aqua dest.)
- TRIS-Puffer 120mM (90,75g TRIS-base, 4,47ml 99%ige Ameisensäure und 1000ml Aqua dest)
- 10%ige APS-Lösung (10g Ammoniumperoxodisulfat und 100ml Aqua dest.)
- TBE-Laufpuffer (54g TRIS-base, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA-Lösung, 100µl Bromphenolblau als Farbstoff und 1000ml Aqua dest.)

Für das 9%ige Polyacrylamidgel wurden 25,6ml 14%iges Acryl-PDA, 14,4ml TRIS-Puffer, 400µl 10%iges APS und 40µl TEMED gemischt. Zwei ca. 2mm dicke Glasplatten wurden mit Isopropanol gereinigt und abgetrocknet. Anschließend wurde eine der beiden Platten mit Aqua dest. befeuchtet und ein Stück Elektrophorese GEL-FIX PAG Folie luftblasenarm aufgelegt. Das fertigerührte Gel wurde auf die obere Hälfte einer plan aufliegenden Glasplatte aufgetragen, die zweite Glasplatte konnte an dieser oberen Seite aufgesetzt und langsam heruntergelassen werden, so dass sich das Gel gleichmäßig und blasenfrei verteilte.

Eine der beiden Glasplatten hatte ca. 2mm dicke Abstandhalter im Randbereich, diese sorgten beim Aufeinanderlegen der Platten für die richtige Dicke des Gels. Nach 20 Minuten Wartezeit wurde das Gel über Nacht in den Kühlschrank gelegt.

Das Elektrophoresegel konnte nun in den Multiphor II gelegt werden und es wurden die Applikationsplättchen aufgelegt. 7µl der PCR-Produkte und des Längenstandards VIII wurden auf die Plättchen aufgetragen, die Reihenfolge dabei war: der Längenstandard, dann eine Leerprobe, die ohne DNA in der PCR war, nun die Positiv- und Negativkontrolle und anschließend alternierend jeweils die PCR Produkte einer DNA mit „M“- und „U“-Primern. Dann wurden in den gefärbten TBE-Laufpuffer getränkte Pufferstreifen auf das Gel aufgelegt. Nun startete die Elektrophorese. Zunächst wurden am Power Supply Gerät 5W für 20 Minuten eingestellt, anschließend ging das Gerät automatisch auf 15 Watt Leistung und regelte die Ampere- und Voltzahl selbstständig. Hatte die Lauffront nach ein bis zwei Stunden nahezu das Ende des Gels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel konnte gefärbt werden.

Für die Silberfärbung benötigte man:

- 3%ige Salpetersäure (60ml 65%iger Salpetersäure und 1240ml Aqua dest.)
- 0,2%ige Silbernitratlösung (0,4g Silbernitrat und 200ml Aqua dest.)
- Natriumcarbonat-Formalin-Lösung (0,5ml Formalin, 15g Natriumcarbonat und 1000ml Aqua dest.)
- 10%ige Essigsäure (200ml 96%ige Essigsäure und 1800ml Aqua dest.)
- 5%ige Glycerollösung (25ml Glycerol und 475ml Aqua dest.)

Das Gel wurde aus dem Elektrophoresegerät entnommen und in 3%iger Salpetersäure geschwenkt, bis sich eine gelbe Lauffront zeigte. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest. schwenkte das Gel in 0,2%iger, frisch hergestellter Silbernitratlösung für 20 Minuten. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit Aqua dest. wurde das Gel nun mehrfach mit der Natriumcarbonat-Formalin-Lösung gefärbt, verfärbte sich die Lösung selbst schwarz, wurde sie ersetzt. Zeigte sich eine gute Färbung der Banden auf dem Gel, konnte die Reaktion mit dem Schwenken in 10%iger Essigsäure (zwei Minuten) gestoppt werden. Es wurde erneut dreimalig mit Aqua dest. gespült und anschließend für mindestens 20 Minuten in 5%iger Glycerollösung fixiert. Das Gel wurde abschließend an der Luft getrocknet und ausgewertet.

2.2.5. Mikrosatellitenanalyse

Für die Analyse der Mikrosatelliteninstabilität wurden die gleichen Geräte und Substanzen verwendet, die bereits unter 2.2.3. und 2.2.4. aufgeführt sind. Zusätzlich wird der ABI Prism 310 Genetic Analyzer in Verbindung mit dem Filterset C, den HiDi-Formamiden und dem Matrixstandard GS 500 der Firma Applied Biosystems, Foster City CA, USA, genutzt. Die verwendeten und FAM-markierten Primer des TIB Molbiol Syntheselabors, Berlin, sind in der Tabelle 2.2. dargestellt.

Mikrosatellit	Primername	Sequenz	Annealing-temperatur
1 – BAT25	BAT25-F BAT25-R FAM	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT FAM-TCTGCATTTTAACTATGGCTC	58°C
2 – BAT26	BAT26-F BAT26-R FAM	TGACTACTTTTGACTTCAGCC FAM-AACCATTCAACATTTTAAACCC	58°C
3 – APC	APC-F APC-R FAM	ACTCACTCTAGTGATAAATCG FAM-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	55°C
4 – D17S250	D17S250-F D17S250-R FAM	GGAAGAATCAAATAGACAAT FAM-GCTGGCCATATATATATTTAAACC	52°C
5 – D2S123	D2S123-F D2S123-R FAM	AAACAGGATGCCTGCCTTTA FAM-GGACTTTCCACCTATGGGAC	60°C

Tabelle 2.2. – Primer der Mikrosatelliteninstabilitätsuntersuchung

Mit der präparierten DNA des Tumors und des zugehörigen Nichttumorgewebes wurden je fünf PCRs für die jeweiligen Marker der MSI durchgeführt. Dabei wurden 1µl der DNA, 1,5µl MgCL₂, 2,5µl Pufferlösung, jeweils 1,25µl der beiden Primer eines der fünf Primerpärchen, 2,0µl Nucleotide, 0,1µl DNA Polymerase und 15,4µl Aqua dest. in ein Pipettierröhrchen gegeben und in den PTC200 Automaten gestellt. Nach dem Aktivieren der Polymerase wurden 35 Zyklen mit jeweils einer Minute bei 95°C, danach einer Minute bei der spezifischen Annealingtemperatur der Primer und anschließend zwei Minuten bei 72°C durchlaufen. Mit den fertigen PCR Produkten wurde dann eine Elektrophorese mit 9% VWA-Gel und anschließender Silberfärbung durchgeführt. Das Elektrophoresegel zeigte zwar bei einer positiven Mikrosatelliteninstabilität bereits die neu aufgetretenen Banden, diente aber primär zur Kontrolle der PCR und zum Abschätzen der DNA-Menge. Danach wurde 1µl des PCR Produktes mit 6µl DEPC-Wasser verdünnt, um ein optimales Ergebnis bei der

Fragmentanalyse zu erhalten. 1µl dieses 1:6 verdünnten PCR Produktes wurde dann mit 0,5µl des Matrixstandard GS 500 und 20µl HiDi-Formamide als Probenansatz für die weitere Analyse gemischt.

Nun folgte die eigentliche Analyse im ABI Prism 310 Analysegerät, das eine höhere Sensitivität als die klassische Gel-Elektrophorese bietet. Das Gerät arbeitete vollautomatisch, es wurde lediglich die verdünnte DNA in luftdichte Spezialtubes gegeben, die dann mit Hilfe eines speziellen Probenhalter in das Gerät gestellt werden konnten. Das Fragmentlängenpolymorphismusanalysegerät führte dann vollautomatische Elektrophoresen mit den Proben durch. Mit einem Laserdetektionssystem wurde dabei die Menge an FAM-markierter DNA bestimmt, die während der Elektrophorese die Kapillare zu einem bestimmten Zeitpunkt durchwandert. Das zugehörige Computerprogramm gibt das Ergebnis dann grafisch aus. Die Primer waren 6-FAM-markiert und stellten daher die DNA-Fragmente blau dar, der GS 500 Matrixstandard war mit TAMRA markiert und damit in der Auswertung rot. Dadurch konnten die Fragmente des Nichttumors und des Tumorgewebes verglichen werden. Abbildung 2.2. zeigt eine solche grafische Darstellung, wobei im ersten Fall ein stabiler Mikrosatellit, im zweiten Fall hingegen eine positive Mikrosatelliteninstabilität mit dem Auftreten neuer Banden vorliegt.

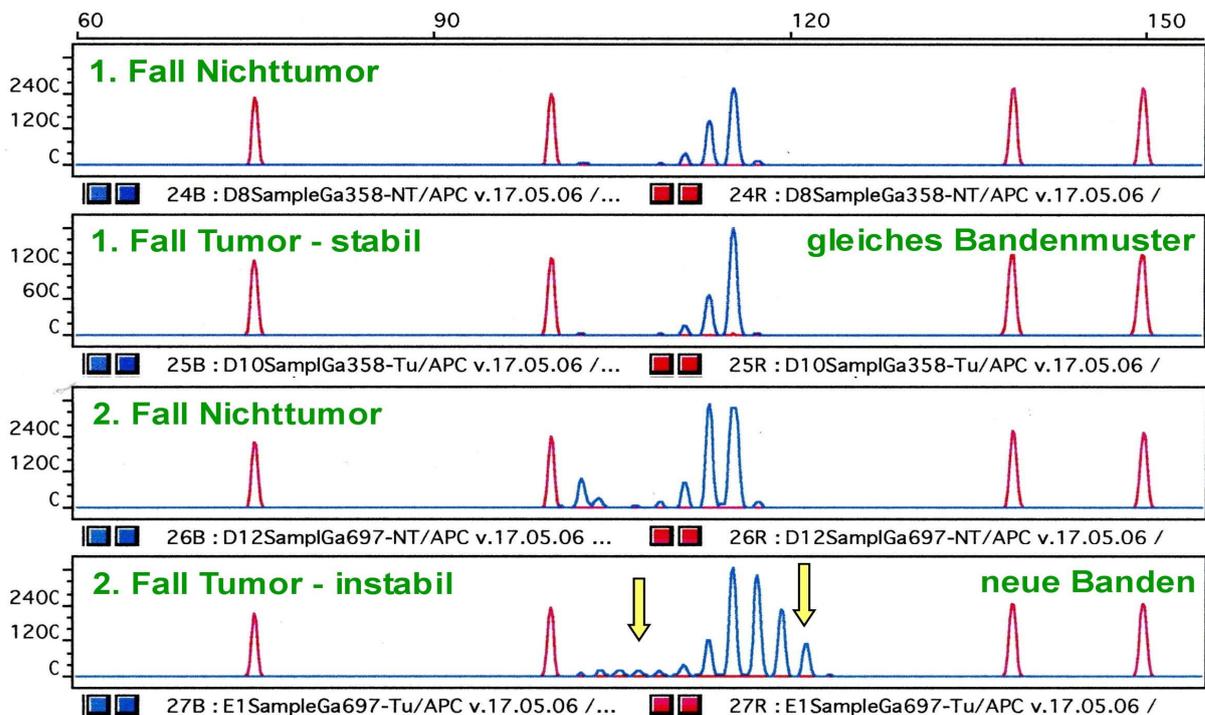


Abbildung 2.2. – Darstellung einer Fragmentlängenpolymorphismusanalyse

2.3. Immunhistochemie

2.3.1. Herstellung der Tissue Microarrays und der Paraffinschnitte

Für die Immunhistochemische Färbung wurden Tissue Microarrays angefertigt. Dazu wurde die Manual Tissue Arrayer - Stanzvorrichtung in Verbindung mit dem Automaten MTA Booster und einer 0,6mm Stanze der Firma Alphelys, Plaisir, Frankreich, verwendet. Zur Anfertigung der Paraffinschnitte wurde ein Mikrotom RM 2145 der Firma Leica Instruments GmbH, Nussloch, genutzt. Als Objektträger dienten SuperFrost Plus von Menzel-Gläser, Braunschweig. Es wurde ein Leerblock Paraffin genommen und in die Stanzvorrichtung eingelegt. Nachdem mit der ersten Stanze in diesen Block ein Loch eingepresst wurde, konnte mit einer zweiten Stanze aus dem Gewebeblock des zu untersuchenden Materials eine Gewebeprobe mit 0,6mm Durchmesser entnommen und anschließend in das Loch des Arrayparaffinblockes eingefügt werden. So wurden in acht Blöcke jeweils vier Proben Tumor- bzw. Nichttumorgewebe eingefügt. Die zu entnehmenden Bereiche wurden wie bei der DNA-Präparation vorher aus einem HE-Schnitt markiert. Zur Orientierung auf dem Block diente oben rechts eingefügtes Plazentagewebe und ein danebenliegender Freiraum. Mit dem Mikrotom wurden dann 3µm dicke Schnitte angefertigt. Jeder Array hatte bis zu zehn Zeilen mit jeweils bis zu 15 Gewebestanden, also maximal 148 Gewebeproben pro Microarray. Die Abbildung 2.3. zeigt die vier Stanzen eines Nichttumors mit dem zugehörigen Originalpräparat und dem fertigen Tissue Microarray.

2.3.2. Immunhistochemische Färbung des hMLH1

Für die Färbung wurde der Automat NexES-IHC und das iView DAB Detection System der Ventana Medical Systems GmbH, Illkirch, Frankreich, sowie eine handelsübliche Mikrowelle genutzt. Die Chemikalien Haematoxylium cryst, Citronensäure und Tri-Natriumcitrat-Dihydrat wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, bezogen. Den Neutralbalsam stellt die Firma Dr. Hollborn & Söhne, Leipzig, her, Xylol und Ethanol 99,8% die Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe. Die Antibody Diluent und die Tris-Pufferlösung stammen ebenfalls von Ventana Medical Systems GmbH, Illkirch, Frankreich. Als Antikörper wurde Mouse Anti-MLH1, Klon G168-15 der Firma Zymed Laboratories, San Fransisco CA, USA, verwendet.

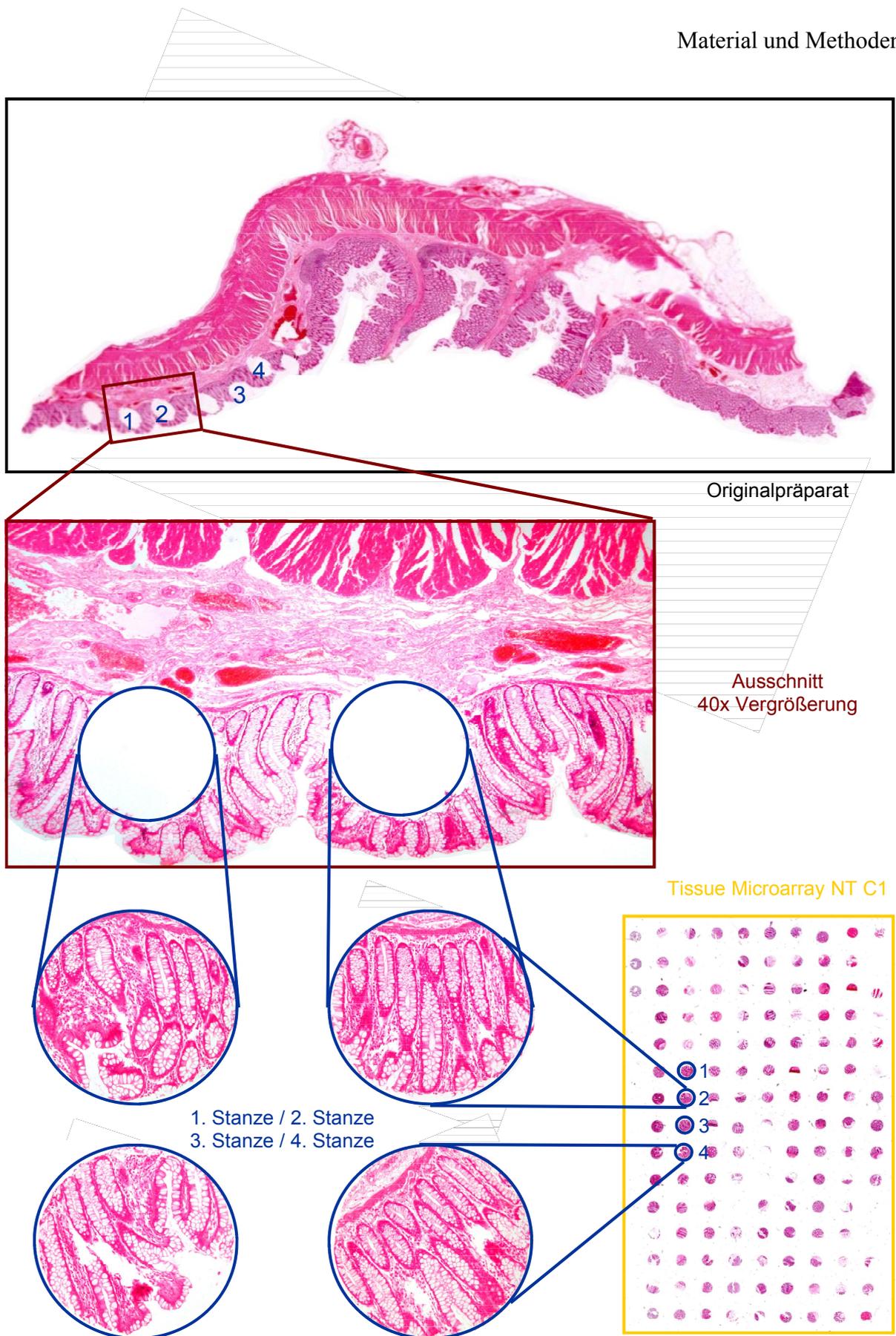


Abbildung 2.3. – Gewebestanden des Nichttumors Nr. 104 mit dem zugehörigen Gesamtpräparat und dem fertigen Tissue Microarray (HE-Färbung, Objektträgerscan, 40x und 100x Vergrößerung)

Die 0,01M NaCitrat pH 6.0 Lösung wurde aus 25ml 0,1M Citronensäure, 75ml einer 0,1M Na-Citrat x2H₂O Lösung und 900 ml Aqua dest. hergestellt. Für die 0,1M Na-Citrat x2H₂O Lösung wurden vorher 29,4g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat und 1L Aqua dest. gemischt. Der 3µm dicke Tissue Microarrayschnitt wurde dreimal je fünf Minuten in Xylol getaucht und so entparaffiniert. Anschließend wurde der Objektträger in einer absteigende Reihe Ethanol mit 100%, 96% und 75% rehydriert. Danach erfolgte das Spülen des Schnittes unter fließendem Leitungswasser und mit Aqua dest.

Zur Vorbereitung der Färbung wurde der Paraffinschnitt mit der 0,01M NaCitrat pH 6.0 Pufferlösung bei 600W in der Mikrowelle 30 Minuten gekocht und danach 10 Minuten abgekühlt, was zur Demaskierung der Antigene führte. Nach einem erneuten Abspülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurde der Objektträger in Tris-Pufferlösung gelegt. Danach wurden 100µl des mit Antibody Diluent Lösung auf 1:20 verdünnten Antikörpers auf das Präparat gegeben und der Schnitt bei 4°C über Nacht zum Inkubieren in einer feuchten Kammer in den Kühlschrank gelegt. Am nächsten Tag wurde das Präparat dann in den NexES Automaten gegeben, der mit dem iView DAB Detektionssystem das Präparat vollautomatisch entsprechend seines Färbeprotokolls färbte. Dabei wurde ein Biotin-Streptavidin-System mit Diaminobenzidine-Tetrahydrochloride als Farbstoff genutzt. Bei einem positiven Nachweis des hMLH1-Genproduktes entstand eine Braunfärbung. Nachdem der Schnitt im Automaten gefärbt wurde, erfolgte das erneute Spülen mit fließendem Wasser und Aqua dest. Danach erfolgte die Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Farbstoff Haematoxylium). Anschließend musste man den Schnitt im Leitungswasser bläuen. Abschließend folgte eine aufsteigende Ethanolreihe (75%, 96%, 100%) und Xylol zur Dehydrierung und das Eindecken mit Neutralbalsam.

2.4. Auswertung

Die Auswertung der DNA-Methylierung erfolgte anhand der Elektrophoresegele der methylierungsspezifischen PCR. Diese wurde mit den Primern für methylierte und unmethylierte Promotorregionen durchgeführt. Dabei wurden die Banden der PCR-Produkte anhand des Längenstandards aufgesucht und beurteilt. War der Tumor methyliert, wurde eine „1“ vergeben, war er unmethyliert eine „0“. Die morphologische Auswertung der Immunhistochemie erfolgte mit einem Olympus BH-2 Mikroskop von Olympus Optical Co., Taiwan, in 20-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Es wurden jeweils die vier Tumor-

und vier Nichttumorstanzen getrennt bewertet. Bewertet wurde die nukleare Expression des hMLH1-Proteins im Tumorepithel bzw. im Epithel der normalen Kolonmukosa. War keiner der Schnitte positiv, wurde eine „0“ vergeben. War in mindestens einer der Stanzen eine eindeutige Färbung des gesamten Kernes oder von Pigmenten im Kernbereich mehrerer Tumor- oder Mucosaepithelzellen erkennbar, wurde eine „1“ vergeben. Eine Unterscheidung in verschiedene Intensitätsgruppen wurde nicht getroffen, da insbesondere im Bereich der tiefen Krypten der normalen Mucosa eine stärkere Färbung auftritt und sich schon aus der Schnittebene Unterschiede in der Färbung ergeben können.

2.5. Statistische Datenverarbeitung

Die Daten wurden auf der Grundlage des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson, des t-Tests und des exakten Tests nach Fischer statistisch ausgewertet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird ein signifikanter Unterschied angenommen. Bei der Datenbearbeitung und der statistischen Analyse kamen die Software Microsoft Office Excel 2003 SP2 und SPSS Statistik Software Systems Version 12.0 zum Einsatz.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Untersuchungskollektives

Das Gesamtkollektiv umfasste 154 Patienten. Die Altersspanne zum Operationszeitpunkt lag zwischen 41 bis 97 Jahre mit einem Mittelwert von $71,7 \pm 11,1$ Jahren. Dabei handelte es sich um 83 Männer (53,9%) und 71 Frauen (46,1%). Bei den Männern lag der Altersdurchschnitt bei $71,3 \pm 10,4$ Jahren (Altersspanne 50-96 Jahre), bei den Frauen war das durchschnittliche Alter $72,2 \pm 12,0$ Jahre (Altersspanne 41-97 Jahre). Die Abbildung 3.1. zeigt die Verteilung in Altersgruppen von je zehn Jahren an.

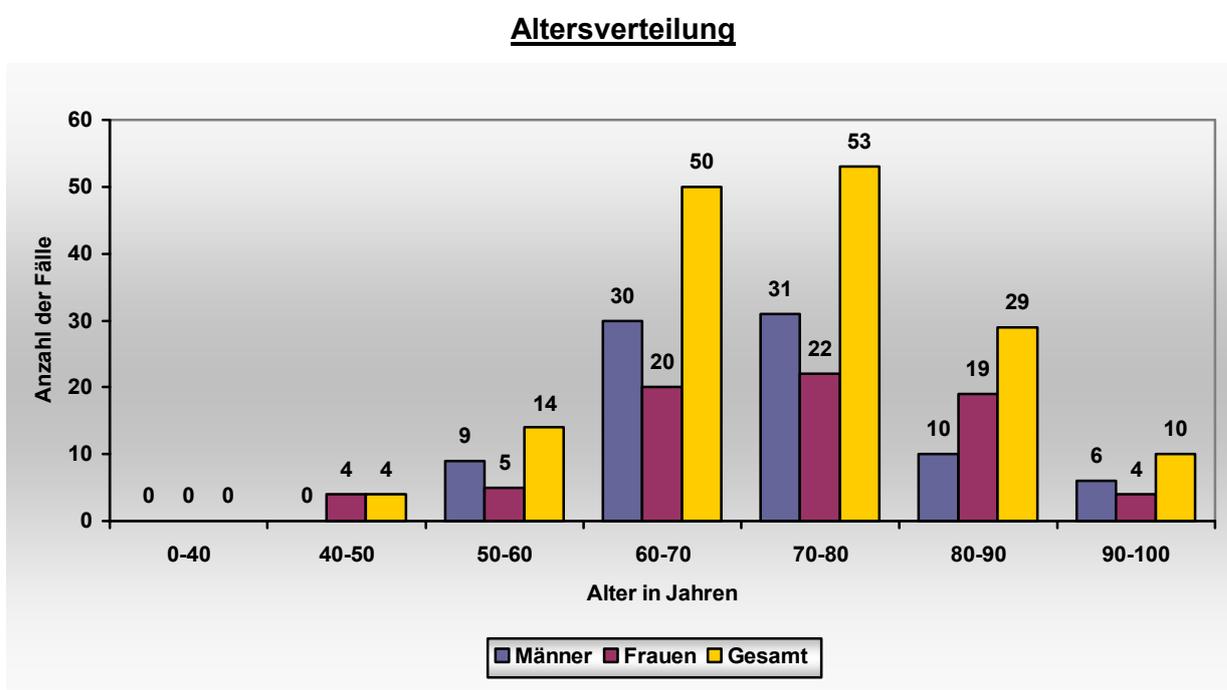
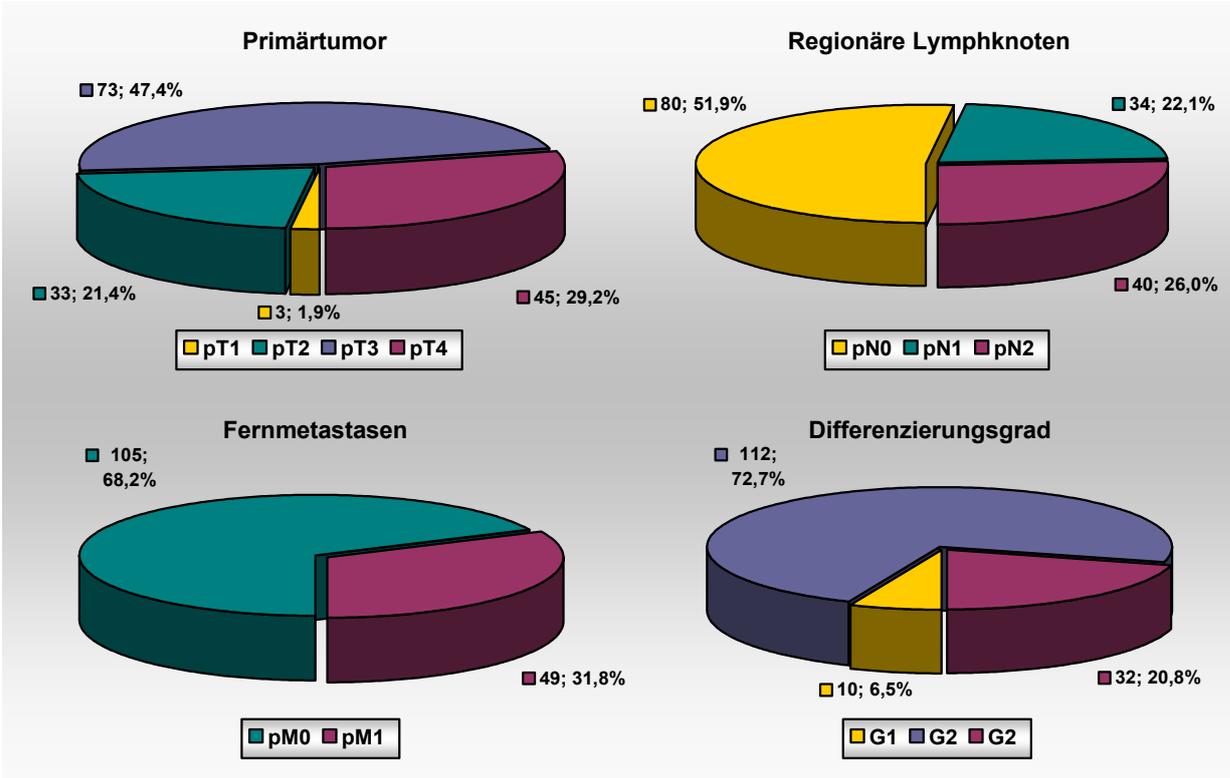


Abbildung 3.1. – Altersverteilung des Patientenkollektives

Nach der in der Tabelle 2.1. der Anlage 1 dargestellten postoperativen histopathologischen pTNM-Klassifikation und Stadiengruppierung der UICC konnten der Tumorkategorie pT1 drei Fälle (1,9%), pT2 33 Fälle (21,4%), pT3 73 Fälle (47,4%) und pT4 45 Fälle (29,9%) zugeordnet werden. Beim Lymphknotenstatus hatten 80 Patienten keine regionären Lymphknotenmetastasen (51,9%, pN0), 34 Patienten gehörten zu der Kategorie pN1 (22,1%) und weitere 40 Patienten bereits zur Kategorie pN2 (24,7%). Während 105 Patienten keine Fernmetastasen hatten (68,2%, pM0), konnten diese bereits bei 49 Patienten nachgewiesen

werden (31,8%, pM1). Somit können dem Tumorstadium I 27 Fälle (17,5%), dem Stadium IIA 30 Fälle (19,5%) und dem Stadium IIB 13 Fälle (8,4%) zugeordnet werden. Im Stadium IIIA befanden sich drei Fälle (1,9%), im Stadium IIIB waren 15 Fälle (11,0%) und im Stadium IIIC gab es 17 Fälle (11,0%). 49 Patienten befanden sich bereits im Stadium IV (31,8%).

Postoperative histopathologische Tumorklassifikation nach UICC und histopathologisches Grading



Stadieneinteilung nach UICC-Kriterien

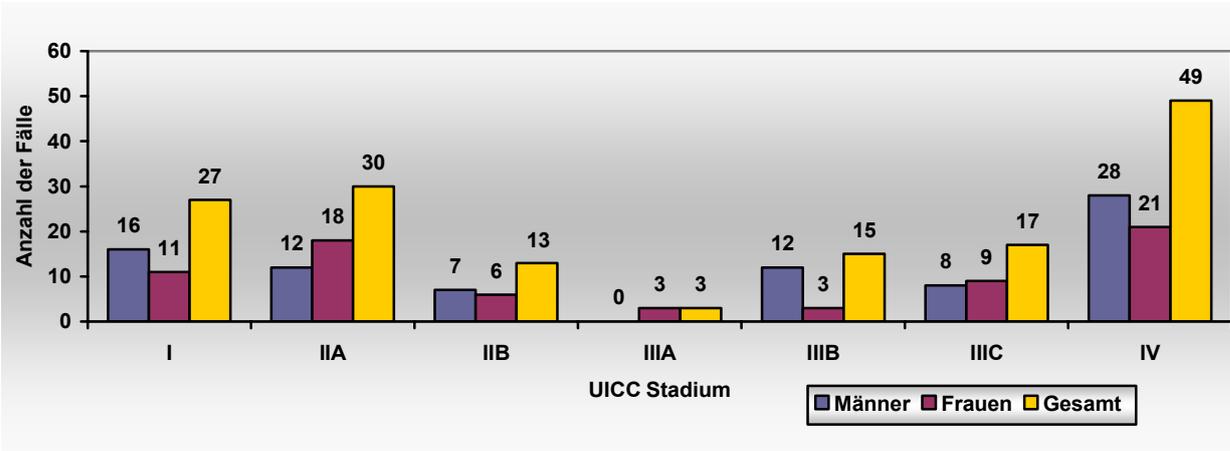


Abbildung 3.2. – TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung

Beim histopathologischen Grading der Tumoren handelte es sich bei zehn Fällen um ein gut differenziertes G1-Karzinom (6,5%), einen mäßig differenzierten G2-Tumor hatten 112 Fälle (72,7%) und in 32 Fällen wurde ein undifferenziertes G3-Karzinom (20,8%) diagnostiziert. Weder bei der TNM-Klassifikation noch beim Grading wurden geschlechtsspezifische Signifikanzen festgestellt. Die Abbildung 3.2. zeigt diese Ergebnisse (Anzahl; Prozente) nochmals als Diagramm, die Stadienaufteilung ist zusätzlich noch nach Geschlechtern getrennt dargestellt.

Zur Beschreibung der Lokalisation des Primärtumors wurden die Zahlen 1 bis 9 für die Lokalisationen entsprechend der in der Einleitung beschriebenen WHO-Empfehlung vergeben. Zur genaueren Beschreibung wurden zusätzlich die Zahlen 10 bis 13 für besondere Lokalisationen vergeben. Abbildung 3.3. zeigt eine Skizze des Darmtraktes mit der zugehörigen Einteilung des Kolorektums. Die Abschnitte 1 bis 5 und 10, die im Bereich bis zur linken Kolonflexur liegen, wurden dem proximalen Kolon, die Abschnitte 6 bis 9 sowie 12 und 13 dem distalen Kolonrektum und Analbereich zugeordnet. Karzinome der Appendix vermiformis wurden nicht untersucht.

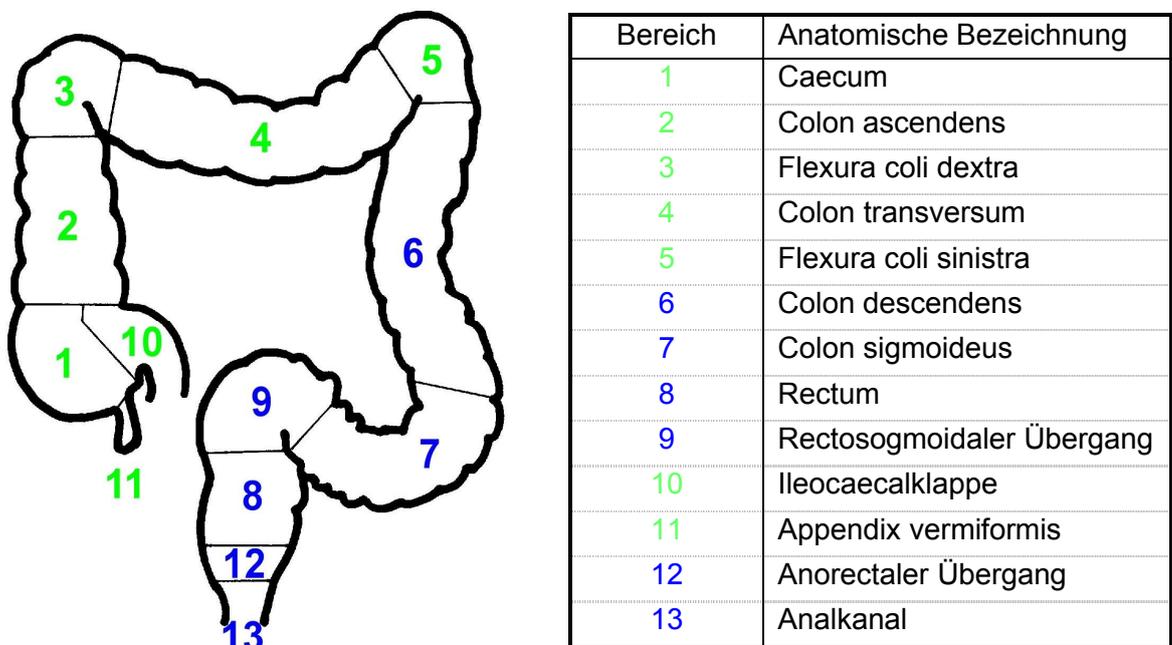


Abbildung 3.3. – Regionen des Kolorektums

Bei 58 Patienten (37,7%) lag der Primärtumor im proximalen Kolon, in 96 Fällen (62,3%) im distalen Bereich. Bei den Männern wurden 28 proximale (33,7%) und 55 distale Tumoren (66,3%) gefunden, während bei den Frauen 30 Karzinome proximal (42,3%) und 41 distal (57,7%) der linken Kolonflexur gefunden wurden. Die genaue Verteilung zeigt die Abbildung 3.4. Obwohl bei den Frauen im Vergleich zu den Männern mehr proximale Karzinome gefunden wurden, handelt es sich dabei jedoch nicht um eine signifikante Häufung ($p=0,277$).

Lokalisation des Primärtumors

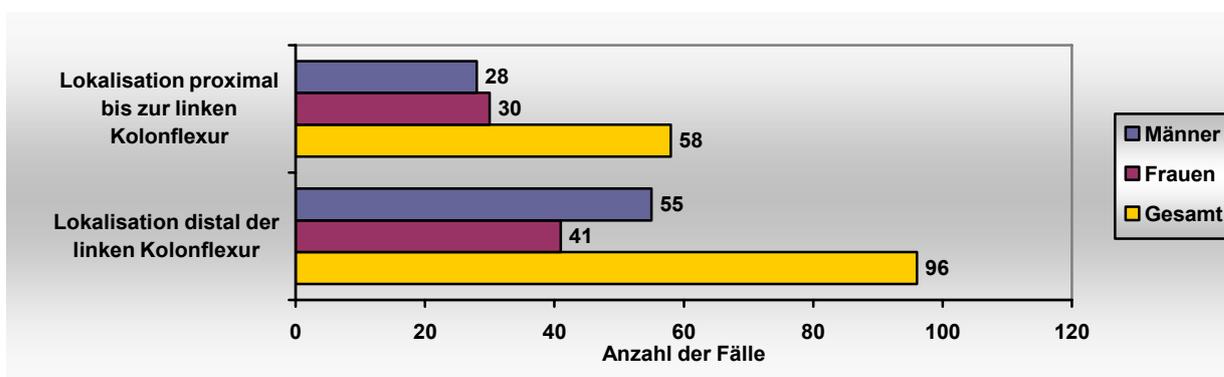
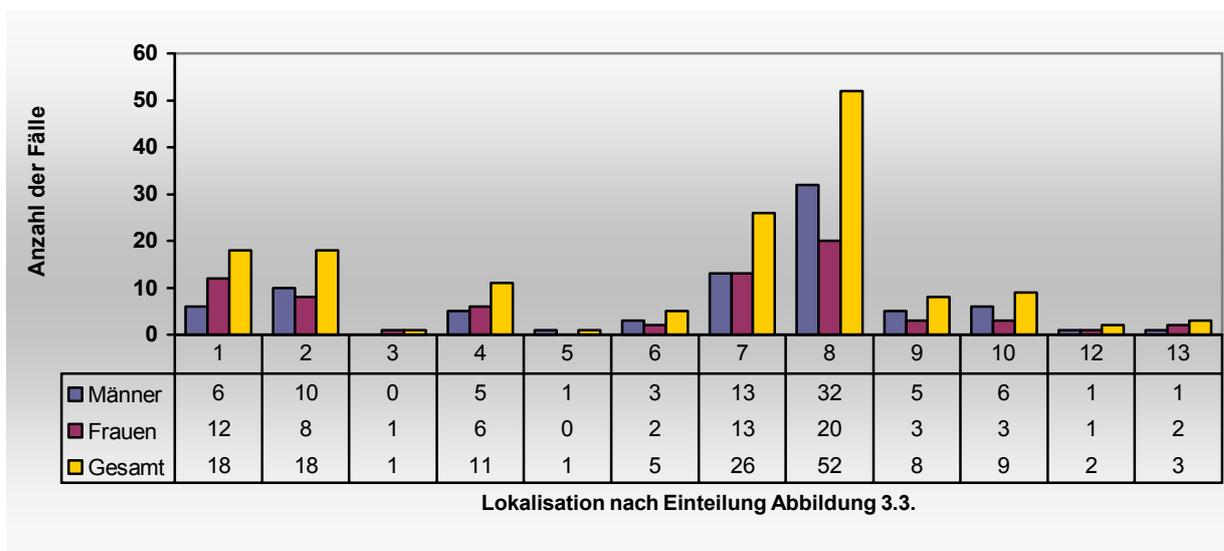


Abbildung 3.4. – Lokalisation des kolorektalen Karzinoms

3.2. Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.1. Promotormethylierung von hMLH1

Insgesamt wurde die DNA von 63 Patienten molekularbiologisch auf eine Methylierung der Promotorregion des hMLH1-Gens untersucht. In sechs Fällen (9,5%) konnte diese Methylierung nachgewiesen werden, diese Fälle wurden hier der Gruppe hMLH1meth zugeordnet. 57 Patienten (90,5%) hatten einen unmethylierten Promotor und bilden die Gruppe hMLH1unmeth. Die Abbildung 3.6. zeigt beispielhaft ein mit Silbernitrat gefärbtes Elektrophoresegel dieser Untersuchungen mit positivem Methylierungsnachweis.

Bei der pTNM-Klassifikation der sechs positiven Fälle wurden die Kategorien pT2, pT3 und pT4 bei jeweils zwei Fällen gefunden (je 33,3%). Beim Lymphknotenstatus gab es in drei Fällen (50%) keine regionären Lymphknotenmetastasen (pN0), pN1 wurde in einem Fall (16,7%) und pN2 in den restlichen zwei der sechs Fälle (33,3%) vergeben. Drei der Patienten besaßen bereits Fernmetastasen (pM1, 50%). Beim Grading wurden vier mäßig differenzierte G2 und zwei schlecht differenzierte G3 Karzinome diagnostiziert. Bei der Einteilung in die UICC-Stadien waren zwei Patienten im Stadium I (33,3%), ein weiterer im Stadium II (16,7%) und drei Patienten befanden sich bereits im Stadium IV (50,0%). Bei der TNM-Klassifikation, dem Grading und dem Staging bestanden keine signifikanten Unterschiede der hMLH1meth-Gruppe zur hMLH1unmeth-Gruppe.

pTNM nach UICC-Kriterien und Grading

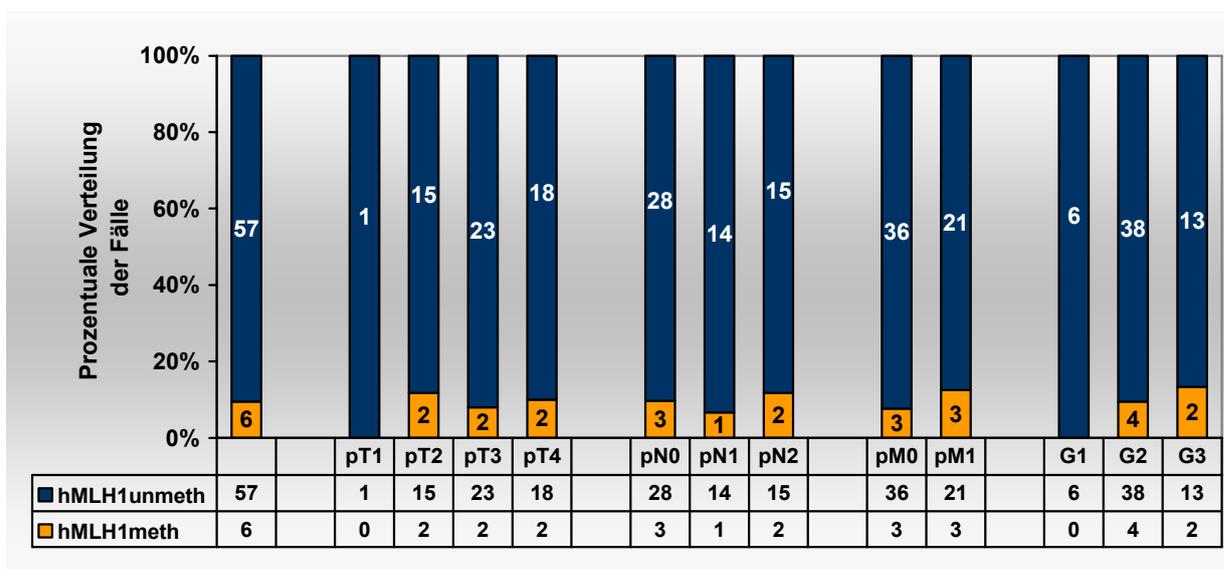


Abbildung 3.5. – pTNM-Klassifikation und Grading des molekularbiologischen Kollektives

Bei der Lokalisation lagen vier Fälle im proximalen Kolon (66,7%) und zwei Fälle distal der linken Kolonflexur (33,3%). Bei der hMLH1unmeth-Gruppe war das Karzinom hingegen nur in 24 Fällen proximal (42,1%) und in 33 Fällen (57,9%) distal der linken Flexur entstanden. Der Anteil der proximalen Tumoren in der hMLH1meth-Gruppe ist somit größer, jedoch ebenfalls nicht signifikant ($p=0,249$).

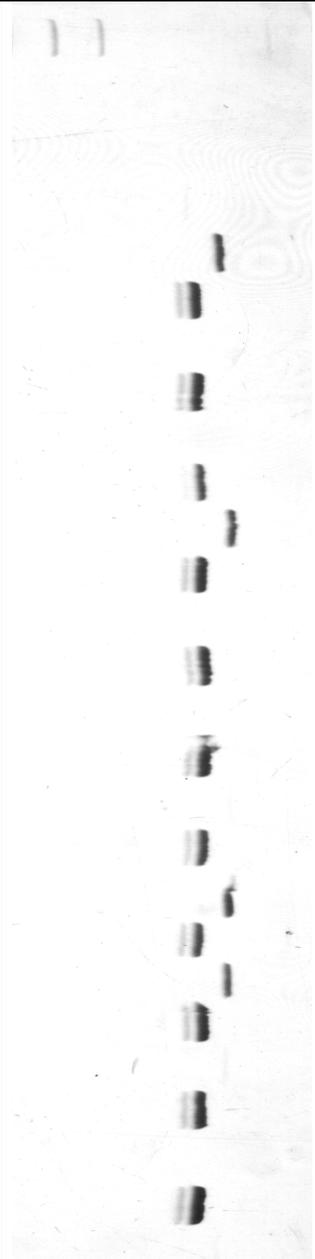
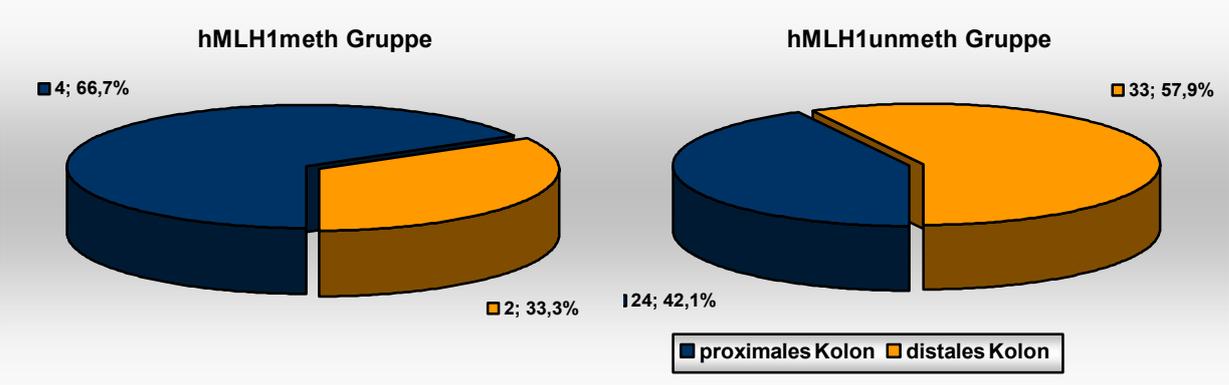
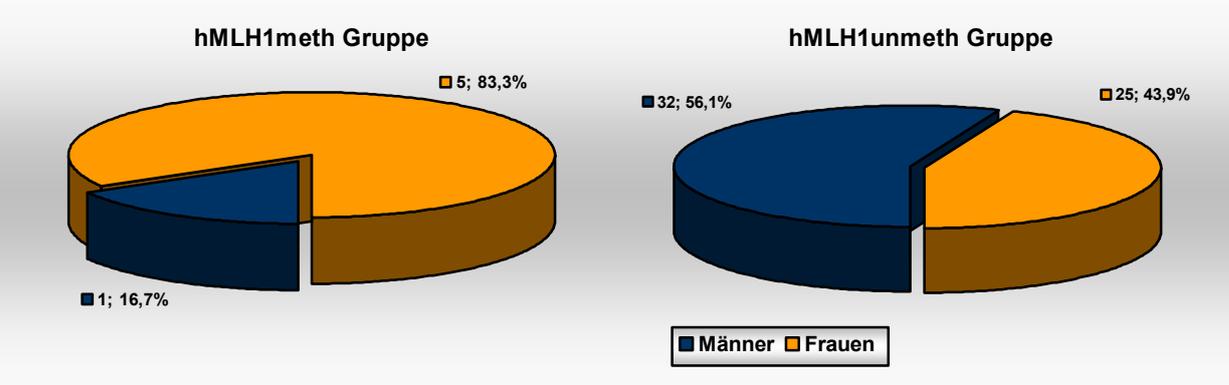
PCR-Material	Elektrophoresegel	Methylierungsstatus
Längenstandard		
Leerwert hMLH1unmeth		
Leerwert hMLH1meth		
Methylierter Standard hMLH1unmeth		Methyliert
Methylierter Standard hMLH1meth		Methyliert
Negativkontrolle (Blut) hMLH1unmeth		Unmethyliert
Negativkontrolle (Blut) hMLH1meth		Unmethyliert
Ga368 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga405 hMLH1unmeth		Methyliert
hMLH1meth		Methyliert
Ga522 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga538 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga558 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga697 hMLH1unmeth		Methyliert
hMLH1meth		Methyliert
Ga704 hMLH1unmeth		Methyliert
hMLH1meth		Methyliert
Ga732 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga760 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert
Ga779 hMLH1unmeth		Unmethyliert
hMLH1meth		Unmethyliert

Abbildung 3.6. – Elektrophoresegel mit Auswertung

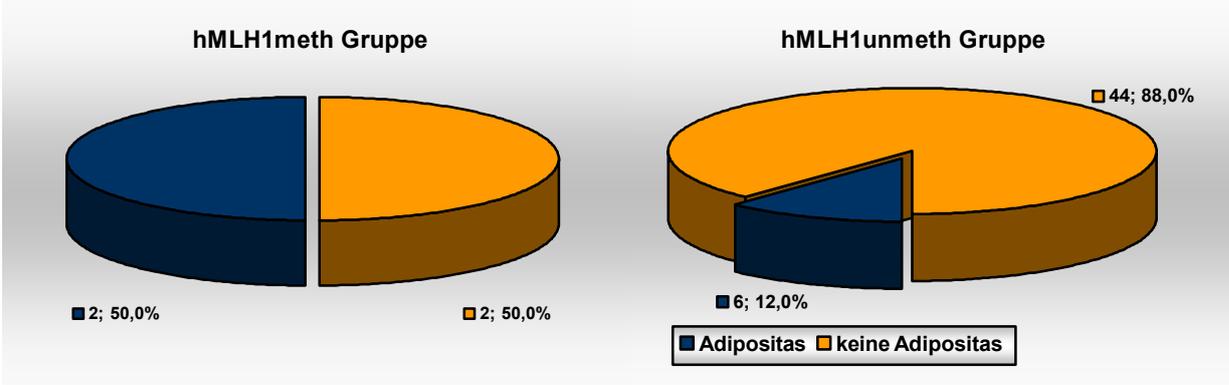
Lokalisation



Geschlechtsverteilung



Adipositas



Altersverteilung

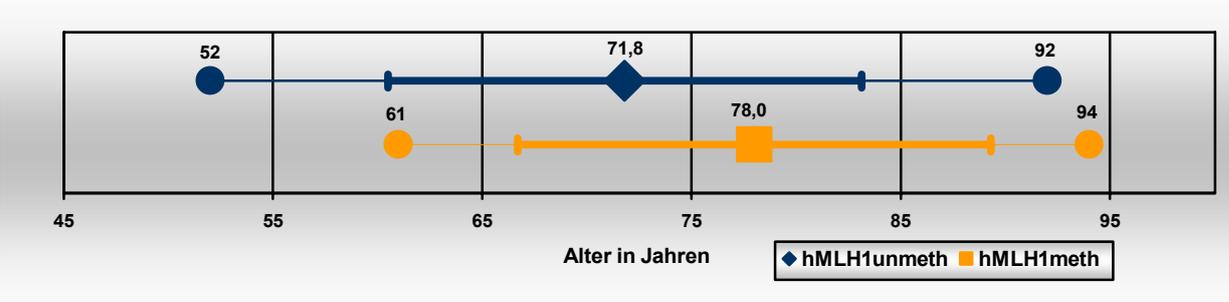


Abbildung 3.7. – Lokalisation, Geschlechtsverteilung, Adipositas und Altersverteilung (Minimum, Mittelwert mit Standardabweichung, Maximum) der hMLH1-Gruppen

Bei der Untersuchung der Geschlechtsverteilung wurde herausgefunden, dass sich in der hMLH1meth-Gruppe lediglich ein Mann (16,7%) befindet, bei den anderen fünf Fällen handelt es sich um Frauen (83,3%). Vergleichend mit der doch eher ausgeglichenen Geschlechtsverteilung der Gruppe hMLH1unmeth, in der sich 32 Männer (56,1%) und 25 Frauen (43,9%) befinden, zeigt sich hier eine starke Tendenz, dass Frauen stärker von der Methylierung des hMLH1 betroffen sind als Männer ($p=0,066$).

Genauso zeigt sich die sehr starke Tendenz, dass eine solche Methylierung eher bei älteren Patienten gefunden werden kann. Während das Durchschnittsalter der sechs positiven Fälle bei $78,0 \pm 11,3$ Jahren mit einem Altersbereich von 61 bis 94 Jahren lag, sind es in der Vergleichsgruppe hMLH1unmeth $71,8 \pm 11,3$ Jahre mit einem Altersbereich von 52 bis 92 Jahren. Das Durchschnittsalter lag demnach bei den Patienten mit methyliertem hMLH1 um 6,2 Jahre höher ($p=0,056$).

In den anamnestischen Daten zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Adipositas. Von 54 vorhandenen Patientendaten wurden vier Patienten der Gruppe der hMLH1meth zugeordnet, von diesen wurde bei zwei Patienten eine Adipositas dokumentiert (50%). Von den restlichen 50 Fällen wiesen nur sechs (12,0%) eine Adipositas auf, während 48 Patienten (88,0%) nicht an starkem Übergewicht litten. Somit ist positive Adipositas mit der Methylierung von hMLH1 korreliert ($p=0,040$). Ein solcher signifikanter Unterschied zeigte sich beim Nikotinabusus nicht, jedoch sind nach den vorliegenden Daten lediglich fünf der 54 Patienten (9,3%) Raucher gewesen.

3.2.2. Untersuchungen der Mikrosatelliteninstabilität

Da es durch die Methylierung der Promotorregion von hMLH1 in einer Vielzahl der Fälle zu einem Ausfall des Mismatch-Reparaturmechanismus kommt, wurden die sechs positiven Fälle auf Mikrosatelliteninstabilität überprüft. In vier der sechs Fälle wurde eine positive Mikrosatelliteninstabilität in allen fünf MSI-Markern gefunden (66,7%, MSI-H), bei zwei Fällen waren alle fünf Marker Mikrosatellitenstabil (33,3%, MSS). Das Ergebnis ist in der Tabelle 3.1. dargestellt. Aufgrund der geringen Zahl von sechs Fällen ist eine statistische Analyse nicht erlaubt und daher nicht durchgeführt worden.

Interessanterweise liegen alle vier MSS-Tumoren im proximalen Kolon (einmal Caecum, zweimal Kolon ascendens, einmal Kolon transversum), während die beiden MSI-H-Tumoren weit im distalen Kolon (je ein Fall im Sigmoid und Rektum) lokalisiert waren. Bei der Tumorgroße waren beide MSS-Fälle pT3 klassifiziert, bei den MSS-Fällen gab es je zwei pT2 und pT4 Tumoren. Bei den Lymphknotenmetastasen waren beide MSS-Fälle wiederum zusammen in die Gruppe pN2 eingeordnet, während die MSI-H-Fälle dreimal pN0 und einmal pN1 zugeordnet wurden. Außerdem haben beide MSS-Fälle Fernmetastasen (pM1), während bei den vier MSI-H-Fällen nur einmal eine Fernmetastase gefunden wurde. Die Ergebnisse sind nochmals in den Abbildungen 3.8. und 3.9. dargestellt.

Fallnummer	MSI-Marker					MSI Bewertung
	APC	BAT25	BAT26	D17S250	D2S123	
22	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
25	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
30	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
34	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
67	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
87	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv

Tabelle 3.1. – Ergebnis der Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilitätsmarker

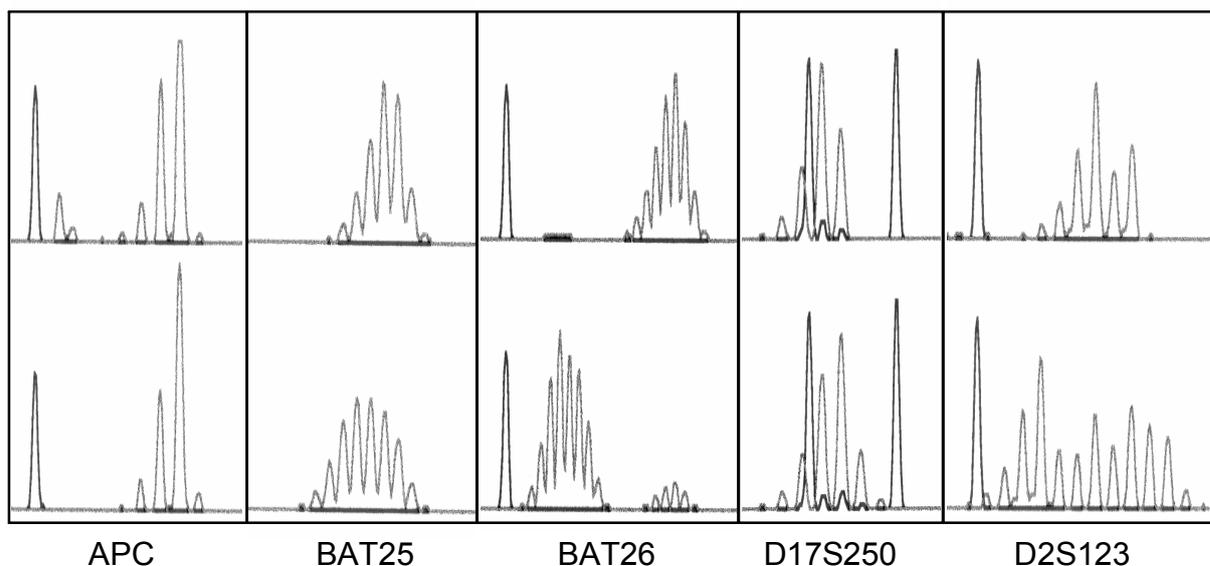


Abbildung 3.8. – MSI-H, Fallnummer 30, Mikrosatelliteninstabilität bei allen fünf MSI-Markern

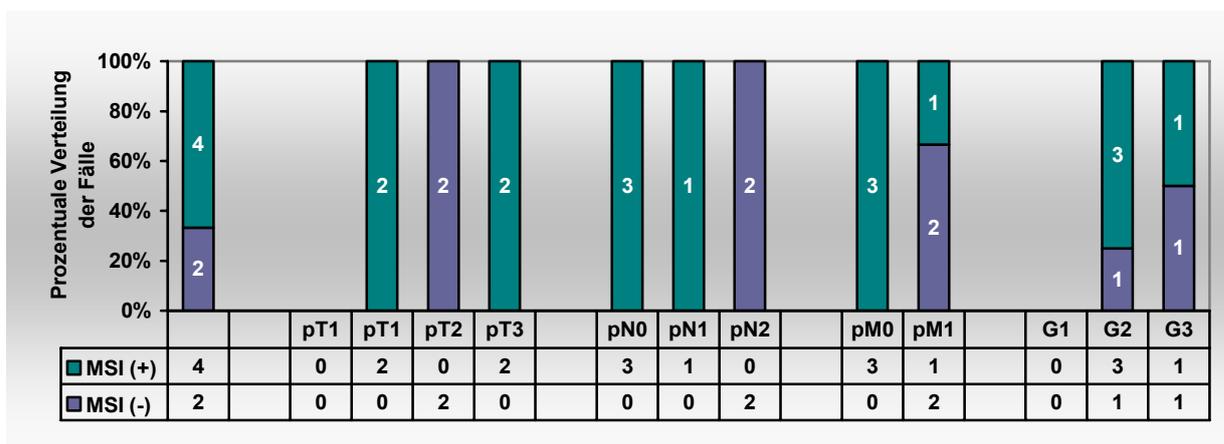
MSI – pTNM nach UICC-Kriterien und Grading

Abbildung 3.9. – pTNM-Klassifikation und Grading des MSI-Kollektives

3.3. Immunhistochemische Untersuchungen**3.3.1. Expression von hMLH1**

Von 147 Patienten wurde Tumorgewebe immunhistochemisch in Form von Tissue Microarrays gefärbt, 143 Fälle davon waren auswertbar, bei 118 Patienten gab es auch Nichttumorgewebe, das ebenfalls immunhistochemisch ausgewertet werden konnte (82,5%). Bei den Nichttumorgeweben konnte in 100% der Fälle eine positive Expression von hMLH1 in den Epithelzellen der kolonrektalen Mukosa immunhistochemisch nachgewiesen werden. Nachdem bei der Auswertung der Microarrays bei fünf Fällen zunächst keine positiv gefärbten Zellkerne gefunden werden konnten, wurde von diesen fünf Präparaten nachträglich jeweils ein kompletter Schnitt des Originalparaffinblockes gefärbt. Auf diesen fünf Präparaten konnte dann im Kryptengrund eine positive Expression belegt werden. Bei dem Tumorgewebe wurde eine Expression von hMLH1 in 118 der 143 Fälle dokumentiert. Bei 25 Fällen war keine Aktivität von hMLH1 nachweisbar. Da nur bei 23 dieser 25 Patienten auch Nichttumorgewebe vorhanden war, wurden zwei Präparate statistisch nicht gewertet. Bei 23 Patienten war somit eine hMLH1-Aktivität im Nichttumorgewebe vorhanden, die im Tumor selbst nicht mehr nachweisbar war (immunhistochemisch negativ). Somit wurde eine Deaktivierung von hMLH1 in 23 von 141 Fällen (16,3%) gezeigt. Abbildung 3.11. zeigt je einen positiven und negativen Tumor mit dem zugehörigen Nichttumorgewebe. Die Abbildungen 3.14. und 3.15. zeigen Microarrays von Tumor- und Nichttumorgewebe sowie beispielhaft vergrößerte Bilder von Arraystanzen zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse.

Expression von hMLH1 in Tumor- und Nichttumorgewebe

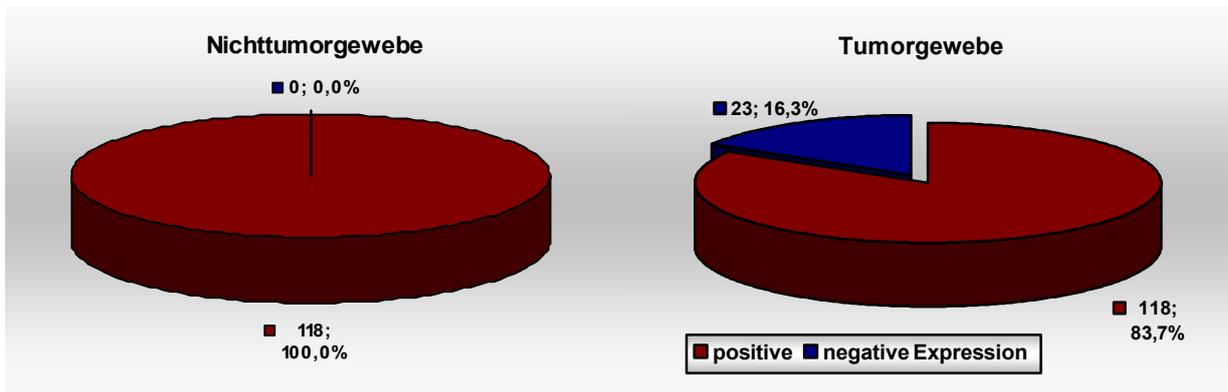
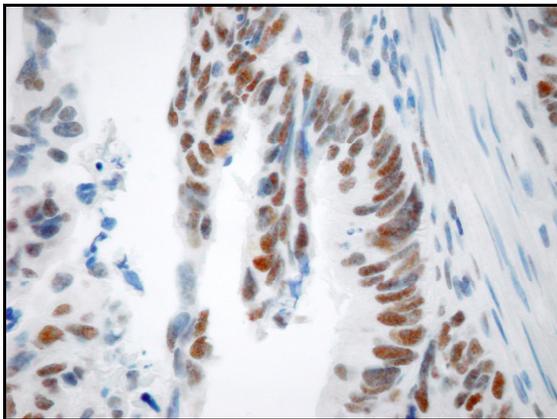
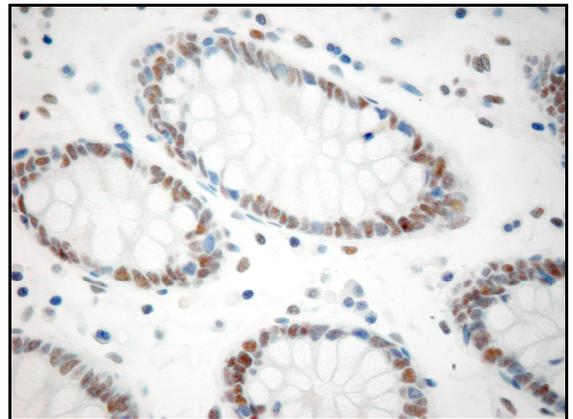


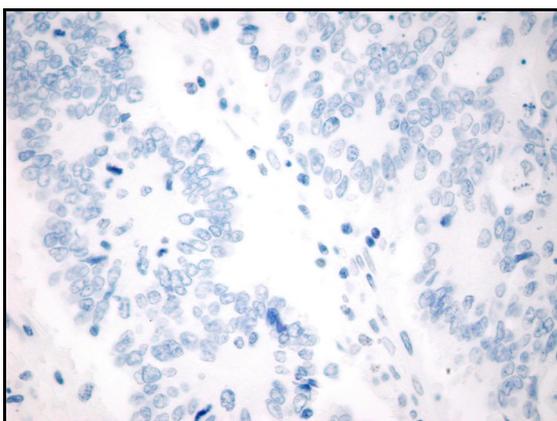
Abbildung 3.10. – Expression von hMLH1



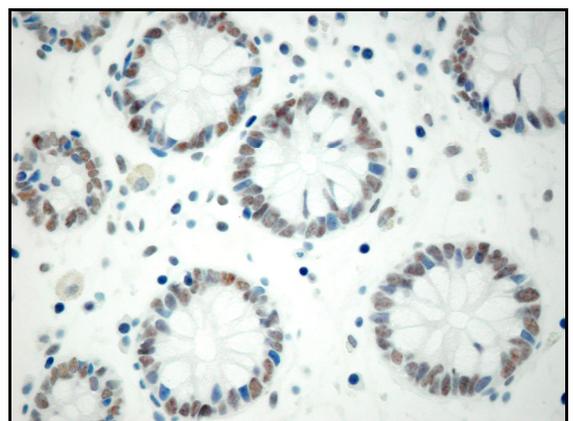
KRK mit positiver Expression



& zugehöriges Nichttumorgewebe



KRK mit negativer Expression

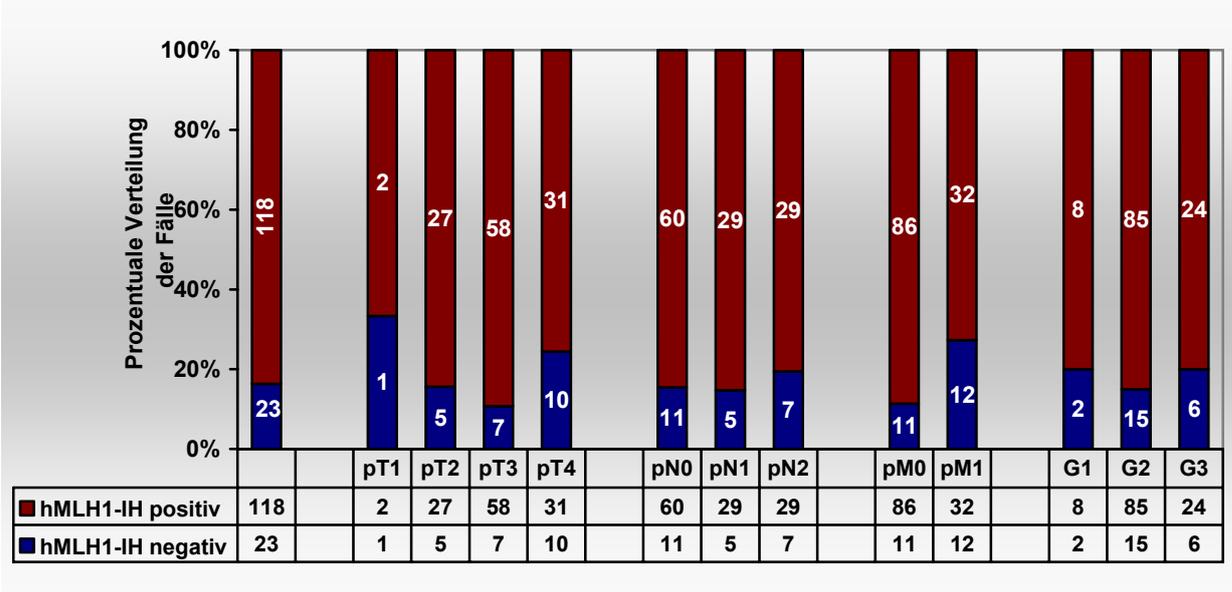


& zugehöriges Nichttumorgewebe

Abbildung 3.11. – positive (Fallnummer 115) und negative (Fallnummer 148) hMLH1-Expression (Immunhistochemische hMLH1-Färbung, 400x Vergrößerung)

Bei der Einteilung nach Tumorgröße, regionale Lymphknotenmetastasen und Grading zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den hMLH1-exprimierenden (hMLH1-IH-positiven) und nicht exprimierenden (hMLH1-IH-negativen) Tumoren. Die genauen Zahlen sind in der Abbildung 3.12. mit angehängter Tabelle dargestellt. Bei der Anzahl der Fernmetastasen zeigt sich hingegen, dass hMLH1 nicht exprimierende Tumoren signifikant mehr Fernmetastasen hatten ($p=0,018$). Während bei den hMLH1-exprimierenden Tumoren eine Verteilung pM0 zu pM1 von 72,9% (86 Fälle) zu 27,1% (32 Fälle) vorliegt, zeigt sich bei den hMLH1-IH-negativen Tumoren ein Verhältnis pM0 zu pM1 von 47,8% (11 Fälle) zu 52,2% (12 Fälle) zugunsten der Status pM1 mit positiven Fernmetastasen.

hMLH1-Immunhistochemie - TNM nach UICC-Kriterien und Grading



Stadieneinteilung

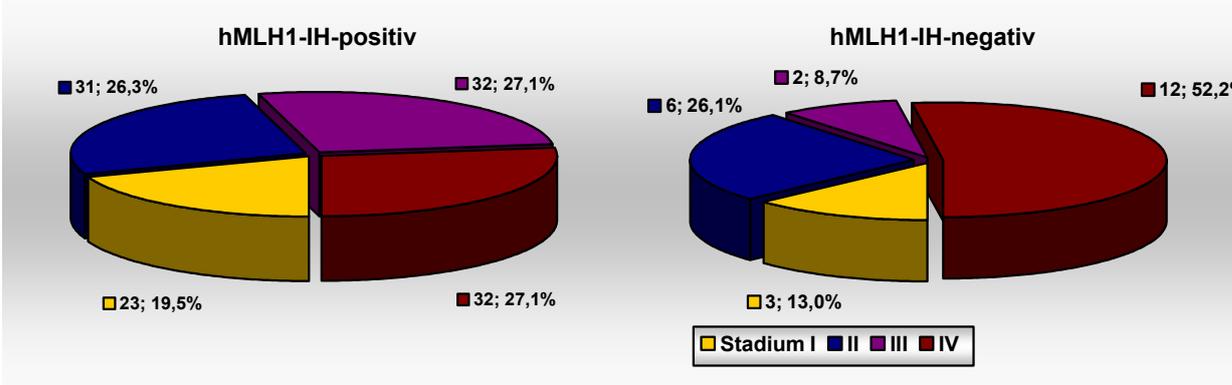


Abbildung 3.12. – pTNM-Klassifikation, Grading und Stadieneinteilung der immunhistochemisch ausgewerteten Tumoren

Teilt man auf der Grundlage dieser Zahlen die Patienten in den UICC-Stadien I bis IV ein, so zeigt sich eine Tendenz dahingehend, dass sich Patienten mit hMLH1-IH-negativen Tumoren bedingt durch die höhere Anzahl an Fernmetastasen zu einem höheren Anteil im Stadium IV befinden ($p=0,071$). In der Gruppe hMLH1-IH-positiv sind in ausgeglichenem Niveau 23 Patienten dem Stadium I (19,5%), 31 Fälle dem Stadium II (26,3%) und jeweils 32 Patienten den Stadien III und IV (je 27,1%) zugeordnet. In der Gruppe hMLH1-IH-negativ sind hingegen nur drei Patienten im Stadium I (13,0%), sechs Fälle im Stadium II (26,1%) und zwei Patienten im Stadium III (8,7%) während sich bereits zwölf Fälle im Stadium IV (52,2%) befinden. Wenn auch die beiden hMLH1-IH-negativen Fälle in diese Rechnung mit einbezogen werden, bei denen kein Nichttumor zur Kontrolle vorhanden war und die daher statistisch nicht berücksichtigt wurden, verstärkt sich diese Tendenz noch. Dann gehören 14 Fälle in das Stadium IV und somit wäre an dieser Stelle sogar ein signifikanter Unterschied nachweisbar gewesen ($p=0,027$).

Bei der Altersverteilung zeigt sich ähnlich den Ergebnissen bei der hMLH1-Methylierung ein tendenzieller Unterschied des Durchschnittsalter der Patienten, wobei hier jedoch die Gruppe der Patienten mit positiver hMLH1-Expression ein um 4,6 Jahre höheres Durchschnittsalter als die hMLH1-IH-negative Gruppe hat ($p=0,074$). Während in der hMLH1-IH-positiven Gruppe das Durchschnittsalter bei $72,6 \pm 9,8$ Jahren liegt, sind es bei der hMLH1-IH-negativen Gruppe nur $68,0 \pm 12,4$ Jahre.

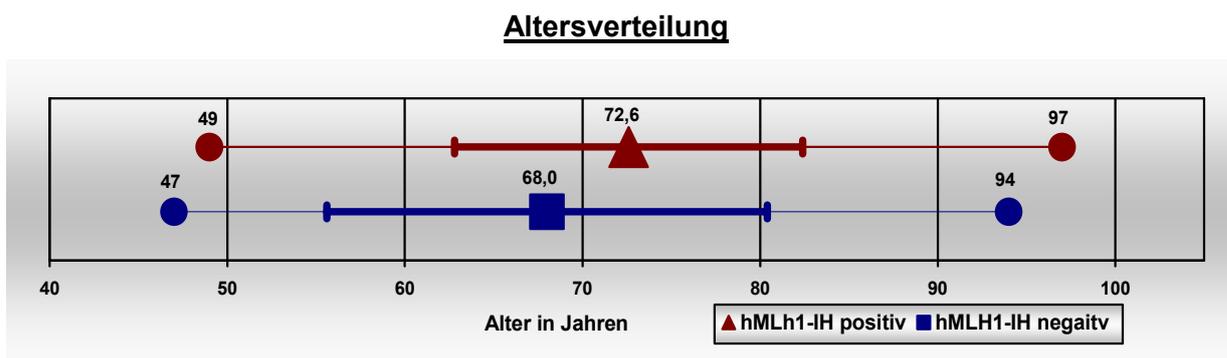


Abbildung 3.13. – Altersverteilung (Minimum, Mittelwert mit Standardabweichung, Maximum) der immunhistochemisch ausgewerteten Tumoren

Des Weiteren sind bei der Lokalisation von den hMLH1-IH-negativen Tumoren sieben proximal (30,4%) und 16 distal (69,6%) der linken Kolonflexur gelegen, bei den hMLH1-IH-positiven Karzinomen finden sich 44 proximale (37,3%) und 74 distale KKR (62,7%). Es zeigt sich also hinsichtlich der Position des Primärtumors ein ähnliches Verteilungsmuster ohne signifikante Häufungen. Bei der Geschlechtsverteilung sowie den anamnestischen Merkmalen Adipositas und Nikotinabusus wurden keine signifikanten Häufungen gefunden. So sind in der hMLH1-IH-positiven Gruppe 67 Männer (56,8%) und 51 Frauen (43,2%) gewesen, in der Gruppe der negativen hMLH1-Expression befinden sich mit einem ähnlichen Verhältnis zwölf Männer (52,2%) und elf Frauen (47,8%).

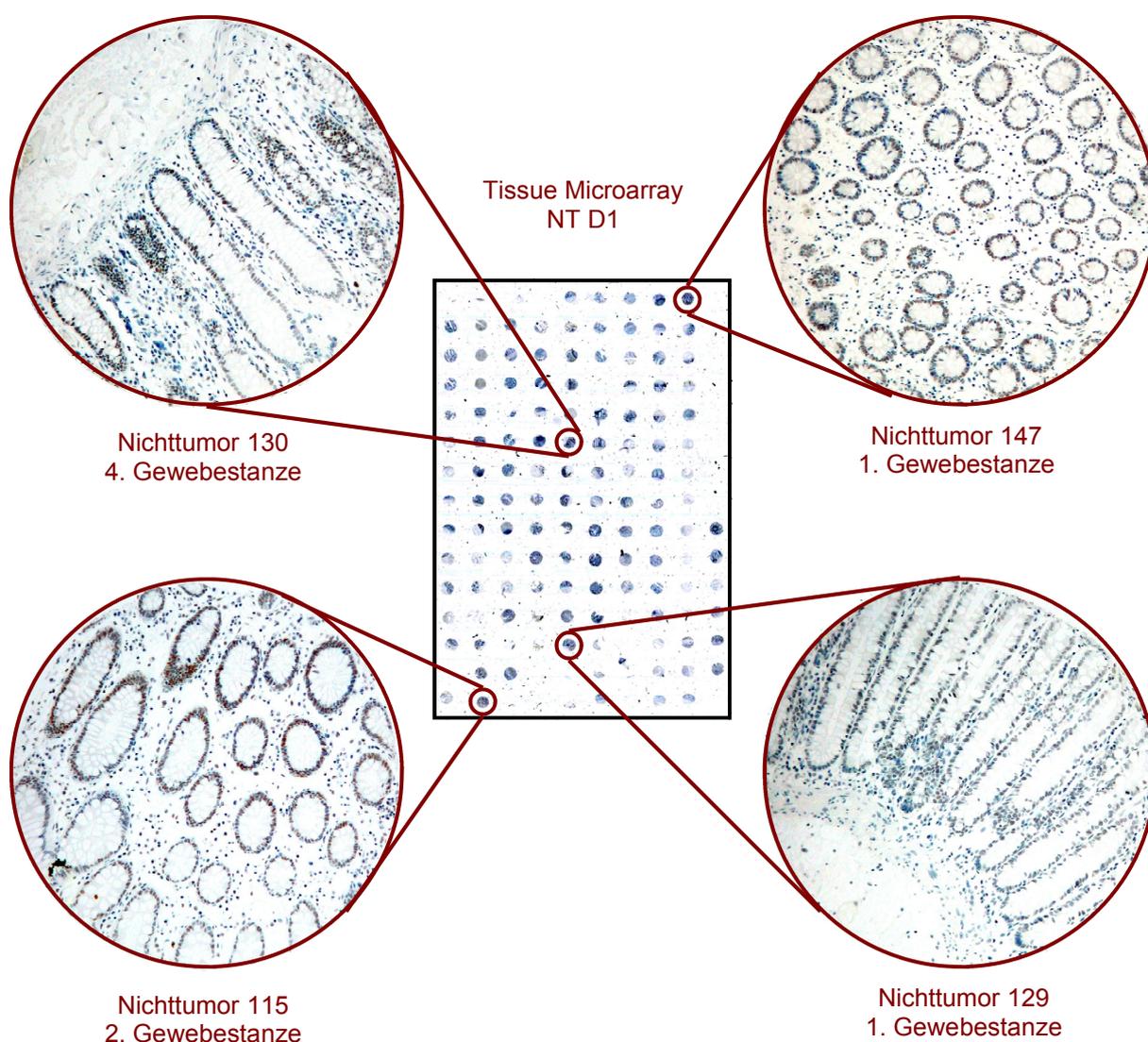


Abbildung 3.14. – Tissue Microarray Nichttumor D1 mit den Arraystanzen 115/2, 129/1, 130/4 und 147/1 (Objektträgerscan und 100x Vergrößerung, immunhistochemische hMLH1-Färbung)

Gesamtpräparat Tumor 80
homogene positive hMLH1-Färbung

Gesamtpräparat Tumor 122
homogene negative hMLH1-Färbung

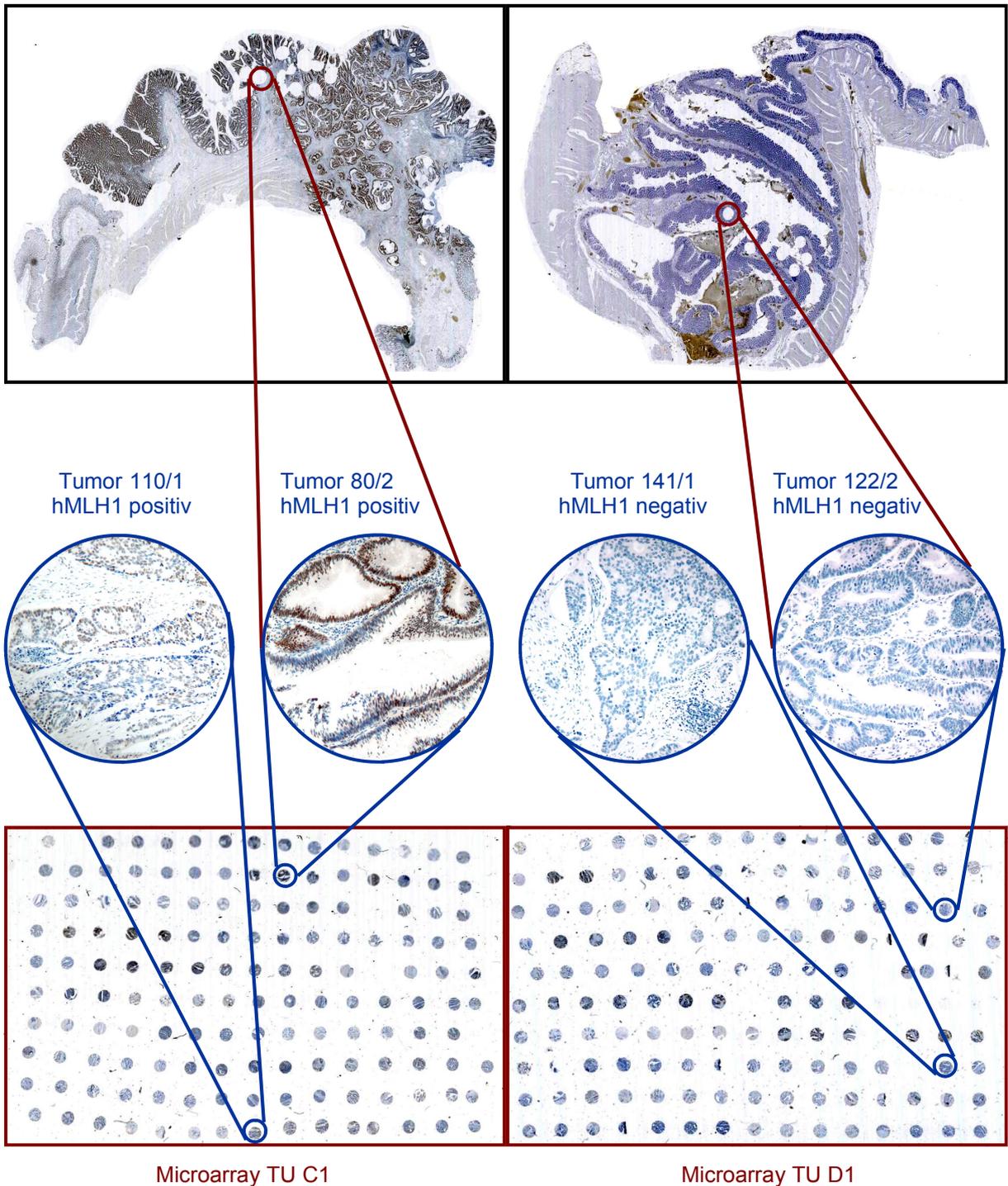


Abbildung 3.15. – Tissue Microarray Tumor C1 und D1 mit den Arraystanzen 80/2, 110/1, 122/2 und 141/1 sowie die Gesamtpräparaten Tumor 80 und 122 zur Darstellung der homogenen Färbungen (Objektträgerscan und 100x Vergrößerung, immunhistochemische hMLH1-Färbung)

3.3.2. Validierung der Microarrays

Von den 147 immunhistologischen Fällen waren 143 Fälle (97,3%) auswertbar, lediglich in vier Fällen zeigten alle vier Gewebstanzen kein Tumor- sondern Fett- oder Muskelgewebe bzw. die gesamte Stanze fehlte. Bei diesen 143 Fällen waren 95mal alle vier Stanzen auswertbar (70 positive und 25 negative Tumoren; 66,4%). Von diesen 25 negativen Tumoren wurden zwei Fälle jedoch statistisch nicht gewertet, da kein positives Nichttumorgewebe des Patienten vorhanden war. Diese beiden Fälle zeigten aber in allen vier Stanzen eine homogene Färbung und können an dieser Stelle daher zur Gruppe der vier gleichen Stanzen gezählt werden. Da ja primär eine Deaktivierung der hMLH1-Proteins gezeigt werden sollte, ist hier außerdem anzumerken, dass bei allen 25 negativen Fällen vier negative Stanzen vorhanden und auswertbar waren, also 100% der negativen Fälle zu dieser Gruppe gehören. Drei positive Stanzen gab es in 27 Fällen (18,9%), bei 14 Fällen waren zwei Stanzen positiv (9,8%) und in sieben Fällen war nur eine Microarraystanze als positiv auswertbar (4,9%).

Auswertung der Tissue Microarrays

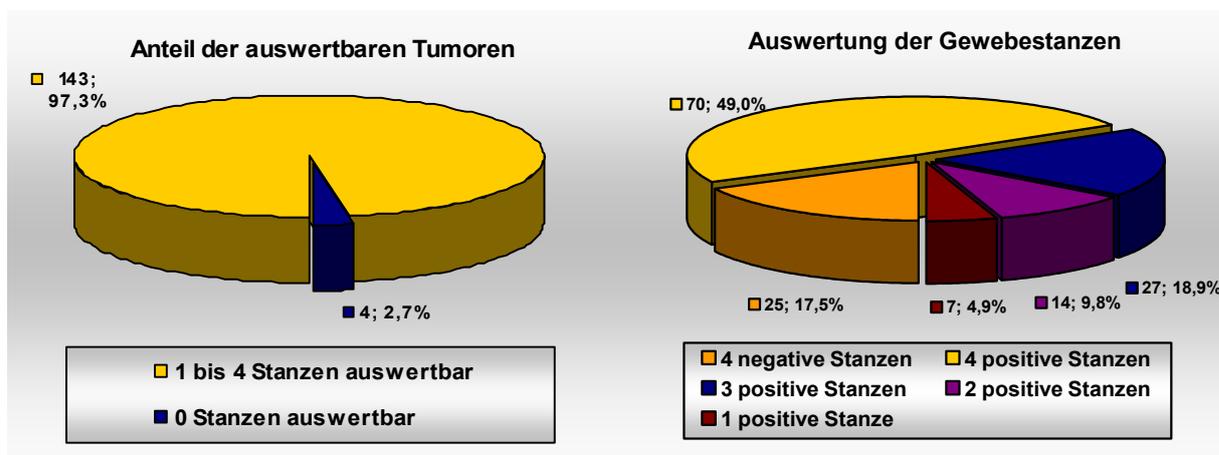


Abbildung 3.16. – Auswertung der Tissue Microarrays der sporadischen KRK

3.4. Kombinierte Auswertung der Ergebnisse

Von 55 Patienten sind sowohl immunhistochemische als auch molekularbiologisch auswertbare Daten vorhanden. Setzt man, wie in der Tabelle 3.2. zu sehen, die Ergebnisse der hMLH1-Methylierung und die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der hMLH1-Expression in eine Kreuztabelle, so ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,002$).

		hMLH1 DNA-Methylierung	
		negativ	positiv
Anzahl	hMLH1- Proteinexpression negativ	7	4
% der Gesamtzahl (55 Fälle)		12,7%	7,3%
% von hMLH1 Expression		63,6%	36,4%
% von hMLH1 Methylierung		A 14,3%	C 66,7%
Durchschnittsalter in Jahren		63,1±10,6	82,3±9,6
Adipositas (Fälle von Gesamt)		0 von 6	2 von 3
Männer / Frauen		4 / 3	1 / 3
Anzahl	hMLH1- Proteinexpression positiv	42	2
% der Gesamtzahl (55 Fälle)		76,4%	3,6%
% von hMLH1 Expression		95,5%	4,5%
% von hMLH1 Methylierung		B 85,7%	D 33,3%
Durchschnittsalter in Jahren		72,8±9,7	69,5±12,0
Adipositas (Fälle von Gesamt)		6 von 39	0 von 1
Männer / Frauen		26 / 16	0 / 2

Tabelle 3.2. – Kreuztabelle der Ergebnisse der hMLH1-DNA-Methylierungsuntersuchungen und der Auswertung der hMLH1-Proteinexpression

Bei insgesamt elf Fällen war die Expression von hMLH1 negativ (20%), bei 44 Patienten positiv (80%). Fasst man alle positive Methylierungen zusammen, so war sie in den sechs bereits ausführlich beschriebenen Fällen positiv (10,9%), in den restlichen 49 Fällen negativ (89,1%). Diese Fälle lassen sich so in vier Gruppen einteilen. So gibt es sieben Fällen (12,7%) bei denen zwar keine Methylierung der DNA belegt wurde, jedoch zeigte der Tumor trotzdem keine hMLH1-Expression (Gruppe A). In 42 Fällen (76,4%) wurde keine Methylierung dokumentiert und eine positive hMLH1-Expression konnte in den Tumorzellen gezeigt werden (Gruppe B). In vier Fällen (7,3%) war die DNA positiv methyliert und der Tumor zeigte auch keine Expression von hMLH1 (Gruppe C). Bei zwei Patienten (3,6%) wurde trotz positiver DNA-Methylierung weiterhin hMLH1 in dem Tumorzellen expremiert (Gruppe D).

Bei der statistischen Auswertung dieser vier Gruppen untereinander ergaben sich keine signifikanten Häufungen hinsichtlich TNM-Klassifikation, Grading, Stadium, Lokalisation des Primärtumors und Geschlecht des Patienten. Es gab jedoch signifikante Altersunterschiede ($p=0,013$) zwischen den Gruppen, so war das Durchschnittsalter aller 55 Patienten $72,1\pm 11,5$ Jahre. In der Gruppe A lag es hingegen bei nur $63,1\pm 10,6$ Jahren, in der

Gruppe B bei $72,8 \pm 9,7$ Jahren, bei der Gruppe C waren es hohe $82,3 \pm 9,6$ Jahre und in der Gruppe D waren die Patienten durchschnittlich $69,5 \pm 12,0$ Jahre alt. Bei der analytischen Berechnung einer Gruppe gegen die Summe der anderen Gruppen zeigt sich, dass in der Gruppe C mit zwei von drei Patienten (66,7%) signifikant mehr adipöse Patienten sind als in den anderen Gruppen zusammen, wo nur sechs von 46 Patienten übergewichtig sind (13,0%) ($p=0,015$). Ansonsten zeigten sich bei der TNM-Klassifikation, dem Grading und UICC-Stadium sowie Lokalisation des Primärtumors und Geschlecht des Patienten keine weiteren signifikanten Häufungen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte immunhistochemisch eine Deaktivierung des hMLH1 in 23 von 141 sporadischen kolorektalen Karzinomen (16,3%) gezeigt werden. Bei 55 Patienten war die kombinierte Auswertung von DNA-Methylierung und immunhistochemischer Proteinexpression möglich. Von diesen 55 Fällen war bei elf Fällen (20%) die hMLH1-Expression negativ, wobei wiederum in vier dieser elf Tumoren (36,4%) eine Methylierung der DNA nachgewiesen werden konnte. Von den 44 Fällen mit positiver hMLH1-Expression wurde bei zwei Fällen (4,5%) eine Methylierung der DNA gezeigt.

In der wissenschaftlichen Forschung haben sich schon einige Studien mit der Expression von hMLH1 in sporadischen kolorektalen Karzinomen und in HNPCC befasst. Dabei wurde insbesondere bei den sporadischen KRK die Expression von hMLH1 im Zusammenhang mit dem MSI-Status untersucht. In einer großen Kohortenstudie von Luchtenborg und Kollegen in den Niederlanden wurde bei 58 von 656 (9%) sporadischen KRK eine fehlende Expression von hMLH1 gefunden. 47 dieser Patienten wurden mit den Tumorpatienten verglichen, bei denen eine K-ras- (235 von 656, 36%) oder APC-Mutation (245, 37%) bzw. Beides (109, 17%) gezeigt werden konnte und bei denen damit das klassische Adenom-Karzinom-Sequenzmodell als Ursache der Entstehung des Tumors angenommen werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die Patienten mit fehlender hMLH1-Expression älter (69,3 zu 67,8 Jahre) und verstärkt weiblichen Geschlechts (60% zu 42%) waren. Außerdem waren die Tumoren häufiger proximaler gelegen (87% zu 37%) und von schlechterem Differenzierungsgrad. Hinsichtlich der Einteilung in die Erkrankungsstadien nach Dukes gab es keine signifikanten Unterschieden, es bestand jedoch tendenziell ein früheres Stadium als bei der Vergleichsgruppe (10 Dukes A, 23 Dukes B, 9 Dukes C, 3 Dukes D) (Luchtenborg et al. 2005). In der Studie von Wright und Stewart wurde immunhistochemisch eine fehlende Expression von hMLH1 in 80 von 458 Fällen (17,5%) gezeigt. Bei der Lokalisation zeigte sich ein ansteigender Anteil der hMLH1-negativen Tumoren im proximalen Kolon (32% im Caecum, 37% im Colon ascendens und 42% im Colon transversum). Dieser Anteil nahm dann nach distal wieder stark ab und betrug im Rektum nur noch 4,7% (Wright et al. 2003). Eine dritte Studie von Chai et al. fand einen Verlust der hMLH1-Expression bei 10% der 1020 untersuchten kolorektalen Karzinome, die auch in Form von Tissue Microarrays untersucht wurden. Auch dort fand sich in dieser Gruppe einen höherer Anteil von Frauen, ein höheres Alter sowie eine häufigere proximale Tumorlokalisierung (Chai et al. 2004).

Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil an sporadischen KRK mit fehlender hMLH1-Proteinexpression von 16,3% entspricht den in diesen und anderen Studien gefundenen Werten von 9 bis 20%. In der hier durchgeführten Arbeit zeigte sich hingegen keine bevorzugte Lokalisation der Tumoren mit negativer hMLH1-Expression im proximalen Kolon, außerdem war das Durchschnittsalter dieser Gruppe um 4,6 Jahre höher und es gab auch keinen signifikant höheren Anteil von Frauen. Außerdem zeigte sich ein signifikant höherer Anteil von Patienten mit Fernmetastasen und damit des Stadiums IV nach UICC Kriterien in der Gruppe der hMLH1 nicht exprimierenden Tumoren, der in den Vergleichsstudien nicht gefunden wurde.

Luchtenborg untersuchte 162 seiner Tumoren anhand des Markers BAT-26 auch auf Mikrosatelliteninstabilität. Dabei zeigten alle Tumoren mit stabilem BAT-26 eine hMLH1-Expression, während von 16 (10%) instabilen BAT-26 Tumoren nur zwei eine Expression zeigten und in 14 Fällen kein hMLH1-Protein nachweisbar war. Kritisch bleibt hierbei anzumerken, dass für eine Einstufung als MSI-H eigentlich mindestens zwei von fünf Markern der Bethesda-Kriterien eine Instabilität zeigen müssen. Hier wurde jedoch nur ein einzelner, wenn auch sehr sensitiver Marker untersucht (Loukola et al. 2001, Luchtenborg et al. 2005). Hatch fand in seiner Untersuchung der Expression von hMLH1, hMSH2, hMLSH6 und hPMS2 bei 26 von 262 Fällen (ebenfalls 10%) eine positive MSI. Er untersuchte alle fünf MSI Marker und fand bei allen 26 Fällen sowohl Mutationen in den Mono- als auch Dinukleotidmarkern. 19 dieser Fälle (73%) zeigten einen Verlust der hMLH1-Expression und gleichzeitig auch einen Verlust der hPMS2-Expression. Sechs weitere Tumoren (23%) zeigten einen Verlust der hMSH2- und hMSH6-Expression. Bei einem Tumor wurde nur ein Verlust der hPMS2-Expression gefunden, während die hMLH1-Expression weiterhin nachgewiesen werden konnte (Hatch et al. 2005). Es gibt in diesen Arbeiten eine hohe Korrelation zwischen MSI-Status und Verlust der MMR-Genexpression, jedoch ist auch in der Arbeit von Chai eine Rate von 2,4% (24 von 983 Fällen) angegeben, bei der trotz nachgewiesener positiver MSI eine Expression der MMR-Gene gezeigt werden konnte bzw. der umgekehrte Fall vorlag (Chai et al. 2004). Auch andere Arbeiten zeigen, dass eine Mikrosatelliteninstabilität bei 10 bis 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome vorliegt. Wichtig ist insbesondere der Unterschied zu den HNPCC-Patienten, bei denen in bis zu 90% eine positive MSI nachweisbar ist (Iono et al 2000, Pedroni et al. 2001, Michalopoulos et al. 2005).

Viele dieser Arbeiten über die Expression von hMLH1 sind verknüpft mit der Untersuchung der Methylierung der Promotorregion der MMR-Gene. In der hier vorgelegten Arbeit wurde bei vier der elf hMLH1 expressionsnegativen Fällen (36,4%) eine Methylierung der hMLH1-Promotorregion gezeigt. In einer der ersten Arbeiten zu diesem Thema aus dem Jahre 1997 wurde bei vier von 66 sporadischen kolorektalen Karzinomen ein Verlust der Expression von hMLH1 gezeigt. Bei allen vier Tumoren wurde nachgewiesen, dass keine Mutation der DNA-Sequenz des hMLH1 selbst vorlag, sondern eine Cytosinmethylierung im Promotorbereich, die in der DNA des zum Vergleich untersuchten Nichttumorgewebes und in neun anderen, hMLH1 exprimierenden Tumoren nicht vorhanden war. Kane ging daher davon aus, dass die DNA-Methylierung wahrscheinlich eine häufige Ursache der Deaktivierung der MMR-Gene in sporadischen kolorektalen Karzinomen darstellt (Kane et al. 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidine zur Reaktivierung und Reexpression von hMLH1 in den Zellen kommt (Veigl et al. 1998, Deng et al. 1999). Diese Vermutung über die Häufigkeit der Methylierung von hMLH1 wurde durch die 1998 von Herman und Kollegen durchgeführten Untersuchungen an primären kolorektalen Karzinomen und Tumorzelllinien bestärkt. Sie zeigten, dass bei elf von 13 MSI-positiven kolorektalen Karzinomen (84,6%) eine starke Methylierung der hMLH1-Promotorregion vorhanden war, während nur bei zwei von 21 MSS-KRK (9,5%) eine solche Methylierung nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit auch eine Gruppe von HNPCC-Tumoren untersucht, um vergleichende Werte über die Häufigkeit von hMLH1-DNA-Methylierungen bei den hereditären KRK zu erhalten. Dabei fanden sich signifikant niedrigere Werte, da nur vier von 22 HNPCC-Tumoren mit positiver Mikrosatelliteninstabilität (18,2%) eine Methylierung der DNA zeigten (Herman et al. 1998).

Auch aktuelle Arbeiten kommen auf ähnliche Zahlen, so fanden Arnold et al. bei 14 von 20 MSI-H-Tumoren eine positive Methylierung, während nur elf von 61 Tumoren der MSS-Vergleichsgruppe diese aufwiesen. Sie untersuchten außerdem die immunhistochemische Expression von hMLH1 und fanden bei 93% der Tumoren ohne nachweisbare Expression von hMLH1 eine positive DNA-Methylierung, während diese nur bei 42% der hMLH1-expressionspositiven Fälle gefunden wurde. Sie zeigten damit einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung, der Expression von hMLH1 und der positiven Mikrosatelliteninstabilität (Arnold et al. 2004). Auch Song und Kollegen fanden ähnlich hohe Werte und zeigten bei 94,4% ihrer MSI-H-Fälle (17 von 18) eine Hypermethylierung der hMLH1-Promotorregion, sie fanden aber auch bei beträchtlichen

60,8% der MSS-Fälle (14 von 23) diesen positiven Methylierungsstatus (Song et al. 2004). Auf niedrigere Werte kam hingegen Okuda, der nur bei acht von 14 MSI-H-Fällen (57,1%) eine Hypermethylierung der hMLH1-Promotorregion fand (Okuda et al. 2005). Das andere wichtige MMR-Gen hMSH2 scheint nicht von der Deaktivierung durch eine Promotormethylierung betroffen zu sein. Herman et al. untersuchten in ihrer Studie auch hMSH2 auf CpG-Methylierungen, konnten jedoch solche in keinem ihrer 34 Fälle finden (Herman et al. 1998). Auch in der Studie von Cunningham konnte als Ursache ihrer drei Fälle mit hMSH2-Deaktivierung (von insgesamt 251 Fällen) jeweils eine Mutation als Ursache nachgewiesen werden (Cunningham et al. 2001).

Hinsichtlich klinischer und anamnestischer Daten wird in nahezu allen Studien ein Vergleich von Patientengruppen hinsichtlich der MSI durchgeführt. So waren bei Okuda et al. die Patienten mit MSI-H-KRK signifikant älter und der Tumor häufiger im proximalen Kolon lokalisiert (Okuda et al. 2005). Auch in einer Studie über die Mikrosatelliteninstabilität in sporadischen KRK bei Afroamerikanern waren die meisten der MSI-H-Tumoren proximal der linken Kolonflexur gelegen. Außerdem zeigte sich ein Anteil von 68% Frauen in dieser Gruppe (Ashktorab et al. 2005). In der vorgelegten Arbeit wurde bei insgesamt sechs von 55 Tumoren (10,9%) eine Methylierung der DNA nachgewiesen. Elf Tumoren zeigten eine fehlende hMLH1-Expression, davon waren vier Tumoren methyliert (36,4%). Auch bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit lagen in der Gruppe der hMLH1-promotormethylierten Tumoren mit 66,7% mehr Tumoren im proximalen Kolon, in der Vergleichsgruppe der unmethylierten Tumoren waren es nur 42,1%. Auch waren fünf der sechs Patienten mit positiver DNA-Methylierung Frauen (83,3%), in der anderen Gruppe waren nur 43,9% weiblichen Geschlechts. Außerdem war auch in unserer Gruppe mit Hypermethylierung der hMLH1-Promotorregion das Durchschnittsalter mit 78 Jahren 6,2 Jahre höher als bei der Vergleichsgruppe ohne Methylierung. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit entsprechen damit zum großen Teil den auch in anderen Untersuchungen gefundenen Daten. Hinsichtlich der hier gefunden signifikanten Häufung von Adipositas in der Gruppe des methylierten hMLH1 wurde leider keine Vergleichsstudie gefunden.

In der vorgelegten Arbeit wurde lediglich die Methylierung von hMLH1 untersucht, jedoch spielen auch andere Gene eine wichtige Rolle bei der Entstehung von sporadischen KRK. Daher stellt sich die Frage, wie hoch die Rate der Methylierung bei diesen Genen ist. Lind et al. untersuchten 2004 sechs verschiedene Marker bei primären kolorektalen Karzinomen und

bei Tumorzellreihen mit und ohne MSI. Dabei fanden sie heraus, dass hMLH1 bei 0% der elf MSS-Zellreihen und ebenso bei 0% der 25 MSS-KRK methyliert war, während bei den MSI-H-Zellreihen in drei von neun Fällen (33%) und bei dem MSI-H-KRK in elf von 28 Fällen (39%) eine Promotormethylierung vorlag. In der Summe sind damit elf der 53 KRK methyliert, das entspricht 21%. Schaut man nun auf die anderen untersuchten Gene, so finden sich mit 40% beim MGMT (21 von 53 Fällen), 32% bei p16^{INK4a} (17 von 53), 38% bei p14^{ARF} (20 von 52), 32% bei APC (17 von 53) und 40% bei E-cadherin (21 von 52 Fällen) bei allen fünf anderen Genen höhere Werte (Lind et al. 2004). Bei Untersuchungen an Magdeburger Kollektiven von kolorektalen Karzinomen konnte eine Hypermethylierung von DAPK in 54 von 94 Fällen (57,4%) und von p16^{INK4a} in 41,9% (18 von 43 Fällen) gezeigt werden (Schneider-Stock et al. 2003, Schneider-Stock et al. 2006).

In der hier durchgeführten Arbeit gibt es zwei Fälle, bei denen sich trotz nachgewiesener positiver DNA-Methylierung immunhistochemisch eine positive Expression von hMLH1 zeigte. Als Ursache hierfür kann die hemiallelische Methylierung angesehen werden, dabei wird nur eines der beiden Allele methyliert. In der methylierungsspezifischen PCR ist eine positive Methylierung nachweisbar, da das zweite, unmethylierte Allel aber weiterhin die Funktion des Gens gewährleistet, ist auch eine positive Expression in der immunhistochemischen Färbung sichtbar. So beschrieben Miyakura und Kollegen diese hemiallelische Methylierung besonders in frühen sporadischen KRK (Miyakura et al. 2004). Für die Methylierung von hMLH1 konnte schon vorher gezeigt werden, dass in den meisten Fällen eine biallelischen Methylierung zum Silencing des hMLH1 führt. Es kann aber auch durch die deaktivierende Methylierung eines Allels und die Mutation des anderen Allels zur fehlenden hMLH1-Expression kommen (Veigl et al. 1998, Bevilacqua et al. 2000, Li et al. 2002).

Da nicht in allen Fällen mit fehlender hMLH1-Expression eine Methylierung der hMLH1-Promotorregion gefunden werden konnte, stellt sich die Frage, welche alternativen Mechanismen der Deaktivierung des hMLH1 die Ursache bei diesen weiteren Fällen sein können. Einer dieser weiteren Mechanismen scheint hier der Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity - LOH) zu sein. Die notwendige Heterozygotie liegt vor, wenn ein Gen in einem diploiden Chromosomensatz in zwei verschiedenen Allelen existiert, wobei das eine, gesunde Allel die Funktion des Gens gewährleistet und das zweite Allel entweder durch eine Punktmutation oder durch einen vererbten Defekt wie beim HNPCC seine Funktion bereits

verloren hat. Von einem LOH spricht man, wenn auch das gesunde Allel z.B. durch eine Punktmutation seine Funktionsfähigkeit verliert und es damit zu einem kompletten Verlust der Funktion dieses Gens kommt. In mehreren Arbeiten konnte dargestellt werden, welche Rolle LOH bei der Inaktivierung von hMLH1 spielt. So wurde gezeigt, dass bei HNPCC-Patienten ein LOH der MMR-Region in 50-56% der Fälle nachweisbar war. Bei sporadischen KRK unterscheiden sich die Ergebnisse stärker. So zeigen laut Tomlinson 41% der sporadischen MSI-H-KRK und 15% der sporadischen MSS-KRK einen Verlust der Heterozygotie. Potocnik und seine Kollegen fanden hingegen nur in 15% der MSI-H-KRK einen LOH. Wheeler fand in seiner Studie mit sporadischen-KRK-Zellreihen keinen einzigen mikrosatelliteninstabilen Fall mit LOH, während mikrosatellitenstabile Tumoren bei ihm in 12% der Fälle einen Verlust der Heterozygotie zeigten. Als Ursache dieses im Gesamtbild aller verfügbaren Untersuchungen doch eher ungewöhnlichen Ergebnisses sieht er jedoch die Arbeit mit Zellreihen, während die anderen Untersuchungen meist an humanem Tumorgewebe durchgeführt wurden (Tomlinson et al. 1996, Wheeler et al. 1999, Potocnik et al. 2001, Sanchez de Abajo et al. 2006).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Schritte der immunhistochemischen Färbung von hMLH1, der molekulargenetischen Untersuchung der Promotorregion von hMLH1 sowie der Mikrosatelliteninstabilitätsuntersuchungen sind nur ein Teil der Diagnostik des HNPCC. Heute wird aus ökologischen Gründen ein Stufenmodell genutzt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von hMLH1 und MSI stellen dabei die Screeninguntersuchungen dar. Die definitive Diagnose HNPCC erfordert den molekularen Nachweis einer Keimbahnmutation eines Mismatch-Reparaturgens. Der wichtigste Schritt der gesamten Diagnostik ist sicherlich das Stellen der Verdachtsdiagnose HNPCC durch den behandelnden Arzt. Nach den überarbeiteten Bethesda-Kriterien von 2004 gibt es fünf Risikogruppen, bei denen eine weitere Untersuchung auf ein mögliches HNPCC empfohlen wird. Es soll nicht erst beim vollständigen Erfüllen aller in der Einleitung beschriebenen Amsterdam-II-Kriterien eine molekulardiagnostische Abklärung durchgeführt werden, sondern bei allen Patienten, die einer der fünf Gruppen zugeordnet werden können. So sollen

- Patienten mit einem kolorektalen Karzinomen vor dem 50. Lebensjahr,
- Patienten mit einem erstgradigen Verwandten mit KRK oder HNPCC-typischen extrakolonischen Karzinomen (Endometrium, Ovar, Leber und Gallenwege, Magen, Nierenbecken und Ureter, Dünndarm) bei der Diagnose eines dieser Karzinome vor dem 50. Lebensjahr,

- Patienten mit synchronen, metachronen KRK oder HNPCC-typischen extrakolonischen Karzinomen, unabhängig vom Alter,
 - Patienten mit MSI-H vor dem 60. Lebensjahr und
 - Patienten mit zwei oder mehreren erst- oder zweitgradigen Verwandten mit einem KRK oder HNPCC-typischen extrakolonischen Karzinomen, unabhängig vom Alter,
- molekulardiagnostisch untersucht werden (Umar et al. 2004). Die große spanische EPICOLON Studie mit über 1200 Patienten hat aber gezeigt, dass auch die alten Bethesda-Kriterien aus dem Jahre 1996 mit ihren sechs Risikogruppen gleichwertig waren. Beide Versionen sind hocheffektiv im Identifizieren der Träger von hMLH1 und hMSH2 Mutationen bei neu aufgetretenen KRK (Rodriguez-Bigas et al. 1997, Rodriguez-Moranta et al. 2006).

Als Screeninguntersuchung erfolgt zunächst eine Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität anhand der fünf MSI Marker BAT25, BAT26, D2S123, APC sowie D17S250 und eine immunhistochemische Untersuchung der Expression von hMLH1 und hMSH2. Findet sich eine negative Expression eines MMR-Gens oder eine positive Mikrosatelliteninstabilität in mindestens zwei Markern gilt die Person als HNPCC-Risikoperson. In diesem Fall erfolgt eine genetische Beratung und im nächsten Schritt die Suche nach einer Keimbahnmutation anhand von Normalgewebe oder Blut. Bevorzugt wird hierbei die direkte Analyse der genomischen DNA aus Blutzellen. Alternativ wird revers transkribierte cDNA genutzt. Dabei besteht allerdings das Problem, dass sich die mutierte RNA oft der Analyse entzieht, da sie sehr schnell innerhalb des Zellkerns abgebaut wird. Da es keine „Hotspots“ als bevorzugte Mutationsorte gibt und noch heute häufig neue Mutationen bei HNPCC-Patienten gefunden werden, wird empfohlen, die Gene hMSH2 und hMLH1 exonweise komplett zu sequenzieren und zu analysieren. Zusätzlich können auch hPMS1, hPMS2 und hMSH6 untersucht werden, wenn in hMLH1 und hMSH2 keine Mutationen gefunden werden. Wird eine Mutation gefunden, sollten auch die Verwandten mit ihrem erhöhten Risiko beraten und getestet werden. Wird bei einem Patienten mit positiver HNPCC-Anamnese oder mit positiver MSI keine Mutation gefunden, so gilt die Mutationsanalyse als nicht aussagekräftig. Der Patient sollte trotzdem wie ein HNPCC-positiver Fall behandelt werden. Alle Patienten mit positiver MMR-Mutation sollen dann einer engmaschigen Hochrisikokontrolle zugeführt werden, welche mit einem ersten Beratungsgespräch nach dem 16. Lebensjahr beginnt. Ab dem 20. Lebensjahr wird bei Frauen eine jährliche gynäkologische Krebsvorsorge mit vaginaler Sonographie empfohlen. Ab dem 25. Lebensjahr sollte jährlich eine Oberbauchsonographie

und Urinzytologie sowie alle zwei Jahre eine Oesophagogastroduodenoskopie und eine Koloskopie durchgeführt werden, um das Risiko eines unbemerkten, frühen HNPCC-typischen Karzinoms zu minimieren. Beim Auffinden eines Adenoms bei der Koloskopie sollte die Kontrolluntersuchung dann jährlich erfolgen. Patienten mit negativer Testung sollten aus diesem speziellen Kontrollprogramm entlassen werden. Wird bei einem Patienten ein KRK und eine positive Mutation gefunden, wird die subtotale Kolektomie empfohlen (Kohonen-Corish et al. 1996, Ruschoff et al. 1998, Gomez et al. 2005, Baudhuin et al. 2005).

Obwohl die familiäre Anamnese und das hohe Alter der sieben Patienten ohne hMLH1-Expression und Promotormethylierung in dieser Arbeit gegen die Annahme einer vererbten Mutation und somit der Entwicklung eines hereditären kolorektalen Karzinoms sprechen, kann eine erbliche Komponente nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der jüngste Patient hatte zum Operationszeitpunkt bereits ein Alter von 53 Jahren, die anderen Patienten waren sogar noch älter (59, 65, zweimal 66, 74 und 85 Jahre). Das Alter lag somit in den meisten Fällen weit über dem 50. Lebensjahr der Bethesda-Kriterien. Eine Mutationsanalyse und weitere Molekulardiagnostik zur Ursachenfindung der hMLH1-Deaktivierung dieser sieben Fälle wurde nicht durchgeführt, da die Diagnostik des HNPCC nicht der unmittelbare Gegenstand dieser vorgelegten Arbeit war.

Durch die Verwendung von Tissue Microarrays ergeben sich eine Vielzahl von Vorteilen und einige Nachteile, die bei der immunhistochemischen Färbung der Gesamtschnitte nicht auftreten. Als großer Vorteil kann sicherlich das gleichzeitige Färben aller Schnitte in einem Durchgang angesehen werden. Dadurch wird das Risiko von Färbungsunterschieden minimiert und ein optimaler Vergleich der Präparate ist möglich, da alle Schnitte mit denselben Chemikalien unter absolut identischen Bedingungen behandelt wurden. Außerdem sind auf nahezu allen Mikroarrays positive und negative Gewebsstanzen vorhanden, so dass immer eine interne Kontrolle vorhanden ist, zusätzlich können auf einfachem Weg auch noch weitere Kontrollstanzen in den Array eingefügt werden. Tissue Microarrays sparen selbstverständlich auch Material, das bezieht sich sowohl auf das zu untersuchende Gewebe als auch auf die Chemikalien und Antikörper. Durch diese Ersparnisse ist es möglich, kostengünstig eine große Anzahl verschiedener Gewebe zu untersuchen.

Als Nachteil der Tissue Microarrays ist allerdings anzumerken, dass es nur durch die korrekte vorherige Markierung des Tumorbereiches im Gesamtpräparat und durch eine gründliche

Arbeit bei der Herstellung der Arrays möglich ist, wirklich aussagekräftiges Tumor- und Nichttumorstanzen herzustellen. Ein weiterer Nachteil ist ein mögliches Verrutschen bei der Auswertung der Arrays, da nicht das gesamte Präparat im Sichtfeld eingestellt werden kann und so immer wieder die richtige Zeile und Spalte kontrolliert werden muss, um die korrekte Arraystanze zu bewerten. Durch das mögliche Fehlen einer Stanze wird dieses Risiko noch verstärkt. Zum Fehlen einer Stanze kann es dadurch kommen, dass bei der Herstellung des Microarrays die Originalparaffinblöcke eine unterschiedliche Dicke aufweisen. Die Gewebstanzen haben daher eine unterschiedliche Länge im Arrayparaffinblock. Beim späteren Schneiden des fertigen Arrays ist es daher möglich, dass im Bereich einiger Stanzen noch kein Material vorhanden ist bzw. das Ende des Materials bereits erreicht wurde. Daher sind nur im mittleren Bereich des Arrayblocks optimale Microarrays möglich, die alle Stanzen enthalten. So sind in der Arbeit von Schraml et al. 15 bis 25% aller Stanzen nicht auswertbar, entweder durch die oben genannten Probleme bei der Herstellung des Microarrays und durch die weiteren Bearbeitungsschritte. Daher wird von Waterworth empfohlen, durch die Verwendung von drei Stanzen eines Präparates dieses Risiko zu vermindern. In den hier durchgeführten Arbeiten wurden sogar vier Stanzen pro Präparat verwendet, um möglichst aussagekräftige Resultate zu erhalten (Schraml et al. 1999, Hsu et al. 2002, Kumar et al. 2004, Waterworth et al. 2004).

Mit dieser Arbeit sollte auch die Herstellung und Färbung von hMLH1-Tissue Microarrays validiert werden. 143 von 147 Fällen (97,3%) waren auswertbar, nur in vier Fällen war eine Auswertung nicht möglich, dabei war kein Tumorgewebe in den Stanzen vorhanden. Von diesen 143 Fällen waren alle 25 negativen Fälle mit allen vier Stanzen als immunhistochemisch negativ auswertbar. Da es bei der Auswertung von hMLH1 das Auffinden einer Deaktivierung und somit fehlender Expression im Vordergrund steht, ist dieses ein sehr gutes Ergebnis. Außerdem zeigten sich bei 70 Fällen vier positiv auswertbare Stanzen, somit sind bei insgesamt 66,4% der auswertbaren Fälle (95 von 143) alle vier Stanzen mit dem gleichen Ergebnis auswertbar gewesen. In allen 95 Fällen zeigten die vier Stanzen ein homogenes Färbesbild. Bei 18,9% sind drei und bei weiteren 9,8% zwei Stanzen positiv ausgewertet worden. Nur bei geringen 4,9% aller Fälle (7 von 143) musste sich die Diagnose „positive hMLH1-Expression“ auf lediglich eine positive Stanze stützen. Somit konnte gezeigt werden, dass eine genaue Auswertung der Expression von hMLH1 mit Tissue Microarrays möglich ist.

Die MMR-Gene zeigen jedoch nicht nur in kolorektalen Karzinomen Defekte, auch andere Gewebe wurden hinsichtlich der Mikrosatelliteninstabilität und der hMLH1-Promotormethylierung untersucht. Insbesondere bei den HNPCC-typischen extrakolonischen Karzinomen wurden positive Mikrosatelliteninstabilitäten gefunden, aber auch weitere Tumoren wurden untersucht. Eine sehr interessante Arbeit führten Plevova et al. durch. Sie untersuchten immunhistochemisch die Expression von hMLH1 und hMSH2 in 148 Normalgeweben und unterteilten dabei das Gewebe in Gruppen. Sie verglichen das Gewebe mit erhöhtem HNPCC-Risiko (A = Magen, Dünn- und Dickdarm; B = Endometrium und C = Ovar, Leber, Niere, Blase und Ureter) mit den restlichen Gewebeproben. Dabei fanden sie im Vergleich zu den anderen Geweben eine signifikant höhere Expression der MMR-Proteine in diesen HNPCC-Risikogeweben (Plevova et al. 2005).

Neben dem kolorektalen Karzinom sind sicherlich das Endometrium- und Ovarialkarzinom hinsichtlich der MSI und ihrer Ursachen besonders gut erforscht, da bei HNPCC-Patienten diese Karzinome neben dem KRK besonders häufig gefunden werden. In HNPCC-Familien ist das kumulative Risiko eines Ovarialkarzinoms größer als 10%, das eines Endometriumkarzinoms ist sogar größer als 40%. Circa ein bis zwei Prozent aller Ovarialkarzinome treten im Rahmen einer vererbten MMR-Mutation auf. Mit 10% aller ovarialen Karzinome sind die hereditären Ovarialtumoren mit BRAC1- und BRAC2-Mutationen jedoch wesentlich häufiger. Chen et al. zeigten in 22,4% (24 von 107 Fällen) ihrer mucinösen Ovarialtumoren eine hMLH1-Promotorhypermethylierung und in 11,2% (12 von 107) fanden sie eine Mikrosatelliteninstabilität, wobei in 75% dieser Fälle (9 von 12) eine Promotormethylierung vorlag. Insbesondere maligne Karzinome waren mit 36,7% (18 von 49 Fällen) signifikant häufiger hMLH1-promotormethyliert als benigne Tumoren und zeigten in 16,3% der Fälle (8 von 49) eine positive Mikrosatelliteninstabilität. In der Arbeit von Geisler et al. wurden 21 von 125 Ovarialkarzinomen (16,8%) als MSI-H klassifiziert und in zehn dieser 21 Fälle (47,6%) konnte keine hMLH1-mRNA jedoch eine CpG-Hypermethylierung nachgewiesen werden. Alle MSS- und MSH-L-Tumoren zeigten dagegen eine normale hMLH1-Expression (Millar et al. 1999, Chen et al. 2003, Geisler et al. 2003, Shannon et al. 2003, Prat et al. 2005). Bei Endometriumkarzinomen wurde in der Arbeit von Kondo et al. bei acht von 14 Tumoren ein Verlust der hMLH1-Expression gezeigt. Als Ursache wurde für den Großteil dieser Fälle eine Hypermethylierung der Promotorregion nachgewiesen. In einer zweiten Arbeit von Esteller et al. zu diesem Thema wurde bei elf von zwölf MSI-positiven Endometriumkarzinomen (91%; 40% aller 27 Fälle) eine Methylierung der hMLH1-

Promotorregion gefunden, während bei keinem der 15 MSI-negativen Fälle eine solche Methylierung festgestellt wurde. Beim Ovarial- und insbesondere beim Endometriumkarzinom scheint die Hypermethylierung der Promotorregion wie auch beim kolorektalen Karzinom eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung von hMLH1 zu spielen (Esteller et al. 1999, Kondo et al. 2001).

Die Rolle von MMR-Defekten bei der Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) wird hingegen kontrovers diskutiert. So konnten bei HCC des Grades II und III in der Arbeit von Wani et al. bei hMLH1 in 38% der Fälle und bei hMSH2 in 19% der 50 Fälle eine signifikant reduzierte Zahl der exprimierenden Zellen gezeigt werden, während in Grad I Karzinomen die Expression sogar stärker als im umgebenden normalen Lebergewebe war. In einer anderen Studie von Kondo et al. wurde zwar bei acht von 40 Fällen eines HCC (20%) eine MSI festgestellt, jedoch konnte hier bei keinem dieser Fälle eine Promotormethylierung des hMLH1 als Ursache gefunden werden. Dagegen sehen Wang et al. in ihrer Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen einem Defekt des MMR-Systems und der Entstehung eines HCC, denn von ihren 36 Tumoren zeigte keiner eine Instabilität im Marker BAT 26 oder einen immunhistochemischen Verlust der Expression von hMLH1 oder hMSH2 (Kondo et al. 2000, Wang et al. 2001, Wani et al. 2001). Im Unterschied dazu wurde bei zwei Studien mit cholangiolären Karzinomen bei 18 von 72 Fällen (25%) bzw. 29 von 65 Fällen (44,6%) eine hMLH1-Methylierung nachgewiesen, daher scheint bei diesen Karzinomen ein kausaler Zusammenhang zwischen MMR-Genfunktion und Karzinogenese zu bestehen (Yang et al. 2005, Limpaiboon et al. 2005).

Auch bei Karzinomen der Niere und der ableitenden Harnwege gibt es hinsichtlich der MSI und hMLH1-Promotormethylierung sowie ihrer Rolle bei der Karzinogenese unterschiedliche Studienergebnisse. So fanden Furihata et al. in ihrer Studie nur bei zwei von 118 Tumoren (1,7%) des Übergangsepithels eine MSI und Promotormethylierung, Salinas-Sanchez et al. konnten in ihrer Arbeit sogar bei keinem von 65 Nierenzellkarzinomen eine Hypermethylierung des hMLH1 nachweisen. Dagegen fanden Yu et al. bei 15 von 34 Nierenzellkarzinomen (44,1%) eine Mikrosatelliteninstabilität, drei dieser 15 Fälle zeigten keine und weitere drei Fälle eine reduzierte mRNA-Expression (Furihata et al. 2001, Yu et al. 2001, Salinas-Sanchez et al. 2006).

Hinsichtlich der Expression von hMLH1 bei sporadischen Adenokarzinomen des Dünndarms führten Svrcek et al. eine immunhistochemische Microarraystudie mit 27 Tumoren durch. Nur in zwei Fällen (7,4%) fand sich ein hMLH1-Expressionsverlust. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Potter und Kollegen, sie sahen bei zwei von 22 Adenokarzinomen (9%) eine MSI mit fehlender hMLH1-Expression. Brucher et al. untersuchten die Methylierung verschiedener Gene und postulierten, dass eine hMLH1-Hypermethylierung in sporadischen Dünndarmadenokarzinomen häufig auftritt, denn sie fanden in 23% ihrer 56 Fälle eine solche Methylierung. Da Adenokarzinome des Dünndarms zu den eher seltenen Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes gehören, gibt es leider nur wenige Studien mit einem uneinheitlichen Bild hinsichtlich der Bedeutung des hMLH1 (Svrcek et al. 2003, Potter et al. 2004, Brucher et al. 2006).

Bei Magenkarzinomen fanden Honda et al. in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors bei 24% bis 44% der Karzinome einen abnormalen immunhistochemischen Nachweis von hMLH1, Mizoshita beschreibt eine negative Expression bei 16% bis 19% seiner Karzinome. Beim Magenkarzinom wird ähnlich wie bei Kolonkarzinomen in mehreren Studien davon ausgegangen, dass die Hypermethylierung von hMLH1 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Mikrosatelliteninstabilität spielt. So zeigten Fleisher et al. für diesen Zusammenhang ein signifikantes Studienergebnis, denn während 78% der MSI-H- und 75% der MSI-L-Tumoren eine hMLH1-Hypermethylierung zeigten, konnte dies nur bei 2,6% der MSS-Tumoren nachgewiesen werden. Bei Kang et al. waren 95% der MSI- und nur 5,5% der MSS-Karzinome positiv promotormethyliert. Jung et al. fanden sogar bei allen MSI-H-Tumoren ihrer Untersuchungen einen Verlust der Expression von hMLH1 bei gleichzeitiger Hypermethylierung der Promotorregion, auch bei ihnen zeigten aber nur 8% der MSS oder MSI-L-Karzinome dieses Bild (Fleisher et al. 1999, Kang et al. 1999, Jung et al. 2001, Honda et al. 2005, Mizoshita et al. 2005).

Jedoch spielen nicht bei allen Karzinomen MMR-Gendefekte eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese. So konnte in malignen Speicheldrüsenkarzinomen kein Zusammenhang zwischen MMR-Funktionsverlust und der Tumorentstehung gezeigt werden (Castrilli et al. 2002). Auch in Pankreaskarzinomen konnten Kondo et al. keine Hypermethylierung oder den Verlust der Expression von hMLH1 feststellen (Kondo et al. 2000). Beim Mammakarzinom wurde lange Zeit eine Assoziation mit HNPCC diskutiert, jedoch scheint auch hier kein direkter Zusammenhang zu bestehen. So konnte bei einer Studie von 27 Patientinnen mit

synchronen Karzinomen zwar in fünf Fällen eine MSI des KKK, jedoch keine des dazugehörigen Brustdrüsentumors nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in drei anderen Mammakarzinomfällen, bei denen bereits eine MMR-Genmutation bekannt war, keine MSI oder veränderte MMR-Proteinexpression gefunden werden (Risinger et al. 1996, Muller et al. 2002, Yuksel et al. 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für einen Anteil von bis zu 20% vieler sporadischer Karzinome Defekte in den Mismatch-Reparaturgenen als Ursache gefunden werden können. Die Größe dieses Anteils ist nicht nur vom Gewebetyp bzw. Organ des Karzinoms selbst abhängig, sondern oftmals auch vom Differenzierungsgrad des Tumors. Dabei scheint in den meisten Geweben insbesondere das hMLH1 die zentrale Rolle zu spielen, während die anderen MMR-Gene seltener betroffen sind. Mutationen dieser Gene treten insbesondere bei Familien auf, bei denen eine hereditäre Störung wie das HNPCC diagnostiziert werden kann. Bei sporadischen Karzinomen werden eher selten Mutationen des Genoms selbst nachgewiesen, wesentlich häufiger wird eine epigenetische Deaktivierung durch Promotorhypermethylierung gefunden.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt zu den häufigsten malignen Neoplasien des Menschen mit mehr als 70.000 Neuerkrankungen im Jahr allein in Deutschland. Es wird zwischen dem hereditärem KRK mit einer vererbten Genommutation und dem sich meist durch die Adenom-Karzinom-Sequenz entwickelnden sporadischen KRK unterschieden. Für circa 15% der sporadischen KRK wird als alternatives Modell der Tumorgenese die Entwicklung des Karzinoms durch Mikrosatelliteninstabilität bei Verlust der Funktion der Mismatch-Reparaturgene, zu denen auch das hMLH1 gehört, angesehen. Dieser Funktionsverlust kann durch eine Mutation oder durch epigenetische Veränderungen wie Hypermethylierungen der Promotorregion entstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunhistochemische Expression von hMLH1 und die Hypermethylierung der Promotorregion des hMLH1 bei sporadischen kolorektalen Karzinomen anhand eines Magdeburger Patientenkollektivs von 154 Fällen untersucht. Von 147 Patienten wurden aus dem Paraffingewebe der Tumoren und bei 118 Fällen zusätzlich aus dem zugehörigen Nichttumorgewebe Tissue Microarrays zur immunhistochemischen Untersuchung der Proteinexpression von hMLH1 angefertigt und gefärbt. Bei 63 Fällen wurde mit der aus tiefgefrorenem Tumorgewebe extrahierten DNA eine molekularbiologische Untersuchung des Methylierungsstatus der Promotorregion von hMLH1 durchgeführt. Dafür wurde eine Busilfidbehandlung mit anschließender methylierungsspezifischer PCR und Elektrophorese durchgeführt. Bei Tumoren mit nachgewiesener Hypermethylierung wurde außerdem der Status der Mikrosatellitenstabilität untersucht. Während das Nichttumorgewebe in 100% eine positive Proteinexpression des hMLH1 zeigte, konnte bei 25 sporadischen kolorektalen Karzinomen keine Expression beobachtet werden. Bei 23 dieser Patienten war Nichttumorgewebe zum direkten Vergleich vorhanden, nur diese Fälle wurden statistisch gewertet. Immunhistochemisch zeigte sich daher eine Deaktivierung der hMLH1-Proteinexpression bei 16,3% der Fälle. Diese 23 hMLH1-negativen Tumorpatienten besaßen signifikant mehr Fernmetastasen ($p=0,018$) als die hMLH1-positive Vergleichsgruppe, waren somit tendenziell mehr im Stadium IV nach UICC-Kriterien ($p=0,071$) und waren beim Durchschnittsalter um 4,6 Jahre älter ($p=0,074$). Signifikante Unterschiede bei der Lokalisation der Karzinome, der Geschlechtsverteilung sowie den anderen TNM-Kriterien und dem Differenzierungsgrad wurden nicht gefunden. Für die Validierung der Tissue Microarrays waren 97,3% (143 von 147 Fällen) auswertbar. Bei allen 25 negativen und bei 70

positiven Fällen waren alle vier Gewebestanzungen homogen gefärbt und auswertbar (66,4%). Bei 27 Fällen (18,9%) waren drei Stanzungen positiv, zwei Stanzungen waren bei 14 Fällen positiv (9,8%) und nur in sieben Fällen war lediglich eine Microarraystanzung als positiv auswertbar (4,9%). Eine Hypermethylierung der hMLH1-Promotorregion wurde bei sechs von 63 Fällen (9,5%) nachgewiesen. Frauen waren mit fünf Fällen tendenziell häufiger von der Methylierung betroffen als Männer ($p=0,066$), auch das Durchschnittsalter der Patienten mit positiver Hypermethylierung war um 6,2 Jahren höher ($p=0,056$). Adipositas lag anamnestisch sogar signifikant häufiger bei positiver Promotormethylierung vor. Bei den TNM-Klassifikationskriterien, dem Grading und Staging sowie der Tumorlokalisation bestanden keine signifikanten Unterschiede. Bei der Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität waren zwei der sechs methylierten Fälle mikrosatellitenstabil während vier Fälle bei allen fünf Bethesda-Primerpanelmarkern eine Instabilität zeigten. 55 Patienten wurden sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch analysiert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,002$) zwischen der fehlenden Expression und positiver Promotorhypermethylierung von hMLH1. Bei sieben Fällen (12,7%) konnte trotz fehlender Hypermethylierung des Promotors keine hMLH1-Expression nachgewiesen werden. In 42 Fällen (76,4%) wurde keine Methylierung dokumentiert und eine positive hMLH1-Expression der Tumorzellen wurde gefunden. In vier Fällen (7,3%) war die DNA positiv methyliert und der Tumor zeigte keine Expression von hMLH1. Bei zwei Patienten (3,6%) wurde trotz positiver DNA-Methylierung weiterhin hMLH1 in den Tumorzellen exprimiert. Bei 66,7% aller Tumoren mit positiver Promotormethylierung fand sich eine fehlende hMLH1-Expression. Hinsichtlich der TNM-Klassifikation, dem Grading, dem UICC-Stadium sowie der Lokalisation des Primärtumors und dem Geschlecht der Patienten fanden sich auch hier keine signifikanten Häufungen.

Zusammenfassend konnten die hier vorgestellten Untersuchungen den signifikanten Zusammenhang von hMLH1-Promotormethylierung und fehlender hMLH1-Expression bei sporadischen kolorektalen Karzinomen demonstrieren. Außerdem zeigte sich, dass Vier-Stanzungen-Microarrays eine zuverlässige Methode für die Screeninguntersuchung der hMLH1-Expression darstellen. Um die genaue Rolle des hMLH1 bei der Tumorgenese und die alternativen Ursachen der Deaktivierung dieses Gens aufzuspüren sind weitere Untersuchungen und Vergleichsstudien mit Adenomen sowie hereditären Karzinomen notwendig. Auch bleibt noch zu erforschen, welcher Zusammenhang zwischen hMLH1 und der Aktivierung bzw. Deaktivierung anderer Gene in sporadischen KKR besteht.

I. Literaturverzeichnis

- [1] Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 260. 812-6 (1993)
- [2] Arnold CN, Goel A, Compton C, Marcus V, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Inoue T, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter hypermethylation in defining the MSI phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*. 3. 73-8 (2004)
- [3] Asano T, McLeod RS: Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev*. CD003430 (2002)
- [4] Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, Iacozio-Dononue C, Carethers JM, Goel A, Boland CR, Giardiello FM: Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer*. 116. 914-9 (2005)
- [5] Baudhuin LM, Ferber MJ, Winters JL, Steenblock KJ, Swanson RL, French AJ, Butz ML, Thibodeau SN: Characterization of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in Lynch syndrome patients. *Gastroenterology*. 129. 846-54 (2005)
- [6] Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M, Roncari B, Maffei S, Rossi G, Ponti G, Santini A, Losi L, Di Gregorio C, Oliani C, Ponz de Leon M, Lanza G: Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res*. 11. 8332-40 (2005)
- [7] Bestor TH: The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 9. 2395-402 (2000)
- [8] Bevilacqua RA, Simpson AJ: Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*. 87. 200-3 (2000)
- [9] Bocker T, Schlegel J, Kullmann F, Stumm G, Zirngibl H, Epplen JT, Ruschoff J: Genomic instability in colorectal carcinomas: comparison of different evaluation methods and their biological significance. *J Pathol*. 179. 15-9 (1996)
- [10] Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doeberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert HK, Wirtz HC, Fishel R, Ruschoff J: Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res*. 57. 4739-43 (1997)
- [11] Boyes J, Bird A: Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*. 11. 327-33 (1992)
- [12] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al.: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 368. 258-61 (1994)

- [13] Brucher BL, Geddert H, Langner C, Hofler H, Fink U, R Siewert J, Sarbia M: Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14(ARF), p16(INK4A) and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. *Int J Cancer*. Epub ahead of print (2006)
- [14] Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH: Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*. 12. 2641-9 (1996)
- [15] Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J: Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr Hosp*. 20. 18-25 (2005)
- [16] Casimiro C: Etiopathogenic factors in colorectal cancer. Genetic and clinical features. *Nutr Hosp*. 17. 63-71 (2002)
- [17] Caspari R, Jungck M, Lamberti C, Schmidt-Wolf IG, Friedl W, Propping P: The diagnosis of hereditary colorectal carcinomas. *Dtsch Med Wochenschr*. 125. 153-8 (2000)
- [18] Castrilli G, Fabiano A, La Torre G, Marigo L, Piantelli C, Perfetti G, Ranelletti FO, Piantelli M: Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. 31. 234-8 (2002)
- [19] Catalano T, Curia MC, Aceto G, Verginelli F, Cascinu S, Cama A, Mariani-Costantini R, Teti D, Battista P: Mutations in the p53 and Ki-ras genes, microsatellite instability and site of tumor origin in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 14. 625-31 (2005)
- [20] Chai SM, Zeps N, Shearwood AM, Grieco F, Charles A, Harvey J, Goldblatt J, Joseph D, Iacopetta B: Screening for defective DNA mismatch repair in stage II and III colorectal cancer patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2. 1017-25 (2004)
- [21] Chen HZ, Ye DF, Xie X, Hu M, Lu WG: Hypermethylation of hMLH1 and microsatellite instability in ovarian mucinous tumors. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 25. 457-61 (2003)
- [22] Chuong CM, Jiang TX, Yin E, Widelitz RB: cDCC (chicken homologue to a gene deleted in colorectal carcinoma) is an epithelial adhesion molecule expressed in the basal cells and involved in epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Biol*. 164. 383-97 (1994)
- [23] Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W: Imprinting mechanisms. *Genome Res*. 8. 881-900 (1998)
- [24] Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C, Kubly V, Nelson H, Michels VV, Thibodeau SN: The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet*. 69. 780-90 (2001)
- [25] Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res*. 59. 2029-33 (1999)

- [26] Deng G, Nguyen A, Tanaka H, Matsuzaki K, Bell I, Mehta KR, Terdiman JP, Waldman FM, Kakar S, Gum J, Crawley S, Sleisenger MH, Kim YS: Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 118. 2999-3005 (2006)
- [27] Esteller M, Catusas L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG: hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol*. 155. 1767-72 (1999)
- [28] Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 247. 49-56 (1990a)
- [29] Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61. 759-67 (1990b)
- [30] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 75. 1027-38 (1993)
- [31] Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ: Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 59. 1090-5 (1999)
- [32] Friedrich A, Kullmann F: Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms. *Med Klin (Munich)*. 98. 776-82 (2003)
- [33] Furihata M, Takeuchi T, Ohtsuki Y, Terao N, Kuwahara M, Shuin T: Genetic analysis of hMLH1 in transitional cell carcinoma of the urinary tract: promoter methylation or mutation. *J Urol*. 165. 1760-4 (2001)
- [34] Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE: Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer*. 98. 2199-206 (2003)
- [35] Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P: Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* 273. 19895-901 (1998)
- [36] Gervaz P, Bucher P, Neyroud-Caspar I, Soravia C, Morel P: Proximal location of colon cancer is a risk factor for development of metachronous colorectal cancer: a population-based study. *Dis Colon Rectum*. 48. 227-32 (2005)
- [37] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI: Krebs in Deutschland, 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. pp. 32-35. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut (RKI). Saarbrücken 2006.

- [38] Goh KL, Quek KF, Yeo GT, Hilmi IN, Lee CK, Hasnida N, Aznan M, Kwan KL, Ong KT: Colorectal cancer in Asians: a demographic and anatomic survey in Malaysian patients undergoing colonoscopy. *Aliment Pharmacol Ther.* 22. 859-64 (2005)
- [39] Gomez A, Salguero G, Garcia H, Aristizabal F, Gutierrez O, Angel LA, Padron J, Martinez C, Martinez H, Malaver O, Barvo R, Giraldo A: Detection mutations in the DNA mismatch repair genes of hMLH1 and hMSH2 genes in Colombian families with suspicion of hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Biomedica.* 25. 315-24 (2005)
- [40] Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 66. 589-600 (1991)
- [41] Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J: Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer.* 21. 233-300 (1997)
- [42] Hamilton SR, Aaltonen LA: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. pp 104-119. IARC Press. Lyon 2000.
- [43] Hatch SB, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, Sciarrotta J, Funkhouser WK, Farber RA: Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res.* 11. 2180-7 (2005)
- [44] Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95. 6870-5 (1998)
- [45] Hermanek P, Fruhmorgen P, Guggenmoos-Holzmann I, Altendorf A, Matek W: The malignant potential of colorectal polyps-a new statistical approach. *Endoscopy.* 15. 16-20 (1983)
- [46] Holliday R: DNA methylation and epigenetic mechanisms. *Cell Biophys.* 15. 15-20 (1989)
- [47] Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C: MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev.* 9. 1728-39 (1995)
- [48] Honda T, Tamura G, Endoh Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T: Expression of tumor suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach. *Jpn J Clin Oncol.* 35. 580-6 (2005)
- [49] Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, van de Rijn M, Gilks CB: Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 15. 1374-80 (2002)
- [50] Iino H, Simms L, Young J, Arnold J, Winship IM, Webb SI, Furlong KL, Leggett B, Jass JR: DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut.* 47. 37-42 (2000)

- [51] Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B: Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*. 42. 673-9 (1998)
- [52] Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science*. 293. 1074-80 (2001)
- [53] Jung HY, Jung KC, Shim YH, Ro JY, Kang GH: Methylation of the hMLH1 promoter in multiple gastric carcinomas with microsatellite instability. *Pathol Int*. 51. 445-51 (2001)
- [54] Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 57. 808-11 (1997)
- [55] Kang GH, Shim YH, Ro JY: Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest*. 79. 903-9 (1999)
- [56] Kautiainen TL, Jones PA: DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem*. 261. 1594-8 (1986)
- [57] Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87. 159-70 (1996)
- [58] Knudson AG Jr: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68. 820-3 (1971)
- [59] Knudson AG: Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*. 122. 135-40 (1996)
- [60] Kohonen-Corish M, Ross VL, Doe WF, Kool DA, Edkins E, Faragher I, Wijnen J, Khan PM, Macrae F, St John DJ: RNA-based mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Hum Genet*. 59. 818-24 (1996)
- [61] Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Morrison PT, Finan PJ, Burn J, Chapman P, Earabino C, Merchant E, et al.: Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for mlh1 mutations. *Cancer Res*. 55. 242-8 (1995)
- [62] Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MR, Morrison P, Wirth L, Finan PJ, Burn J, Chapman P: Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations. *Genomics*. 24. 516-26 (1994)
- [63] Kondo E, Furukawa T, Yoshinaga K, Kijima H, Semba S, Yatsuoka T, Yokoyama T, Fukushige S, Horii A: Not hMSH2 but hMLH1 is frequently silenced by hypermethylation in endometrial cancer but rarely silenced in pancreatic cancer with microsatellite instability. *Int J Oncol*. 17. 535-41 (2000)
- [64] Kondo E, Horii A, Fukushige S: The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res*. 29. 1695-702 (2001)

- [65] Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S: Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis--A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 32. 970-9 (2000)
- [66] Kullmann F, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J: Microsatellite instability - a new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors. *Z Gastroenterol*. 34. 813-22 (1996)
- [67] Kumar B, De Silva M, Venter DJ, Armes JE: Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology*. 36. 295-300 (2004)
- [68] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*. 94. 2545 (1997)
- [69] Li H, Myeroff L, Kasturi L, Krumroy L, Schwartz S, Willson JK, Stanbridge E, Casey G, Markowitz S: Chromosomal autonomy of hMLH1 methylation in colon cancer. *Oncogene*. 21. 1443-9 (2002)
- [70] Limpaboon T, Khaenam P, Chinnasri P, Soonklang M, Jearanaikoon P, Sripa B, Pairojkul C, Bhudhisawasdi V: Promoter hypermethylation is a major event of hMLH1 gene inactivation in liver fluke related cholangiocarcinoma. *Cancer Lett*. 217. 213-9 (2005)
- [71] Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA: A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer*. 3. 28 (2004)
- [72] Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjold M: Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet*. 5. 279-82 (1993)
- [73] Lippman Z, Martienssen R: The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*. 431. 364-70 (2004)
- [74] Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA: Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*. 61. 4545-9 (2001)
- [75] Luchtenborg M, Weijenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, de Bruine AP, van den Brandt PA, de Goeij AF: Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 5. 160 (2005)
- [76] Lynch HT, Casey MJ, Shaw TG, Lynch JF: Hereditary Factors in Gynecologic Cancer. *Oncologist*. 3. 319-338 (1998)
- [77] Magewu AN, Jones PA: Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Mol Cell Biol*. 14. 4225-32 (1994)

- [78] Mai V, Flood A, Peters U, Lacey JV Jr, Schairer C, Schatzkin A: Dietary fibre and risk of colorectal cancer in the Breast Cancer Detection Demonstration Project (BCDDP) follow-up cohort. *Int J Epidemiol.* 32. 234-9 (2003)
- [79] Malumbres M, Pellicer A: RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* 3. 887-912 (1998)
- [80] Marti TM, Kunz C, Fleck O: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* 191. 28-41 (2002)
- [81] Michalopoulos NV, Saetta AA, Lazaris AC, Gigelou F, Koilakou S, Patsouris E: Microsatellite instability in sporadic and inherited colon adenocarcinomas from Greek patients: correlation with several clinicopathological characteristics. *Acta Gastroenterol Belg.* 68. 294-301 (2005)
- [82] Millar AL, Pal T, Madlensky L, Sherman C, Temple L, Mitri A, Cheng H, Marcus V, Gallinger S, Redston M, Bapat B, Narod S: Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum Mol Genet.* 8. 823-9 (1999)
- [83] Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H: Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 156. 885-902 (2002)
- [84] Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H: Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2. 147-56 (2004)
- [85] Mizoshita T, Tsukamoto T, Cao X, Otsuka T, Ito S, Takahashi E, Nakamura S, Nakamura T, Yamamura Y, Tatematsu M: Microsatellite instability is linked to loss of hMLH1 expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer.* 8. 164-72 (2005)
- [86] Morson B: President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med.* 67. 451-7 (1974)
- [87] Muller A, Edmonston TB, Corao DA, Rose DG, Palazzo JP, Becker H, Fry RD, Rueschoff J, Fishel R: Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res.* 62. 1014-9 (2002)
- [88] Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG: Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* 58. 591-3 (1998)
- [89] Narayan S, Roy D: Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer.* 2. 41 (2003)
- [90] Neagoe A, Molnar AM, Acalovschi M, Seicean A, Serban A: Risk factors for colorectal cancer: an epidemiologic descriptive study of a series of 333 patients. *Rom J Gastroenterol.* 13. 187-93 (2004)
- [91] Ng HH, Bird A: DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev.* 9. 158-63 (1999)

- [92] Okuda T, Kawakami K, Ishiguro K, Oda M, Omura K, Watanabe G: The profile of hMLH1 methylation and microsatellite instability in colorectal and non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med.* 15. 85-90 (2005)
- [93] Pedroni M, Sala E, Scarselli A, Borghi F, Menigatti M, Benatti P, Percesepe A, Rossi G, Foroni M, Losi L, Di Gregorio C, De Pol A, Nascimbeni R, Di Betta E, Salerni B, de Leon MP, Roncucci L: Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 61. 896-9 (2001)
- [94] Plevova P, Sedlakova E, Zapletalova J, Krepelova A, Skypalova P, Kolar Z: Expression of the hMLH1 and hMSH2 proteins in normal tissues: relationship to cancer predisposition in hereditary non-polyposis colon cancer. *Virchows Arch.* 446. 112-9 (2005)
- [95] Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M: Causes of microsatellite instability in colorectal tumors: implications for hereditary non-polyposis colorectal cancer screening. *Cancer Genet Cytogenet.* 126. 85-96 (2001)
- [96] Potter DD, Murray JA, Donohue JH, Burgart LJ, Nagorney DM, van Heerden JA, Plevak MF, Zinsmeister AR, Thibodeau SN: The role of defective mismatch repair in small bowel adenocarcinoma in celiac disease. *Cancer Res.* 64. 7073-7 (2004)
- [97] Prat J, Ribe A, Gallardo A: Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol.* 36. 861-70 (2005)
- [98] Reinacher-Schick A, Schmiegler W: Pathogenesis of colorectal carcinoma. *Schweiz Rundsch Med Prax.* 91. 1589-93 (2002)
- [99] Rice JC, Allis CD: Code of silence. *Nature.* 414. 258-61 (2001)
- [100] Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J: Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer.* 77. 1836-43 (1996)
- [101] Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 89. 1758-62 (1997)
- [102] Rodriguez-Moranta F, Castells A, Andreu M, Pinol V, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Jover R, Paya A, Bessa X, Balaguer F, Cubiella J, Arguello L, Morillas JD, Bujanda L; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association: Clinical performance of original and revised Bethesda guidelines for the identification of MSH2/MLH1 gene carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer: proposal of a new and simpler set of recommendations. *Am J Gastroenterol.* 101. 1104-11 (2006)
- [103] Ruschoff J, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstadter F: Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology? *Pathologe.* 19. 269-78 (1998)

- [104] Salinas-Sanchez AS, Rubio-del-Campo A, Sanchez-Sanchez F, Gimenez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ, Garcia-Olmo DC, Escribano-Martinez J: Promoter hypermethylation status of the mismatch repair gene hMLH1 in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Med Clin (Barc)*. 126. 452-4 (2006)
- [105] Sanchez de Abajo A, de la Hoya M, van Puijenbroek M, Godino J, Diaz-Rubio E, Morreau H, Caldes T: Dual role of LOH at MMR loci in hereditary non-polyposis colorectal cancer? *Oncogene*. 25. 2124-30 (2006)
- [106] Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H, Roessner A: Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol*. 23. 1009-13 (2003)
- [107] Schneider-Stock R, Kuester D, Ullrich O, Mittag F, Habold C, Boltze C, Peters B, Krueger S, Hintze C, Meyer F, Hartig R, Roessner A: Close localization of DAP-kinase positive tumour-associated macrophages and apoptotic colorectal cancer cells. *J Pathol*. 209. 95-105 (2006)
- [108] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*. 5. 1966-75 (1999)
- [109] Seo SB, Macfarlan T, McNamara P, Hong R, Mukai Y, Heo S, Chakravarti D: Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J Biol Chem*. 277. 14005-10 (2002)
- [110] Shannon C, Kirk J, Barnetson R, Evans J, Schnitzler M, Quinn M, Hacker N, Crandon A, Harnett P: Incidence of microsatellite instability in synchronous tumors of the ovary and endometrium. *Clin Cancer Res*. 9. 1387-92 (2003)
- [111] Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89. 4495-9 (1992)
- [112] Singal R, Ginder GD: DNA methylation. *Blood*. 93. 4059-70 (1999)
- [113] Song YM, Yuan Y, Zheng S: Hypermethylation of hMLH1 promoter in sporadic colorectal cancer. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 33. 395-8 (2004)
- [114] Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD: Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 365. 274-6 (1993)
- [115] Strul H, Kariv R, Leshno M, Halak A, Jakubowicz M, Santo M, Umansky M, Shirin H, Degani Y, Revivo M, Halpern Z, Arber N: The prevalence rate and anatomic location of colorectal adenoma and cancer detected by colonoscopy in average-risk individuals aged 40-80 years. *Am J Gastroenterol*. 101. 255-62 (2006)
- [116] Svrcek M, Jourdan F, Sebbagh N, Couvelard A, Chatelain D, Mourra N, Olschwang S, Wendum D, Flejou JF: Immunohistochemical analysis of adenocarcinoma of the small intestine: a tissue microarray study. *J Clin Pathol*. 56. 898-903 (2003)

- [117] Tamura T, Aoyama N, Saya H, Haga H, Futami S, Miyamoto M, Koh T, Ariyasu T, Tachi M, Kasuga M, et al.: Induction of Fas-mediated apoptosis in p53-transfected human colon carcinoma cells. *Oncogene*. 11. 1939-46 (1995)
- [118] Taylor I, Goldberg S, Garcia-Agiular J: *Fast Facts – Colorectal Cancer*. p. 13. Health Press Limited. Oxford 1999.
- [119] Tomlinson IP, Ilyas M, Bodmer WF: Allele loss occurs frequently at hMLH1, but rarely at hMSH2, in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. 74. 1514-7 (1996)
- [120] Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 96. 261-8 (2004)
- [121] van Hogezaand RA, Eichhorn RF, Choudry A, Veenendaal RA, Lamers CB: Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction? *Scand J Gastroenterol Suppl*. 48-53 (2002)
- [122] Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 116. 1453-6 (1999)
- [123] Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD: Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95. 8698-702 (1998)
- [124] Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH: Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 20. 116-7 (1998)
- [125] Wang L, Bani-Hani A, Montoya DP, Roche PC, Thibodeau SN, Burgart LJ, Roberts LR: hMLH1 and hMSH2 expression in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 19. 567-70 (2001)
- [126] Wang Y, Fischle W, Cheung W, Jacobs S, Khorasanizadeh S, Allis CD: Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp*. 259. 3-17 (2004)
- [127] Wani Y, Notohara K, Tsukayama C, Okada S: Reduced expression of hMLH1 and hMSH2 gene products in high-grade hepatocellular carcinoma. *Acta Med Okayama*. 55. 65-71 (2001)
- [128] Waterworth A, Horgan K, Speirs V, Hanby AM: Tissue microarrays--big potential from small samples. *Int J Oncol*. 25. 167-71 (2004)
- [129] Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 44. 388-96 (1989)
- [130] Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF: Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96. 10296-301 (1999)

- [131] Wijnen J, Khan PM, Vasen H, van der Klift H, Mulder A, van Leeuwen-Cornelisse I, Bakker B, Losekoot M, Moller P, Fodde R: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet.* 61. 329-35 (1997)
- [132] Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F: *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* 6. Auflage. pp. 66-70. Springer-Verlag. Berlin 2002.
- [133] Wright CL, Stewart ID: Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 27. 1393-406 (2003)
- [134] Yang AS, Shen JC, Zingg JM, Mi S, Jones PA: HhaI and HpaII DNA methyltransferases bind DNA mismatches, methylate uracil and block DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 23. 1380-7 (1995)
- [135] Yang B, House MG, Guo M, Herman JG, Clark DP: Promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *Mod Pathol.* 18. 412-20 (2005)
- [136] Yu L, Tang D, Ding Y: Microsatellite instability in renal cell carcinoma and its mechanisms. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 23. 11-3 (2001)
- [137] Yuksel E, Ozer E, Kizildag S, Sercan O, Canda T, Sakizli M: Microsatellite instability is not a common feature in medullary breast cancer. *Breast.* 11. 473-7 (2002)

II. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner, Direktor des Institutes für Pathologie und Dekan der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut zu verfassen.

Besonderer Dank gilt Frau HD Dr. rer. nat. habil. R. Schneider-Stock für die Überlassung des Themas, die persönliche Betreuung während der Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie für die zahlreichen Anregungen und die kritische Begleitung bei der Umsetzung dieser Dissertation.

Außerdem danke ich Frau Dr. med. D. Küster für das zur Verfügung stellen der Tissue Microarrays sowie der klinisch-pathologischen Daten und für die Unterstützung bei der Auswertung und Dokumentation der immunhistologischen Schnitte.

Für die große Hilfsbereitschaft bei den molekularbiologischen Arbeiten möchte ich Frau Scharfenort und den Mitarbeiterinnen des DNA-Labors danken. Gleichermaßen gilt mein Dank Frau Kügler und den Mitarbeiterinnen des Immunhistologielabors für die Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Partnerin danke ich dafür, dass sie mich stets in jeder Hinsicht unterstützt und motiviert haben, nicht nur während der Arbeit an dieser Dissertation sondern auch während des gesamten Studiums. Ihnen gilt auch mein Dank für das Korrekturlesen der Manuskripte.

III. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Alterationen des Mismatch-Reparaturgens hMLH1 bei sporadischen kolorektalen
Karzinomen - eine molekularbiologische und immunhistochemische Analyse**

am Institut für Pathologie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 25.07.2006

Ulf Pommrich

VI. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Ulf Karsten Pommrich, geboren am 23.05.1980 in Osterburg / Altmark

SCHULISCHE AUSBILDUNG / WEHRDIENST

09/1991 – 07/1998 Markgraf-Albrecht-Gymnasium in Osterburg
07/1998 – 07/1999 Wehrdienst in Nienburg/Weser

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

10/1999 – 11/2005 Studium der Humanmedizin
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
10/1999 – 09/2001 Vorklinischer Studienabschnitt
10/2001 – 09/2004 Klinischer Studienabschnitt
09/2004 – 09/2005 Praktisches Jahr
1. Innere Medizin - Kansas University Medical Center, Kansas
City, USA, DAAD Austauschprogramm
2. Orthopädie - Universitätsklinikum Magdeburg
3. Unfallchirurgie - Universitätsklinikum Magdeburg
Herz-Thorax-Chirurgie - Universitätsklinikum Magdeburg
11/2005 Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote „gut“
11/2005 Approbation als Arzt
11/2005 – 05/2006 Promotionsstudent, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

seit 06/2006 Assistenzarzt an der Klinik für Erkrankungen des
Bewegungsapparates (Orthopädie und Traumatologie),
Pfeiffersche Stiftungen Magdeburg

Magdeburg, den 25.07.2006

T – Primärtumor	
T X	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T 0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T is	Carcinoma in situ (Lamina muscularis mucosae nicht durchbrochen)
T 1	Tumor infiltriert Submucosa
T 2	Tumor infiltriert Muskularis propria
T 3	Tumor infiltriert durch die Muskularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T 4	Tumor infiltriert direkt andere Organe oder perforiert das Peritoneum
N – regionäre Lymphknoten	
N X	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N 0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N 1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N 2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M – Fernmetastasen	
M X	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M 0	Keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen
G – Histomorphologisches Grading	
G X	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G I	Gut differenziert
G II	Mäßig differenziert
G III	Schlecht differenziert
G IV	Undifferenziert

Tabelle 1.1. – TNM-Klassifikation und Grading kolorektaler Tumore (Wittekind et al. 2002)

Stadiengruppierung					
UICC Stadium		DUKES	T	N	M
0	0	-	T in situ	N 0	M 0
I	I	A	T1, T2	N 0	M 0
II	II A	B	T3	N 0	M 0
II	II B		T4	N 0	M 0
III	III A	C	T1, T2	N 1	M 0
III	III B		T3, T4	N 1	M 0
III	III C		Jedes T	N 2	M 0
IV	IV	D	Jedes T	Jedes N	M 1

Tabelle 1.2. - Stadieneinteilung des KRK nach Dukes und UICC (Wittekind et al. 2002, Taylor et al. 1999)

Übersicht über das Patientenkollektiv

Fall-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Lok.	Klassifikation					UICC-Stadium	Molekularbiologische Untersuchungen		Immunohistochemische Expression hMLH1	
				p T	p N	p M	G	hMLH1 Methylierung		MSI	Nichttumor	Tumor	
1	80	m	10	4	2	1	3	IV			positiv	positiv	
2	84	w	1	3	0	0	2	IIa				positiv	
3	76	w	1	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv	
4	73	m	1	4	1	0	3	IIIb	negativ		positiv	positiv	
5	54	m	1	3	0	0	3	IIa	negativ		positiv	negativ	
6	74	w	10	2	0	0	2	I	negativ		positiv	positiv	
7	69	w	1	4	0	0	3	IIb			positiv	positiv	
8	61	w	10	4	2	0	3	IIIc			positiv	negativ	
9	73	m	1	2	0	0	2	I			positiv	positiv	
10	58	w	1	1	1	1	1	IV	negativ		positiv	positiv	
11	70	m	8	3	2	0	2	IIIc	negativ		positiv	positiv	
12	64	w	8	3	2	0	2	IIIc			positiv	positiv	
13	64	m	13	4	3	1	3	IV			positiv	positiv	
14	67	w	13	3	0	0	3	IIa			positiv	positiv	
15	47	w	13	4	3	1	2	IV			positiv	negativ	
16	61	m	1	4	2	1	3	IV			positiv	positiv	
17	86	w	1	2	0	1	2	IV			positiv	negativ	
18	85	m	1	2	0	0	2	I	negativ		positiv	positiv	
19	69	m	10	2	0	0	2	I			positiv	positiv	
20	74	w	10	4	1	0	2	IIIb			positiv	positiv	
21	65	m	7	2	0	0	2	I			positiv	positiv	
22	84	w	2	2	0	0	2	I	positiv	positiv	positiv	negativ	
23	65	m	2	3	1	0	2	IIIb	negativ		positiv	negativ	
24	66	w	3	4	0	0	2	IIb			positiv	positiv	
25	80	w	2	4	0	0	2	IIb	positiv	positiv	positiv	negativ	
26	64	w	8	2	1	1	2	IV	negativ		positiv	negativ	
27	68	m	6	4	2	1	2	IV			positiv	negativ	
28	84	w	6	2	1	0	2	IIIa			positiv	positiv	
29	64	w	6	3	0	0	2	IIa	negativ		positiv	positiv	
30	94	w	4	4	1	1	3	IV	positiv	positiv	positiv	negativ	
31	76	m	8	4	1	0	2	IIIb	negativ		positiv	positiv	
32	92	m	9	4	0	0	2	IIb	negativ		positiv	positiv	
33	79	m	7	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv	
34	61	w	7	3	2	1	2	IV	positiv	negativ	positiv	positiv	
35	56	m	7	3	1	1	2	IV			positiv	negativ	
36	58	m	7	2	0	1	1	IV	negativ		positiv	negativ	
37	62	w	7	4	0	1	2	IV			positiv	positiv	
38	73	w	7	3	2	1	1	IV	negativ		positiv	positiv	
39	72	w	7	4	0	0	2	IIb	negativ		positiv	positiv	
40	78	m	8	3	2	0	3	IIIc			positiv	positiv	
41	71	w	8	3	0	1	2	IV	negativ			positiv	
42	85	m	7	4	2	0	2	IIIc			positiv	positiv	
43	74	m	8	3	2	0	2	IIIc	negativ		positiv	positiv	
44	76	m	2	4	2	1	2	IV	negativ		positiv	positiv	
45	63	w	7	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv	
46	57	m	12	2	0	0	2	I	negativ		positiv	positiv	
47	72	m	7	2	0	0	1	I	negativ			positiv	
48	85	m	2	4	2	1	3	IV	negativ		positiv	positiv	
49	63	w	8	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv	
50	52	m	8	4	2	1	2	IV	negativ		positiv	negativ	
51	77	m	8	3	0	0	2	IIa			positiv	negativ	
52	73	m	7	2	0	0	1	I	negativ		positiv	positiv	

Fall-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Lok.	Klassifikation					Molekularbiologische Untersuchungen		Immunhistochemische Expression hMLH1	
				p T	p N	p M	G	UICC-Stadium	hMLH1 Methylierung	MSI	Nichttumor	Tumor
53	75	w	8	4	1	1	3	IV	negativ		positiv	positiv
54	80	m	8	4	0	1	2	IV			positiv	positiv
55	71	w	8	2	0	0	2	I	negativ		positiv	positiv
56	78	m	2	3	0	1	2	IV				negativ
57	81	m	7	2	1	1	2	IV	negativ		positiv	positiv
58	64	m	8	3	1	1	2	IV				positiv
59	61	w	8	4	1	1	2	IV			positiv	positiv
60	76	m	2	3	0	0	3	IIa	negativ		positiv	positiv
61	71	w	4	2	0	0	2	I	negativ		positiv	positiv
62	68	m	10	2	1	1	2	IV	negativ		positiv	positiv
63	69	m	1	4	2	0	3	IIIc	negativ		positiv	
64	79	m	9	3	1	0	2	IIIb				positiv
65	74	w	1	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
66	66	m	8	1	0	0	1	I			positiv	negativ
67	71	m	8	3	2	1	3	IV	positiv	negativ	positiv	negativ
68	95	m	8	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
69	63	w	8	4	2	0	2	IIIc				positiv
70	82	w	8	4	2	1	3	IV			positiv	positiv
71	66	w	7	4	2	1	2	IV				positiv
72	84	w	8	4	2	1	2	IV	negativ		positiv	negativ
73	64	m	8	3	2	1	2	IV			positiv	negativ
74	45	w	1	3	0	0	3	IIa				
75	72	m	9	2	0	0	2	I	negativ			positiv
76	79	w	7	2	0	0	1	I			positiv	positiv
77	89	m	4	4	0	0	2	IIb				positiv
78	85	w	9	3	0	0	2	IIa	negativ			positiv
79	68	m	2	3	0	0	2	IIa	negativ		positiv	positiv
80	60	m	4	2	0	0	2	I			positiv	positiv
81	60	m	8	4	1	1	3	IV	negativ		positiv	positiv
82	95	m	5	3	0	0	1	IIa				positiv
83	77	m	8	2	0	0	2	I			positiv	positiv
84	81	m	2	3	1	0	2	IIIb	negativ		positiv	positiv
85	63	m	7	4	1	1	2	IV			positiv	positiv
86	81	w	1	2	0	0	3	I				positiv
87	78	w	1	2	0	0	2	I	positiv	positiv	positiv	positiv
88	76	m	8	3	2	0	2	IIIc			positiv	positiv
89	65	w	9	2	1	0	3	IIIa	negativ		positiv	positiv
90	61	m	4	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv
91	54	m	6	4	1	0	2	IIIb	negativ		positiv	positiv
92	70	m	8	3	2	0	3	IIIc			positiv	positiv
93	67	m	10	2	0	0	2	I				positiv
94	66	m	2	4	2	1	2	IV	negativ		positiv	positiv
95	66	m	10	3	1	1	2	IV			positiv	positiv
96	83	m	4	3	1	1	2	IV	negativ		positiv	positiv
97	41	w	8	3	0	0	2	IIa			positiv	
98	66	w	4	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv
99	77	m	9	4	0	0	2	IIb			positiv	positiv
100	57	m	8	2	0	0	2	I			positiv	positiv
101	58	w	7	3	2	0	3	IIIc	negativ		positiv	positiv
102	57	w	12	2	0	0	2	I			positiv	positiv
103	67	m	7	4	0	0	3	IIb				positiv
104	65	m	8	4	0	0	2	IIb			positiv	positiv
105	62	m	2	4	0	1	2	IV	negativ			positiv
106	55	m	6	3	0	0	2	IIa	negativ		positiv	positiv
107	60	m	8	3	2	1	3	IV			positiv	positiv

Fall-Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Lok.	Klassifikation					Molekularbiologische Untersuchungen		Immunhistochemische Expression hMLH1	
				p T	p N	p M	G	UICC-Stadium	hMLH1 Methylierung	MSI	Nichttumor	Tumor
108	81	w	2	3	2	0	2	IIIc			positiv	positiv
109	65	m	4	3	2	1	3	IV	negativ		positiv	positiv
110	72	m	7	3	0	0	2	IIa	negativ		positiv	positiv
111	71	w	4	3	2	0	2	IIIc				positiv
112	79	w	8	3	2	0	1	IIIc			positiv	positiv
113	61	m	8	3	0	1	2	IV			positiv	positiv
114	75	m	8	1	0	0	2	I			positiv	positiv
115	75	w	2	3	0	1	3	IV			positiv	positiv
116	84	w	1	3	1	1	3	IV	negativ		positiv	positiv
117	82	w	8	2	0	0	2	I			positiv	positiv
118	97	w	1	3	0	0	2	IIa				positiv
119	73	m	8	3	1	0	2	IIIb				positiv
120	72	m	2	3	2	1	3	IV			positiv	positiv
121	78	w	8	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
122	77	w	8	4	1	1	3	IV			positiv	negativ
123	81	w	1	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
124	65	w	7	4	0	0	3	IIb	negativ		positiv	negativ
125	77	w	8	4	2	0	2	IIIc			positiv	positiv
126	91	m	10	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
127	71	m	8	3	2	1	2	IV				negativ
128	72	w	7	3	0	0	2	IIa			positiv	negativ
129	71	m	8	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv
130	49	w	2	3	0	0	3	IIa			positiv	positiv
131	70	m	8	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv
132	77	m	8	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
133	85	w	9	3	0	0	2	IIa			positiv	
134	75	m	8	3	1	0	2	IIIb			positiv	positiv
135	75	m	8	2	0	0	2	I			positiv	positiv
136	81	w	7	2	1	0	2	IIIa				positiv
137	92	w	7	3	1	1	2	IV			positiv	positiv
138	65	m	8	3	0	0	2	IIa				positiv
139	73	m	8	3	0	0	2	IIa				positiv
140	68	m	8	2	0	0	2	I			positiv	negativ
141	62	w	8	3	0	0	2	IIa			positiv	positiv
142	93	m	7	3	2	0	2	IIIc	negativ		positiv	positiv
143	66	m	8	4	2	1	2	IV				positiv
144	84	w	8	3	0	0	2	IIa	negativ			positiv
145	81	w	8	2	0	0	1	I	negativ		positiv	positiv
146	81	w	2	3	2	0	3	IIIc	negativ		positiv	positiv
147	50	m	9	4	0	0	2	IIb			positiv	negativ
148	88	w	2	4	0	0	2	IIb	negativ			
149	96	m	7	4	0	0	2	IIb	negativ			
150	93	w	4	3	0	0	2	IIa	negativ			
151	54	w	8	2	0	0	2	I	negativ			
152	77	w	4	3	0	1	2	IV	negativ			
153	66	w	7	4	2	1	2	IV	negativ			
154	53	w	2	3	2	1	2	IV	negativ			

Erläuterung zu den Spalten:

1. Fortlaufende Nummer des Falles
2. Alter des Patienten bei der Operation in vollen Jahren
3. Geschlecht: m = männlich; w = weiblich
4. Lokalisation entsprechend der anatomischen Übersicht in Abbildung 3.3.
5. UICC Klassifikation pT = Tumor (pT1 - pT4), pN = Lokale Lymphknotenmetastasen (pN0 - pN2), pM = Fernmetastasen (pM0 - pM1), G = histomorphologisches Grading (G1 - G3), Stadium nach UICC (I - IV)

Übersicht der Auswertung der Tissue Microarrays

Fall Nr.	Nicht-tumor	Tumorgewebestanz				Gesamt
		St.1	St.2	St3	St.4	
1	positiv	1	1	1	1	positiv
2		0	0	1	1	positiv
3	positiv	0	1	1	1	positiv
4	positiv	1	1	1	1	positiv
5	positiv	0	0	0	0	negativ
6	positiv	1	1	1	1	positiv
7	positiv	1	1	1	0	positiv
8	positiv	0	0	0	0	negativ
9	positiv	1	1	1	1	positiv
10	positiv	1	1	1	1	positiv
11	positiv	1	1	1	1	positiv
12	positiv	1	1	1	1	positiv
13	positiv	1	1	1	1	positiv
14	positiv	1	1	1	1	positiv
15	positiv	0	0	0	0	negativ
16	positiv	1	0	1	1	positiv
17	positiv	0	0	0	0	negativ
18	positiv	1	1	1	1	positiv
19	positiv	1	1	1	1	positiv
20	positiv	1	1	1	1	positiv
21	positiv	0	1	1	1	positiv
22	positiv	0	0	0	0	negativ
23	positiv	0	0	0	0	negativ
24	positiv	1	0	0	1	positiv
25	positiv	0	0	0	0	negativ
26	positiv	0	0	0	0	negativ
27	positiv	0	0	0	0	negativ
28	positiv	0	1	1	1	positiv
29	positiv	1	1	1	1	positiv
30	positiv	0	0	0	0	negativ
31	positiv	1	1	1	1	positiv
32	positiv	1	1	1	1	positiv
33	positiv	1	1	1	1	positiv
34	positiv	1	1	1	1	positiv
35	positiv	0	0	0	0	negativ
36	positiv	0	0	0	0	negativ
37	positiv	1	1	1	1	positiv
38	positiv	1	1	1	1	positiv
39	positiv	1	1	0	0	positiv
40	positiv	1	1	1	1	positiv
41		0	1	1	1	positiv
42	positiv	1	1	1	1	positiv
43	positiv	1	1	1	1	positiv
44	positiv	1	1	0	1	positiv
45	positiv	1	1	0	0	positiv
46	positiv	1	1	1	1	positiv
47		1	1	1	1	positiv
48	positiv	1	1	1	1	positiv
49	positiv	1	1	1	0	positiv
50	positiv	0	0	0	0	negativ
51	positiv	0	0	0	0	negativ
52	positiv	1	1	1	1	positiv
53	positiv	1	1	1	1	positiv
54	positiv	1	1	1	1	positiv
55	positiv	1	1	1	1	positiv
56		0	0	0	0	negativ
57	positiv	1	1	0	0	positiv
58		0	1	0	1	positiv
59	positiv	1	0	1	1	positiv
60	positiv	1	1	1	1	positiv
61	positiv	0	1	0	1	positiv
62	positiv	1	1	1	1	positiv
63	positiv	na	na	na	na	
64		1	1	1	1	positiv
65	positiv	na	0	1	1	positiv
66	positiv	0	0	0	0	negativ
67	positiv	0	0	0	0	negativ
68	positiv	1	1	1	1	positiv
69		1	X	1	0	positiv
70	positiv	1	1	1	1	positiv
71		0	1	1	1	positiv
72	positiv	0	0	0	0	negativ
73	positiv	0	0	0	0	negativ
74		na	X	na	na	

Fall Nr.	Nicht-tumor	Tumorgewebestanz				Gesamt
		St.1	St.2	St3	St.4	
75		1	1	1	1	positiv
76	positiv	1	1	1	1	positiv
77		1	1	0	0	positiv
78		1	1	1	1	positiv
79	positiv	1	1	1	0	positiv
80	positiv	1	1	1	1	positiv
81	positiv	1	1	1	1	positiv
82		1	1	1	1	positiv
83	positiv	1	0	1	1	positiv
84	positiv	1	1	1	X	positiv
85	positiv	1	0	1	1	positiv
86		1	1	1	1	positiv
87	positiv	1	na	na	na	positiv
88	positiv	1	1	1	0	positiv
89	positiv	1	1	1	0	positiv
90	positiv	1	1	1	1	positiv
91	positiv	1	1	1	1	positiv
92	positiv	na	X	1	na	positiv
93		1	0	1	1	positiv
94	positiv	1	1	1	1	positiv
95	positiv	1	1	0	0	positiv
96	positiv	1	1	1	1	positiv
97	positiv	na	na	na	na	
98	positiv	1	1	1	0	positiv
99	positiv	0	1	1	1	positiv
100	positiv	1	1	X	1	positiv
101	positiv	1	1	0	0	positiv
102	positiv	1	1	1	1	positiv
103		1	1	1	1	positiv
104	positiv	1	1	1	1	positiv
105		0	1	0	0	positiv
106	positiv	1	1	1	1	positiv
107	positiv	1	1	1	1	positiv
108	positiv	1	1	1	1	positiv
109	positiv	1	1	1	1	positiv
110	positiv	1	1	1	1	positiv
111		1	1	0	1	positiv
112	positiv	1	1	1	1	positiv
113	positiv	1	1	1	0	positiv
114	positiv	1	1	1	0	positiv
115	positiv	1	1	1	1	positiv
116	positiv	na	1	1	0	positiv
117	positiv	1	1	1	1	positiv
118		1	1	1	1	positiv
119		1	0	0	0	positiv
120	positiv	1	1	1	1	positiv
121	positiv	0	0	0	1	positiv
122	positiv	0	0	0	0	negativ
123	positiv	1	1	1	1	positiv
124	positiv	0	0	0	0	negativ
125	positiv	1	1	1	1	positiv
126	positiv	1	1	1	1	positiv
127		0	0	0	0	negativ
128	positiv	0	0	0	0	negativ
129	positiv	X	1	1	1	positiv
130	positiv	1	1	1	1	positiv
131	positiv	1	1	1	1	positiv
132	positiv	1	1	1	1	positiv
133	positiv	na	na	na	na	
134	positiv	1	1	1	1	positiv
135	positiv	1	na	1	1	positiv
136		1	1	1	X	positiv
137	positiv	0	1	0	0	positiv
138		1	1	1	1	positiv
139		0	0	1	X	positiv
140	positiv	0	0	0	0	negativ
141	positiv	1	1	1	1	positiv
142	positiv	1	1	1	1	positiv
143		1	1	1	1	positiv
144		0	1	1	1	positiv
145	positiv	0	1	1	0	positiv
146	positiv	1	1	1	1	positiv
147	positiv	0	0	0	0	negativ

0 = negativ; 1 = positiv; na = nicht auswertbar; X = Stanze fehlt, Fall 56 und 127 statistisch nicht gewertet (fehlender Nichttumor)