

V. Diskussion

1 Expression des p53 Proteins

Die Häufigkeit von 39%, mit der in der vorliegenden Untersuchung eine p53-Expression in muzinösen Kolonkarzinomen detektiert wurde, stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein ^{139 138 140}. Die p53-Expressionsrate in nichtmuzinösen Kolonkarzinomen ist mit 57% niedriger als in den Untersuchungen von Campo und Hanski aber häufiger als in der von Tomoda ¹⁴¹:

Autor (Antikörper)	Nichtmuzinös (n)	Muzinös (n)
Campo (pab 1801) ¹³⁹	73 % (56)	25% (8)
Hanski (CM-1) ¹³⁸	74 % (54)	36 % (22)
Costa (pab 1801) ¹⁴⁰	70 % (30)	25% (8)
Tomoda (CM-1) ¹⁴¹	25 % (138)	50 % (2)
vorliegende Arbeit (CM-1)	57 % (21)	39 % (28)

Tab. 3: Vergleich der Expressionshäufigkeit von p53 Protein in muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen des Kolon (immunhistochemisch nachgewiesen).

Zwischen den 22 untersuchten muzinösen und 18 nichtmuzinösen Brustkarzinomen bestand kein signifikanter Unterschied in der immunhistochemischen Detektierbarkeit von p53 Protein. Auffällig ist die Detektion von p53 Protein in 64% der muzinösen Mammakarzinome in der vorliegenden Arbeit. In den Untersuchungen von Walker ¹⁴², Domagala ⁸⁷, Marchetti ¹⁴³, Varley ¹⁴⁴, Poller ¹⁴⁵ und Davidoff ¹⁴⁶ war bisher keine p53 Proteinexpression in muzinösen Mammakarzinomen nachgewiesen worden:

Autor (Antikörper)	Nichtmuzinös (n)	Muzinös (n)
Davidoff (pAb 421, pAb 1801) ¹⁴⁶	27 % (166)	0 % (2)
Varley (pAb 240, pAb 1801) ¹⁴⁴	59 % (71)	0 % (2)
Walker (pAb 240, pAb 1801) ¹⁴²	58 % (60)	0 % (2)
Poller (pAb 1801) ¹⁴⁵	51 % (74)	0 % (1)
Domagala (CM-1) ⁸⁷	37 % (86)	0 % (7)
Marchetti (pAb 1801) ¹⁴³		0 % (19)
Schimmelpennig (CM-1) ¹⁴⁷	26,5 % (155)	83 % (6)
vorliegende Arbeit (CM-1)	72 % (18)	64 % (22)

Tab. 4: Vergleich der Expressionshäufigkeit von p53 Protein in muzinösen und nichtmuzinösen Mammakarzinomen (immunhistochemisch nachgewiesen).

Allerdings handelte es sich in den Untersuchungen von Walker ¹⁴², Domagala ⁸⁷, Varley ¹⁴⁴, Poller ¹⁴⁵ und Davidoff ¹⁴⁶ um kleine Fallzahlen, es wurden nur ein bis sieben muzinöse Mammakarzinome untersucht. Lediglich die Untersuchung von Marchetti et al. ¹⁴³ hatte mit 19 untersuchten muzinösen Mammakarzinomen einen ähnlich großen Stichprobenumfang wie die vorliegende.

Außer in der vorliegenden Untersuchung wurde nur durch Schimmelpennig et al. eine p53 Überexpression in muzinösen Brustkarzinomen nachgewiesen, und dies sogar in 5 von 6 untersuchten Tumoren ¹⁴⁷.

Die höhere Detektionsrate von p53 Protein in der vorliegenden Untersuchung und in der von Schimmelpennig ist möglicherweise auf eine höhere Sensitivität des CM-1 Antikörpers zurückzuführen. Die in den anderen o.g. Untersuchungen verwandten Antikörper pAb 240 und pAb 1801 haben nach einer Untersuchung Baas von et al. eine niedrigere Spezifität und Sensitivität als der CM-1 Antikörper in der Detektion von überexprimiertem und mutiertem p53 Protein ¹⁴⁸.

Marchetti und Davidoff werteten in ihren Untersuchungen nur Schnitte als positiv für p53-Expression, wenn alle malignen Zellen der Tumorgewebeschnitte intensiv gefärbt waren ^{143 146}. Domagala et al. werteten nur Schnitte als positiv, wenn mehr als 10% der malignen Zellen gefärbt waren ⁸⁷. Im Gegensatz dazu existiert in dieser und in der Untersuchung von Schimmelpennig et al. kein *cut-off level* ¹⁴⁷. Bei Anlegen des Bewertungsmaßstabes von Marchetti et al. für eine positive Färbung

würde in der vorliegenden Untersuchung nur ein muzinöses Mammakarzinom eine positive Färbung aufweisen. Nach Baas et al. steigt die Sensitivität der Immunhistochemie mit dem anti-p53 Antikörper DO-7 für die Detektion von p53 Mutationen von 67% auf 89%, wenn man zusätzlich zu den Schnitten mit einer hohen Prozentzahl an gefärbten Zellen auch diejenigen Schnitte als positiv bewertet, die eine niedrige Prozentzahl gefärbter Zellen aufweisen bei einer Spezifität von 60 % ¹⁴⁸.

Die in der folgenden Tabelle zusammengefassten Untersuchungsergebnisse von Renninson ¹⁴⁹, Henriksen ¹⁵⁰, Kappes ¹⁵¹ und Klemi ¹⁵² zeigen alle eine signifikant seltenere p53-Proteinexpression in muzinösen als in nichtmuzinösen Ovarkarzinomen:

Autor (Antikörper)	Nichtmuzinös (n)	Muzinös (n)
Bosari (pAb 1801) ¹⁵³	50 % (50)	35 % (17)
Renninson (CM-1) ¹⁴⁹	72 % (25)	25 % (12)
Henriksen (pAb 1801) ¹⁵⁰	55 % (20)	27 % (11)
Kappes (Ab-6) ¹⁵¹	55 % (20)	0 % (5)
Klemi (DO-7) ¹⁵²	57 % (75)	0 % (8)
vorliegende Arbeit (CM-1)	69,5 % (23)	56 % (16)

Tab. 5: Vergleich der Expressionshäufigkeit von p53 Protein in muzinösen und nichtmuzinösen Ovarkarzinomen, immunhistochemisch nachgewiesen.

Drei Analysen der Mutationshäufigkeit von p53 in Ovarkarzinomen belegen ebenfalls deutlich seltenere p53-Mutationen in muzinösen Ovarkarzinomen als in nichtmuzinösen ^{88, 154, 155}.

Dieser Unterschied in der p53-Proteinexpression zwischen muzinösen und nichtmuzinösen Ovarkarzinomen ließ sich in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Sowohl die vorliegende Untersuchung als auch die von Bosari et al., die sich beide durch einen sehr viel größeren Stichprobenumfang auszeichnen als die oben genannten, können zwar den Trend bestätigen dass muzinöse Ovarkarzinome seltener p53-Expression aufweisen, dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz ¹⁵³. Die muzinösen Pankreaskarzinome zeigten in der vorliegenden Untersuchung sogar eine häufigere p53-Expressionsrate als die

nichtmucinösen. Dieses Ergebnis ist unterschiedlich zu dem von Hoshi et al., der in keinem von sechzehn untersuchten Muzin produzierenden Tumoren immunhistochemisch eine p53-Expression detektierte⁸⁹.

Fléjou et al. wiesen jedoch in 60% der untersuchten mucinösen Pankreaskarzinome eine p53-Expression nach¹⁵⁶.

Autor (Antikörper)	Nichtmucinös (n)	Mucinös (n)
Hoshi (CM-1) ⁸⁹	15 % (20)	0 % (16)*
Fléjou (DO-7) ¹⁵⁶	0 % (18) **	60 % (10)***
vorliegende Arbeit (CM-1)	32 % (25)	41 % (14)

Tab. 6: Vergleich der Expressionshäufigkeit von p53 Protein in mucinösen und nicht-mucinösen Pankreaskarzinomen (immunhistochemisch nachgewiesen). * 10 intraduktale papilläre Adenokarzinome und 6 intraduktale papilläre Adenome, **seröse Zystadenome, ***5 Zystadenokarzinome, 5 intraduktale papillär-mucinöse Adenokarzinome.

In der histologischen Klassifizierung der exokrinen Pankreastumore hat sich eine Untergruppierung der „Muzin-produzierenden Tumore“ in die Gruppen a) Mucinöse zystische Tumore und b) intraduktal papillär-mucinöse Tumore durchgesetzt. In beiden Gruppen gibt es Tumore in benignen, „borderline“- und malignen Stadien.

In der Untersuchung von Fléjou wird deutlich dass die p53-Proteinexpression mit der Progression von benignem zum malignen mucinösen Muzin-produzierenden Pankreastumor assoziiert ist: es fand sich in keinem Fall der 20 untersuchten benignen oder Borderline-Pankreastumore eine detektierbare p53-Proteinexpression, jedoch sowohl in den mucinösen Zystadenokarzinomen (4 von 5 positiv) als auch in den intraduktalen papillär-mucinösen Adenokarzinomen (2 von 5 positiv). Die Ergebnisse der Untersuchung von Fléjou und der vorliegenden Untersuchung können eine mit dem mucinösen Phänotyp assoziierte seltenere p53-Proteinexpression nicht bestätigen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse in Verbindung mit den Literaturdaten die Limitationen des immunhistochemischen Verfahrens zur Bestimmung der p53-Expression. Lediglich bei den Kolonkarzinomen stimmen die Befunde der meisten Autoren überein und können als abgesichert betrachtet werden.

2 Expression des MUC2-Proteins

Muzinöse Kolonkarzinome zeichnen sich durch eine Zunahme der MUC2-Muzinexpression gegenüber der normalen Kolonmucosa aus, während es bei nichtmuzinösen Kolonkarzinomen zu einem Verlust der MUC2-Expression kommt. Dies ist sowohl durch Nachweis der MUC2-mRNA, als auch durch immunhistochemischen Nachweis von MUC2-Protein gezeigt worden^{57 67}. Dieser Befund konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden.

Eine vergleichende Untersuchung der MUC2-Expression von muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen der Organe Mamma, Ovar und Pankreas ist erstmals in der vorliegenden Arbeit vorgenommen worden. Sie hat ergeben, dass die MUC2-Expression ein gemeinsames Merkmal der muzinösen Karzinome der genannten vier Organe ist und dass sich die muzinösen Karzinome von Mamma, Pankreas, Ovar und Kolon in der MUC2-Expression statistisch signifikant von den nichtmuzinösen Karzinomen dieser Organe unterscheiden.

Die Untersuchung von Yonezawa zeigte eine sehr gute Korrelation zwischen immunhistochemischem Nachweis des synthetisierten MUC2 *core*-Proteins und dem MUC2-mRNA Nachweis, so dass man von dem vermehrten immunhistochemischen Nachweis auch auf vermehrte MUC2-Expression schließen kann und die vermehrte Detektion des 4F1 Epitops in muzinösen Karzinomen vermutlich nicht auf einer vermehrten Zugänglichkeit des Epitops bei verminderter Glykosylierung beruht¹⁵⁷.

3 Korrelation der Expression der Antigene p53 und MUC2

Zwischen der Detektierbarkeit der Antigene p53 und MUC2 besteht keine Korrelation. Weder nach der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman, noch nach der grafischen Darstellung in Tab. 2. D.h., es gibt keinen Hinweis darauf, dass sich die beiden Antigene gegenseitig in ihrer Detektierbarkeit z.B. durch Komplexbildung von MUC2 und p53 Protein, beeinflussen könnten.

4 Einfluss der Muzine auf Tumorentstehung und Prognose

Bisher wurde die Rolle von Muzinen in Bezug auf Entstehung und Ausbreitung maligner Tumore vor allem für MUC1 untersucht (Übersicht in Agrawal et al. ¹⁵⁸).

Folgende Beobachtungen haben zur Hypothese geführt, MUC1 könne die Tumorprogression fördern:

In MUC1-*knock-out* Mäusen fand eine signifikant geringere Tumorprogression von induzierten Brustkarzinomen statt als in normalen Mäusen ¹⁵⁹. Zudem ist eine hohe MUC1-Expression in kolorektalen und ovarialen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ^{160 161 162 163}.

Es gibt Beobachtungen, dass MUC1 mit eosinophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen interagiert und die Immunabwehr durch diese Zellen inhibiert. Darauf basiert die Hypothese, dass Tumorzellen der Immunabwehr des Körpers auf diese Weise entgehen könnten ^{164 165}.

Für Muzine werden adhäsive Eigenschaften diskutiert aufgrund ihrer Kohlenhydratseitenketten, die potentielle Liganden für Adhäsionsmoleküle auf endothelialen Zellen sein könnten. Solch eine Interaktion könnte die Extravasation von Tumorzellen erleichtern. Sowohl MUC1 als auch MUC2 weisen das häufig in Tumorgewebe überexprimierte Blutgruppenantigen sialyl-Lewis^x auf ^{166 167}. Da sialyl-Le^x ein Ligand für das von Endothelzellen nach Induktion exprimierte E-Selektin ist (Übersicht in Varki et al. ¹⁶⁸), könnte eine MUC1- oder MUC2-Expression durch Tumorzellen deren Adhäsion an Endothel, und somit die Metastasierung, fördern.

Einige Arbeitsgruppen postulieren einen fördernden Einfluss von Muzinen auf die Krebsmetastasierung in Tiermodellen. Sternberg et al. beschreiben eine Assoziation von verminderter Metastasierung von Kolonkarzinomzellen in die Leber in Mäusen mit der Suppression der MUC2-Synthese durch *antisense*-DNA und folgern daraus eine fördernde Rolle von MUC2 für die Metastasierung von Kolonkarzinomen ¹⁶⁹.

Hanski et al. haben jedoch gezeigt, dass in Lebermetastasen von Kolonkarzinomen die MUC2-Expression auf 5% der Expression in Normalgewebe der Kolonmucosa reduziert ist ¹⁰⁰. Auch die Beobachtung von Okano et al., dass Primärtumore von Kolonkarzinomen mit Lebermetastasen seltener eine MUC2-Expression aufweisen (43%) als Kolonkarzinome ohne Lebermetastasen (72%), spricht gegen eine fördernde Rolle von MUC2 bei der Metastasierung von Kolonkarzinomen ¹⁷⁰. Darüber hinaus gibt es keinen Unterschied in der Prognose zwischen muzinösen und

nichtmuzinösen Kolonkarzinomen. Hätte die MUC2-Expression einen fördernden Einfluss auf die Metastasierung von Kolonkarzinomen, wäre eine schlechtere Prognose von MUC2 exprimierenden Kolonkarzinomen zu erwarten.

Die muzinösen Karzinome von Mamma, Ovar und Pankreas und muzinöse Gallengangstumore haben eine bessere Prognose als die nichtmuzinösen Karzinome dieser Organe^{80, 157}. Da die genannten muzinösen Karzinome eine *de novo*-Expression von MUC2 aufweisen und die günstige Prognose bei muzinösen Pankreas- und Gallengangstumoren mit der MUC2-Expression korreliert, erscheint es als denkbar, dass die günstigere Prognose von Karzinomen mit ektopischer MUC2-Expression mit einer dadurch hervorgerufenen Immunantwort zusammenhängt.

5 Untersuchung der humoralen Immunantwort auf MUC2

In den 18 untersuchten Seren von Patienten mit muzinösen Kolon- und Mammakarzinomen wurden keine Antikörper gegen das smuc41-Peptid aus MUC2 detektiert. Dies kann bedeuten, dass keine humorale Immunantwort auf MUC2 existiert.

Möglicherweise konnten aber auch vorhandene, gegen MUC2 gerichtete Antikörper nicht detektiert werden, weil sie gegen ein anderes Epitop als die im smuc41-Peptid enthaltenen gerichtet sind.

Weiter ist es denkbar, dass die smuc41 Region von MUC2 *in vivo* glykosyliert ist, die Peptidepitope somit maskiert sind, und deswegen keine Antikörperbildung hervorrufen, oder Antikörper gegen Kohlenhydrat-Epitope gebildet werden.

Im Gegensatz dazu wurden MUC1-spezifische Antikörper in Seren von Patienten mit Karzinomen von Mamma, Pankreas und, seltener, Kolon, gefunden. In diesen Karzinomen wird MUC1 verstärkt exprimiert.

Antikörper gegen das MUC1-Proteingerüst ließen sich in Seren von Patienten mit Brust-, Pankreas- und Kolonkarzinomen detektieren^{132, 133}.

Kotera et al. fanden jedoch in weniger als 20% der untersuchten Tumorseren Antikörper gegen MUC1, in der Untergruppe von 24 untersuchten Seren von Patientinnen mit Brustkarzinomen war die Häufigkeit sogar nur 8,6%. Möglicherweise existieren anti-MUC2 Antikörper mit einer ähnlich geringen Häufigkeit, so dass für ihre Detektion eine größere Stichprobe nötig wäre.

Zudem war die Detektion der anti-MUC1 Antikörper in der Untersuchung von Kotera et al. abhängig von der Größe des als Antigen verwendeten Peptids von MUC1: am häufigsten wurden anti-MUC1-Antikörper mit einem 105-Aminosäuren-Peptid nachgewiesen, in geringerer Häufigkeit mit einem 80-Aminosäuren-Fragment und kein Nachweis war möglich mit einem 60-Aminosäuren-Fragment ¹³³.

Die vorliegende Untersuchung schliesst die Existenz von an MUC2 gebundenen Antikörpern nicht aus. Solche Antikörper wären dem Nachweis durch Western Blot mit smuc41 als Antigen entgangen. Für MUC1 sind solche zirkulierenden Muzin-Antikörper Immunkomplexe beschrieben ¹⁷¹.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Richards et al. zeigte sich, dass sich die Konzentration von zirkulierendem MUC1 und freien Antikörpern gegen MUC1 in Seren von Patientinnen mit benignen und malignen Neoplasien des Ovar sowie von gesunden Probandinnen umgekehrt proportional verhielten. Die höchste Konzentration von gegen MUC1 gerichteten Antikörpern und niedrigste MUC1-Spiegel fanden sich in jungen gesunden Probandinnen. Die MUC1 Serumkonzentration nahm mit zunehmendem Alter der Patientinnen und bei Patientinnen mit Ovarkarzinomen zu, während hier die anti-MUC1 Antikörperkonzentration abnahm ¹⁷². Diese inverse Korrelation zwischen Konzentration von MUC1 und Antikörpern gegen MUC1 kann als indirekter Hinweis auf die Bildung von Immunkomplexen zwischen MUC1 und MUC1-Antikörpern gewertet werden.

Böhm et al. haben kürzlich gezeigt, dass es innerhalb des MUC2-Muzins immunogene Peptidsequenzen gibt, die, im Komplex mit HLA A2 präsentiert, *in vitro* spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren ¹¹⁷. Diese CTL waren jedoch nicht in der Lage, MUC2 exprimierende Tumorzellen *in vitro* zu lysieren. Somit konnten keine Hinweise gewonnen werden, dass die verstärkte MUC2-Expression in Kolonkarzinomen eine humorale (die vorliegende Arbeit) bzw. zelluläre (Böhm et al. ¹¹⁷) Immunantwort hervorruft.