

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Antikörpers 14 an Primärtumoren mit der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode und der Immunfluoreszenz

Der Antikörper 14 wurde an 45 der 82 Tumoren mit der LSAB-Methode und der IF untersucht. Ein übereinstimmendes Ergebnis mit beiden Methoden zeigten 8 Tumoren, davon hatten 4 Tumoren membranöse, 2 Tumoren membranös-zytoplasmatische, 1 Tumor zytoplasmatische und 1 Tumor zytoplasmatisch-fokal nukleäres Expressionsmuster.

Mit beiden Untersuchungstechniken wiesen 10 Fälle nukleäre β -Catenin-Färbemuster auf. 15 Tumoren zeigten mit der LSAB-Methode nukleäre Expressionsmuster, die in der IF nicht zu finden waren. Bei zwei Fällen fielen in der IF fokale nukleäre Anteile auf, die mit der LSAB-Methode nicht zu detektieren waren.

Um eine statistische Auswertung der Expressionsunterschiede vornehmen zu können, wurden die Expressionsmuster in zwei Gruppen eingeteilt. Der orthologen Gruppe wurden Tumoren mit ausschließlich membranösem Muster und der pathologischen Gruppe wurden die Tumoren zugeordnet, die neben membranösen auch oder ausschließlich zytoplasmatische und nukleäre Signale zeigten.

Nach Einteilung der Tumoren in orthologe und pathologische Expressionsmuster zeigten 4 Tumoren (8,9%) mit der LSAB-Methode und der IF ein orthologes Expressionsverhalten. Bei 27 Tumoren (60%) war mit beiden Färbemethoden ein pathologisches Expressionsverhalten zu beobachten. Unterschiede im Färbemuster waren bei 14 (31,1%) Tumoren zu sehen. Mit der LSAB-Methode zeigten sie ein pathologisches Expressionsverhalten und mit der IF ein orthologes Expressionsmuster. Ein Vergleich mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte einen signifikanten Unterschied der Expressionsmuster ($p=0,014$).

Der unspezifische Hintergrund und die diffuse Verteilung des Chromogens bei der LSAB-Methode erschwerte die Analyse, da spezifische und unspezifische Farbsignale nicht klar voneinander getrennt werden konnten. Die Beurteilung der fluoreszenzmarkierten Schnittpräparate ließ eine genauere Bestimmung der Expressionsmuster zu. Die Signale grenzten sich scharf vor dem schwarzen Hintergrund ab. Wegen der im Gegensatz zur LSAB-Methode exakteren Detektierbarkeit der β -Catenin-Signale wurde die Immunfluoreszenz zur Analyse der β -Catenin-Expressionsmuster eingesetzt.

Tab. 6: Vergleich der β -Catenin-Expression des Antikörpers 14 mit der LSAB- und der IF-Detektionsmethode (pl=plasmalemmal / membranös, cp=zytoplasmatisch, n=nukleär, f=fokal, het=heterogen, =gleiche Signalintensität, > verstärktes Signal)

Patient	14 LSAB Expressionsmuster	14 LSAB Expressionsmuster ortho. /patho	14 IF Expressionsmuster	14 IF Expressionsmuster ortho. /patho
1	cpfn	pathologisch	pl=fn	pathologisch
2	plcp	pathologisch	fn>pl	pathologisch
3	cp	pathologisch	pl	ortholog
4	cpfn	pathologisch	het pl	pathologisch
5	pl	ortholog	pl	ortholog
6	cpfn	pathologisch	fn>pl	pathologisch
7	pl	ortholog	pl	ortholog
8	plcp	pathologisch	pl	ortholog
9	cp	pathologisch	pl=fn	pathologisch
10	het pl / cp	pathologisch	het pl>cp	pathologisch
11	ncp	pathologisch	pl=cp	pathologisch
12	plcp	pathologisch	pl	ortholog
13	ncp	pathologisch	pl	ortholog
14	pl	ortholog	pl	ortholog
15	pl	ortholog	pl	ortholog
16	cp	pathologisch	pl	ortholog
17	n	pathologisch	pl	ortholog
18	cpfn	pathologisch	pl=fn	pathologisch
19	cpfn	pathologisch	pl=fn	pathologisch
20	n	pathologisch	pl=fn	pathologisch
21	cp	pathologisch	het pl	pathologisch
22	cpfn	pathologisch	cp	pathologisch
23	n	pathologisch	pl>cp=fn	pathologisch
24	plcp	pathologisch	pl	ortholog
25	plcp	pathologisch	pl	ortholog
26	n	pathologisch	pl=fn>cp	pathologisch
27	cpfn	pathologisch	pl	ortholog
28	n het	pathologisch	pl=n	pathologisch
29	n	pathologisch	cp	pathologisch
30	plcp	pathologisch	pl=cp	pathologisch
31	cp	pathologisch	pl=fn>cp	pathologisch
32	n	pathologisch	het pl	pathologisch
33	n	pathologisch	cp	pathologisch
34	cpfn	pathologisch	pl	ortholog
35	cpfn	pathologisch	cp=fn>pl	pathologisch
36	plfcp	pathologisch	pl	ortholog
37	cp	pathologisch	pl	ortholog
38	plcpfn	pathologisch	het pl	pathologisch
39	n	pathologisch	pl=fn>cp	pathologisch
40	cp	pathologisch	cp	pathologisch
41	cpfn	pathologisch	pl	ortholog
42	cpn	pathologisch	pl	ortholog
43	cpn	pathologisch	pl=cp	pathologisch
44	plfn / cpn	pathologisch	cp	pathologisch
45	cpfn	pathologisch	cp=fn	pathologisch

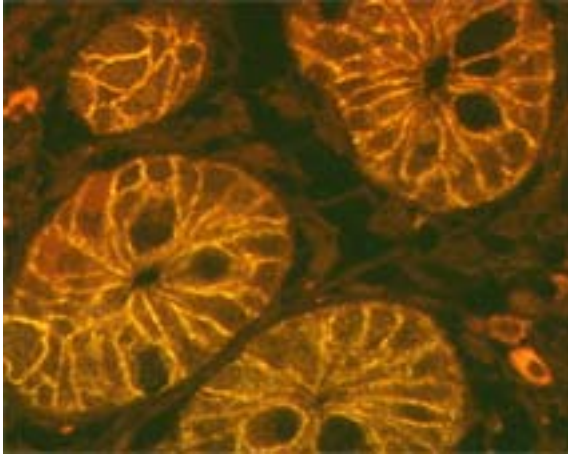
4.2 β -Catenin-Expression im gesunden Gewebe

Es wurden 25 orthologe Gewebe von 21 verschiedenen Organen mit der IF und den Antikörpern 14, 8e4, 7a7, 7d11, 9g2 und 9g10 untersucht (Tabelle 7). Das am häufigsten beobachtete Expressionsmuster bei den epithelialen und glandulären Strukturen war plasmalemmal / membranös. Bei Untersuchungen von Magenkorpusschleimhaut zeigte das Drüsenepithel mit den Antikörpern 14, 8e4, 7d11 und 9g2 basal gegenüber apikal eine reduzierte membranöse Expression, wobei 7a7 basal zytoplasmatisch-nukleäre Areale zeigte, während bei 9g10 die Betonung basal im membranös-zytoplasmatischen Bereich lag. Das Plattenepithel der Lippe zeigte eine membranöse Betonung im basalen Bereich mit den Antikörpern 7a7 und 9g10. Besonders auffällig war die positive Reaktion des Antikörpers 7a7 mit der glatten Muskulatur.

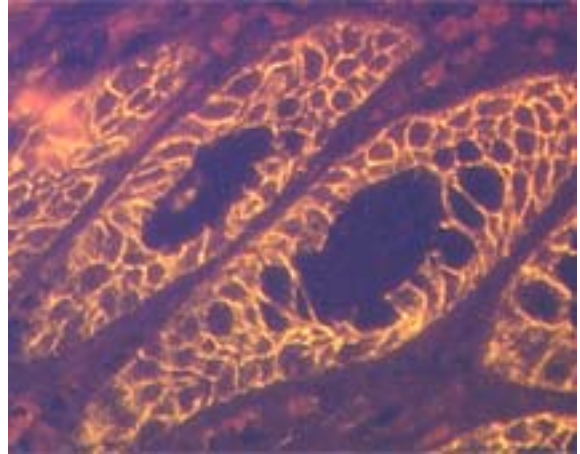
Kolonschleimhautepithelien zeigten sowohl an der Basis, im mittleren Teil als auch apikal der Krypte eine gleichmäßige membranöse / plasmalemmale Färbung. Die Antikörper 7a7 und 9g10 wiesen außerdem Signale im Zytoplasma auf. Im Stroma des Kolons fiel die positive Expression der Gefäßendothelien und der neuronalen Plexus bei allen 6 β -Catenin-Antikörpern auf. Starke Affinität besaß der Antikörper 7a7 zur glatten Muskulatur des Kolons.

Tab. 7: β -Catenin-Signale im gesunden Gewebe mit den Antikörpern 8e4, 7a7, 7d11, 9g2, 9g10 und 14 (pl=plasmalemmlal / membranös, cp=zytoplasmatisch, n=nukleär, red=reduziert, neg=negativ, fok=fokal)

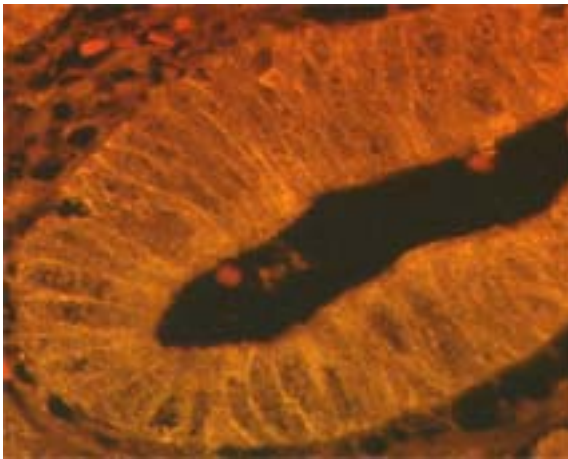
Organ	8e4	7a7	7d11	9g2	9g10	14
Kolon	pl	plcp	pl	pl	plcp	pl
Ileum-Kolon	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
Ileum	pl	cp	pl	pl	pl	pl
Magenkorpus	pl / basal red	pl (apikal); cpn (basal)	pl / basal red	pl / basal red	pl (apikal); plcp (basal)	pl / basal red
Magenantrum	pl	pl	pl	pl	plcp (apikal bet)	pl
Duodenum	pl	pl>cp	pl	pl	plcp	pl
Jejunum	pl	pl>cp	pl	pl	plcp	pl
Leber (Hepatozyten)	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
intrahep. Gallengänge	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
Pankreas Drüsenzellen	pl	het pl	pl	pl	plcp	pl
Gallenblase	pl	pl>cp	pl	pl	plcp	pl
Ureter	pl	pl	pl>cp	pl	plcp	pl
Harnblase	pl	pl	plcp	pl	cp	pl
Hoden Tubuli	pl	pl	pl	pl	pl	pl
Corpus uteri prolif. Glandulae	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
Corpus uteri sekr. Glandulae	pl	pl	plcp	pl	pl>cp	pl
Cervix	pl	pl>cp	pl	pl	cp	pl
Mammadrüsen	pl	pl	pl	pl	cp	pl
Tube	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
Plazenta (Zyotrophoblast)	pl	pl	pl	pl	neg	pl
Gefäßendothel	pl	pl	pl	pl	pl	pl
glatte Muskulatur	neg	pos	neg	neg	neg	neg
Lungenbronchus	pl	plcp	plcp	pl	cp	pl
Lungenalveolen	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Schilddrüse	pl	pl	pl	pl	plcp	pl
Plattenepithel d. Lippe	pl	cp (basal bet)	pl	pl	cp (basal bet)	pl



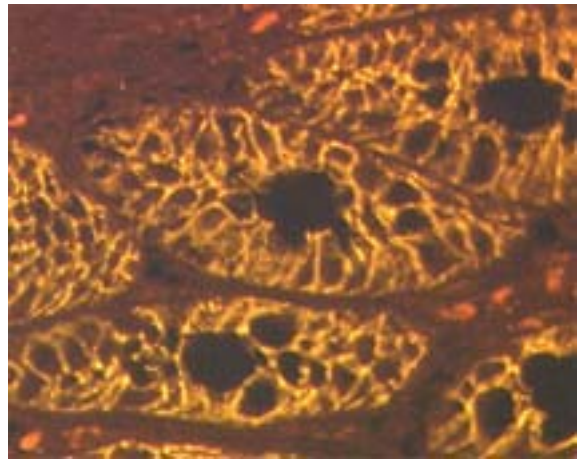
Antikörper 14, Vergrößerung x63



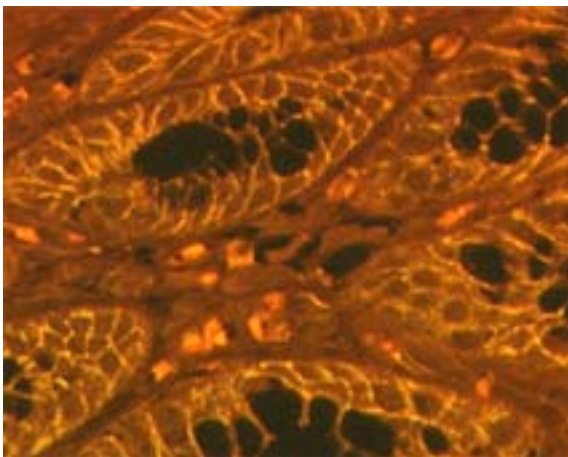
Antikörper 8e4, Vergrößerung x40



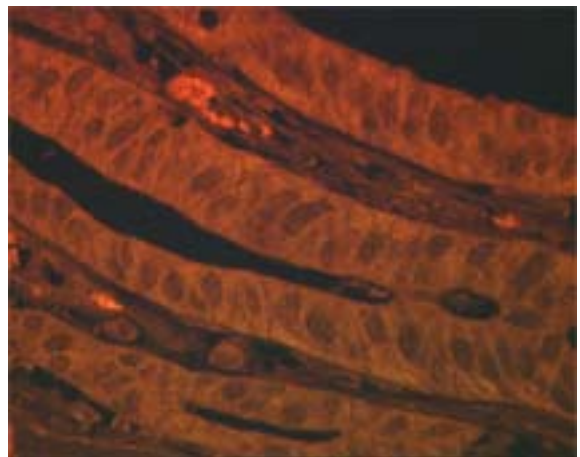
Antikörper 7a7, Vergrößerung x63



Antikörper 7d11, Vergrößerung x40



Antikörper 9g2, Vergrößerung x40



Antikörper 9g10, Vergrößerung x40

Abb. 10: β -Catenin-Lokalisation in normalen Krypten des Kolons mit den Antikörpern 14, 8e4, 7a7, 7d11, 9g2 und 9g10 und der fluorochromkonjugierten indirekten Methode, die Antikörper 14, 8e4, 7d11 und 9g2 mit membranösen Signalen, die Antikörper 7a7 und 9g10 mit membranösen und zytoplasmatischen Signalen.

4.3 Charakterisierung des untersuchten Patientengutes bezüglich epidemiologischer und pathologischer Kriterien

4.3.1 Expressionsanalyse der DNA-Fehlpaarungsreparaturproteine MLH1, MSH2 und MSH6

82 Kolorektalkarzinome wurden hinsichtlich eines Expressionsverlustes der DNA-Reparaturproteine MLH1, MSH2 und MSH6 untersucht. Da hierbei die qualitative Aussage im Vordergrund stand, wurden die Untersuchungen mit der LSAB-Methode durchgeführt. 50 (61%) Tumoren zeigten eine Expression aller drei Reparaturproteine. Bei 20 Tumoren (24,4%) konnte keine Expression des MLH1 nachgewiesen werden, bei 9 (11%) fehlte MSH2, und in einem Fall (1,2%) war MSH6 (GTBP) nicht detektierbar. Bei 2 (2,4%) Tumoren fiel sowohl ein Verlust von MSH2, als auch von MSH6 auf.

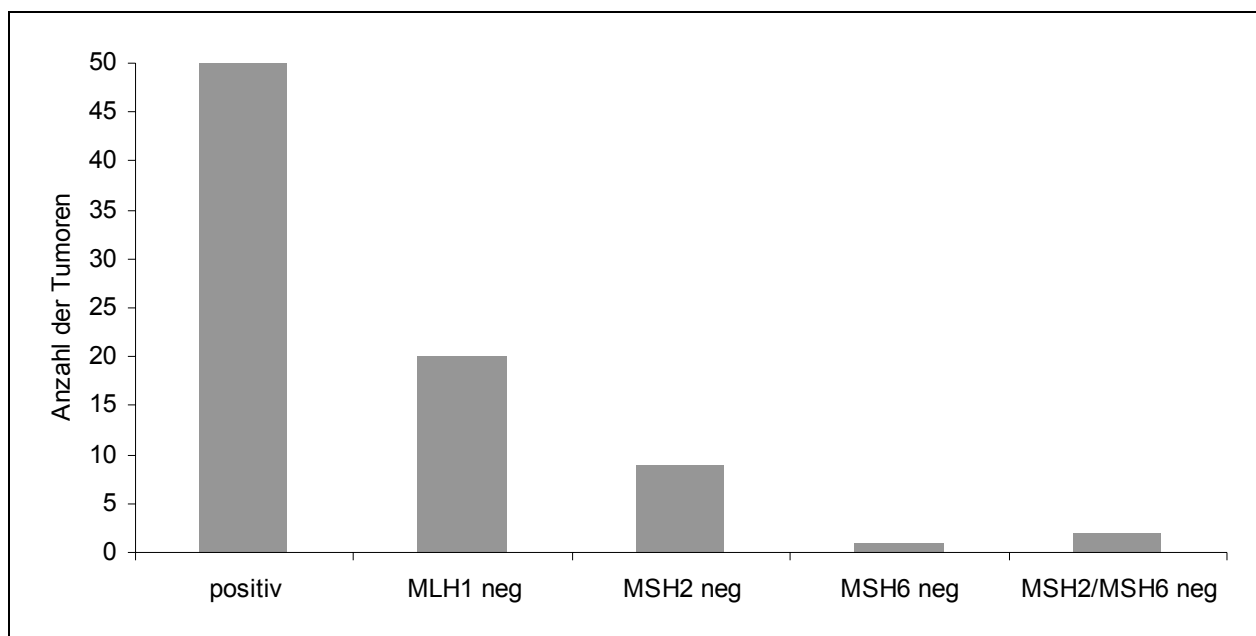


Abb. 11: Verteilung der Tumoren hinsichtlich des Verlustes der Fehlpaarungsreparaturproteine (50 / 61% positiv; 20 / 24,4% MLH1 negativ; 9 / 11% MSH2 negativ; 1 / 1,2% MSH6 negativ; 2 / 2,4% MSH2 und MSH6 negativ)

4.3.2 Familienanamnese

32 (39%) Patienten zeigten eine positive (+Fa) und 50 (61%) eine negative (-Fa) Familienanamnese hinsichtlich bösartiger Tumorerkrankungen.

Unter Beachtung der immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse der Fehlpaarungsreparaturproteine gibt es 42 sporadische (FRS -Fa) und 8 hereditäre (FRS +Fa) mit suffizientem sowie 8 sporadische (FRI -Fa) und 24 hereditäre (FRI +Fa) Karzinome mit insuffizientem Fehlpaarungsreparatursystem.

Tab. 8: Verteilung der Tumoren hinsichtlich eines Verlustes der Fehlpaarungsreparaturproteine und bösartiger Tumorerkrankungen in der Familie (8 FRS +Fa, 42 FRS -Fa, 24 FRI +Fa , 8 FRI -Fa)

		Fehlpaarungsreparaturproteine		Gesamt
		suffizient (FRS)	Insuffizient (FRI)	
Familien- anamnese	Positiv (+Fa)	8	24	32
	Negativ (-Fa)	42	8	50
Gesamt		50	32	82

4.3.3 Altersverteilung

Das Patientenalter der 81 Fälle entspricht dem Alter zum Zeitpunkt der Operation. Bei einem Patienten konnte das Alter nicht eruiert werden. Die Altersspanne betrug 14-84 Jahre. In der Gruppe der FRS +Fa Tumoren lag das mittlere Alter bei 41,3 Jahren und der Median bei 40 Jahren, in der Gruppe der FRS -Fa Tumoren erkrankten die Patienten im Mittel mit 60,8 Jahren, und der Median betrug 61,5 Jahre. Bei den FRI +Fa lag das mittlere Alter bei 44,7 Jahren, der Median bei 43 Jahren. Die Patienten mit FRI -Fa Karzinomen erkrankten im Mittel mit 48,1 Jahren, der Median betrug 57 Jahre.

In der FRS +Fa-Gruppe erkrankten die Patienten in der Mehrzahl zwischen dem 30. und 39. Lebensjahr. Zwischen dem 60. und 69. Lebensjahr erkrankte die überwiegende Zahl der Patienten mit einem FRS -Fa-Tumor. Eine zweigipflige Alterskurve zeigte sich bei den Patienten mit FRI-Tumoren. Die Altersgipfel der Patienten mit FRI +Fa-Tumoren lag zwischen dem 30. und 39. Lebensjahr und dem 60. und 69. Lebensjahr. Bei den Patienten mit FRI -Fa-Tumoren zeigte sich ein Gipfel zwischen dem 30. und 39. sowie dem 50. und 59. Lebensjahr.

Es ergibt sich hierbei eine signifikant unterschiedliche Verteilung mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ($p=0,007$).

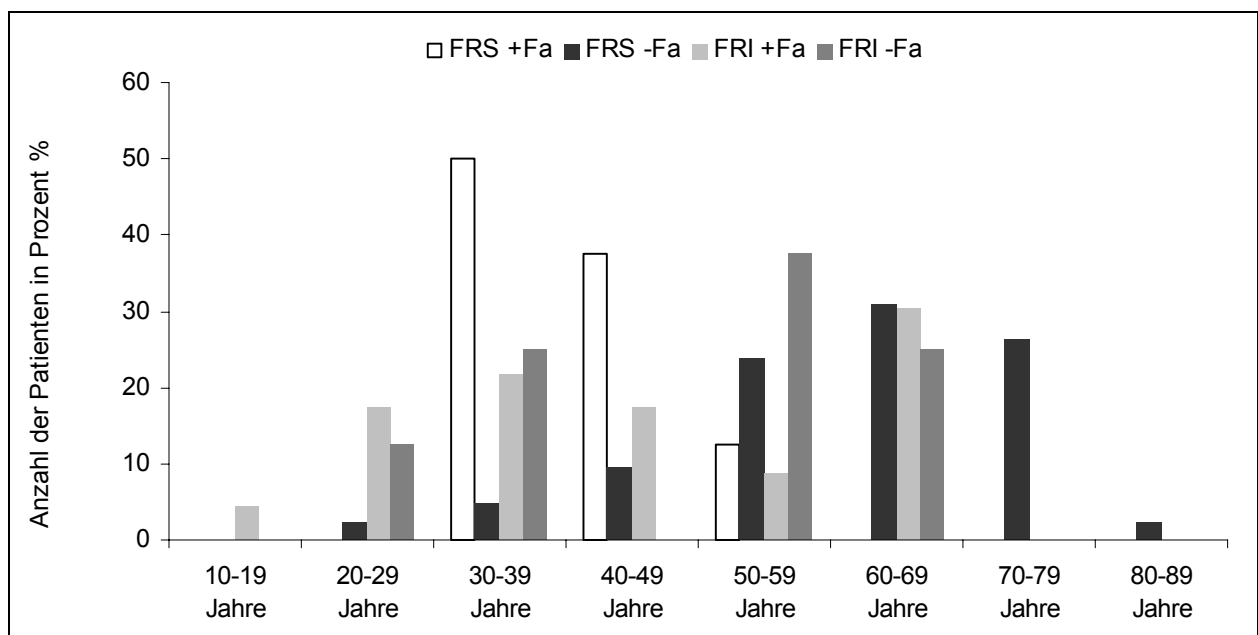


Abb. 12: Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation zeigte eine signifikante Verteilung mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson ($p=0,007$).

4.3.4 Verteilung der Geschlechter

Unter den 82 Patienten befanden sich 56 (68,3%) Männer und 26 (31,7%) Frauen. In der Gruppe der FRS +Fa-Tumoren gab es 5 (62,5%) Männer und 3 (37,5%) Frauen. 31 (73,8%) Männer bzw. 11 (26,2%) Frauen waren in der FRS -Fa-Gruppe erkrankt. Zur FRI +Fa-Gruppe zählten 17 (70,8%) Männer und 7 (29,2%) Frauen. 3 (37,5%) Männer und 5 (62,5%) Frauen befanden sich in der FRI -Fa-Gruppe.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab bei einem Vergleich der Tumorgruppen mit Blick auf das Geschlecht der Patienten keine signifikant unterschiedliche Verteilung ($p=0,2$).

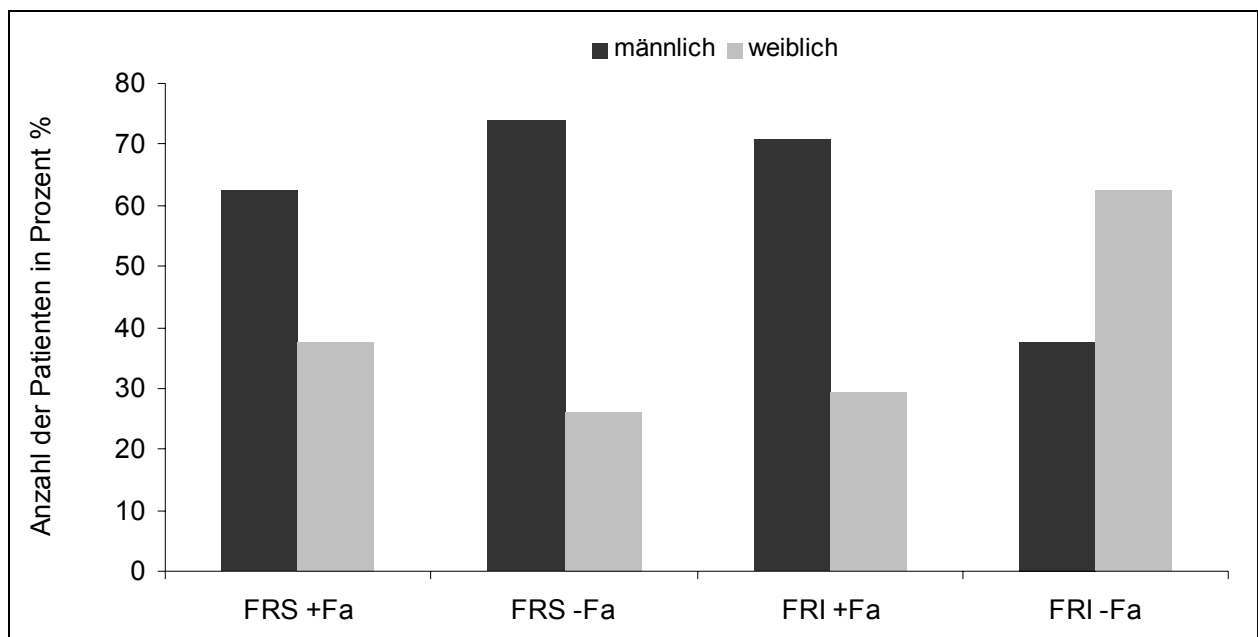


Abb. 13: Verteilung der Geschlechter in den Tumorgruppen. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,2$). (FRS +Fa 5 (62,5%) Männer, 3 (37,5%) Frauen; FRS -Fa 31 (73,8%) Männer, 11 (26,2%) Frauen; FRI +Fa 17 (70,8%) Männer, 7 (29,2%) Frauen; FRI -Fa 3 (37,5%) Männer, 5 (62,5%) Frauen)

4.3.5 Histopathologische Differenzierungsgrade

In Anlehnung an die TNM-Klassifikation maligner Tumoren von der „International Union Against Cancer“, Auflage 6 (Wittekind et al., 2002), ergab die Einteilung der 72 Tumoren in ihre histopathologischen Differenzierungsgrade bei den FRS +Fa-Tumoren 5 (71,4%) mäßig differenzierte (G2) und 2 (28,6%) schlecht differenzierte (G3) Karzinome. Bei den Tumoren der FRS -Fa-Gruppe waren 1 (2,6%) gut differenziertes (G1), 28 (71,8%) mäßig differenzierte (G2) und 10 (25,6%) schlecht differenzierte (G3) Karzinome zu beobachten. In der Gruppe der FRI +Fa-Tumoren gab es 1 (5%) gut differenziertes (G1), 13 (65%) mäßig differenzierte (G2), 5 (25%) schlecht differenzierte (G3) und 1 (5%) undifferenziertes (G4) Karzinom. Die Gruppe der FRI -Fa-Tumoren zeigten 1 (16,7%) gut differenziertes (G1), 3 (50%) mäßig differenzierte (G2) und 2 (33%) schlecht differenzierte (G3) Karzinome.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte keine signifikanten Unterschiede bei einem Vergleich der Tumorgruppen hinsichtlich der histopathologischen Differenzierungsgrade ($p=0,7$).

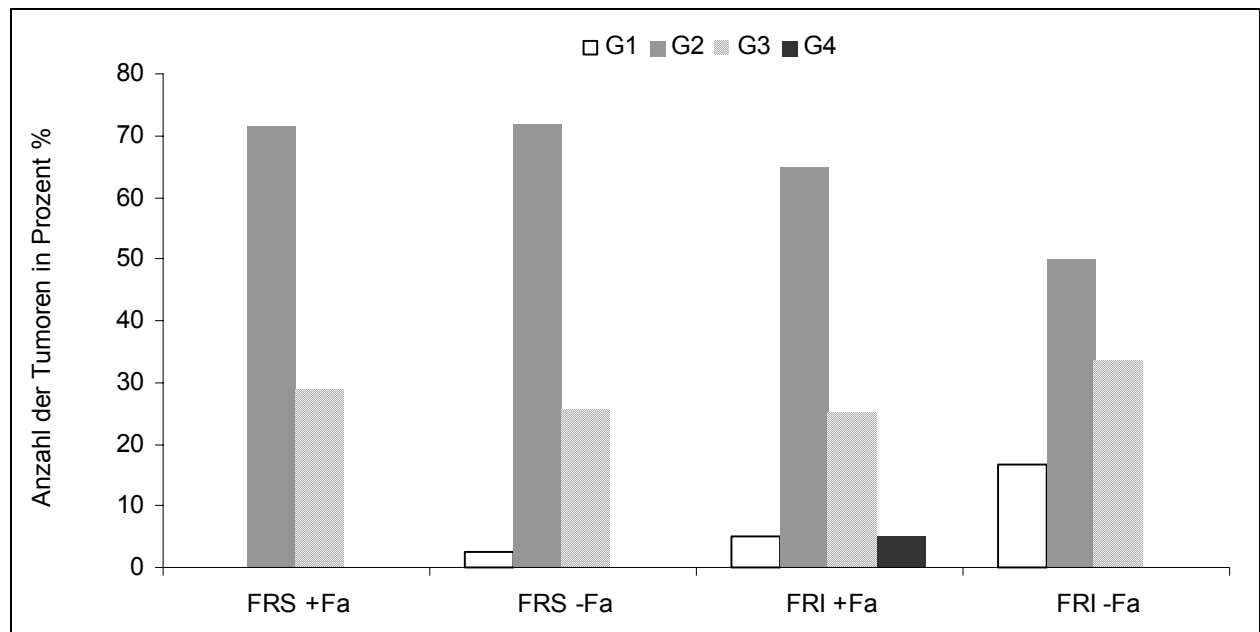


Abb. 14: Einteilung der Tumoren nach ihren histopathologischen Differenzierungsgraden (G1 - gut differenziert, G2 - mäßig differenziert, G3 - schlecht differenziert, G4 - undifferenziert)

4.3.6 Ausbreitung des Primärtumors

Die Einteilung nach der Größe und lokalen Ausdehnung des Primärtumors erfolgte nach der TNM-Klassifikation maligner Tumoren von der „International Union Against Cancer“ (Wittekind et al., 2002). In der FRS +Fa-Tumorgruppe gab es 6 (100%) pT3-Tumoren. In der Gruppe der FRS -Fa-Tumoren entsprachen 4 (10,8%) pT2-Tumoren, 30 (81,1%) pT3-Tumoren und 3 (8,1%) pT4-Tumoren. In der Gruppe der FRI +Fa-Tumoren erfüllten 2 (10,5%) Merkmale von pT1-Tumoren, 2 (10,5%) von pT2-Tumoren, 13 (68,4%) von pT3-Tumoren und 2 (10,5%) von pT4-Tumoren. Innerhalb der FRI -Fa-Tumorgruppe gab es 1 (16,7%) pT1-Tumor, 1 (16,7%) pT2-Tumor und 4 (66,7%) pT3-Tumoren. Von 68 Kolorektalkarzinomen konnte die Ausdehnung des Primärtumors eruiert werden.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Größe und Ausbreitung der Primärtumoren ($p=0,5$).

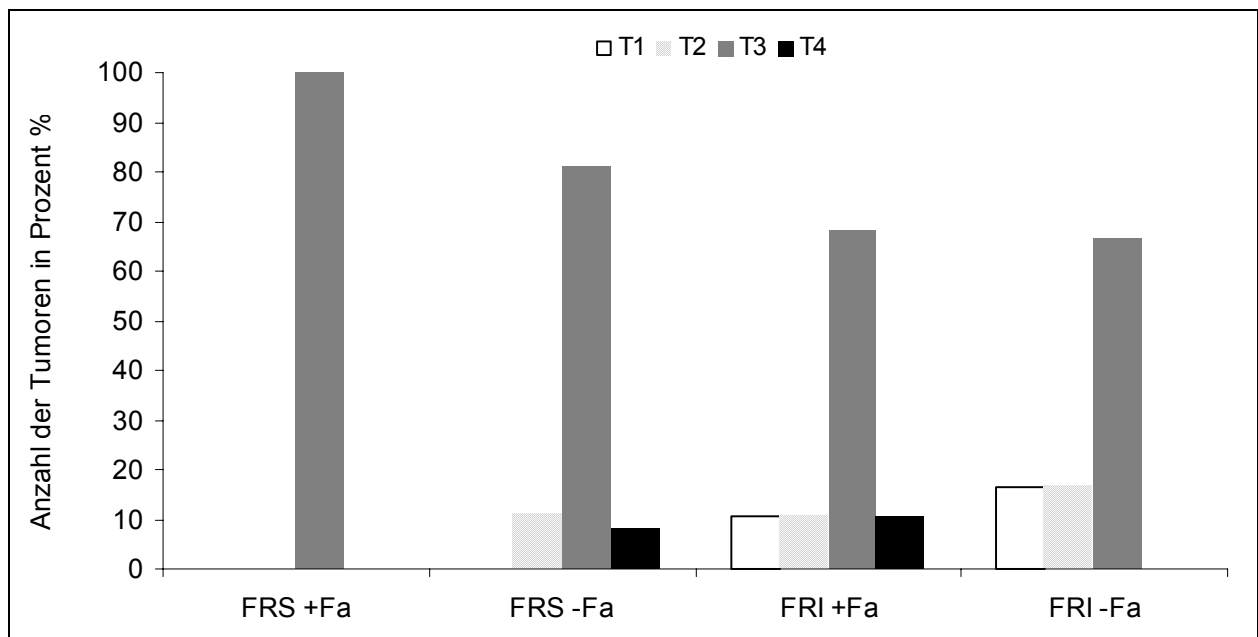


Abb. 15: Die Größe und Ausbreitung des Primärtumors zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0,5$). pT1-Tumor infiltriert Submukosa, pT2-Tumor infiltriert Muscularis propria, pT3-Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe, pT4-Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

4.3.7 Regionäre Lymphknotenmetastasen

Die Einteilung der regionären Lymphknotenmetastasen erfolgte nach der TNM-Klassifikation maligner Tumoren anhand der „International Union Against Cancer“ (Wittekind et al., 2002). Die FRS +Fa-Tumorgruppe zeigte in einem Fall (16,7%) keinen regionären Lymphknotenbefall (pN0), 3 (50%) Tumoren hatten 1-3 regionäre Lymphknotenmetastasen (pN1), und 2 (33,3%) zeigten einen Befall von 4 und mehr Lymphknoten (pN2). Bei der Gruppe der FRS -Fa Tumoren gab es 9 (24,3%) pN0 Tumoren, 16 (43,2%) pN1 Tumoren und 12 (32,4%) pN2 Tumoren. In der Gruppe der FRI +Fa-Tumoren zeigten 8 (42,1%) Tumoren einen pN0-, 4 (21,1%) Tumoren einen pN1- und 7 (36,8%) Tumoren einen pN2-Lymphknotenbefall. Von den 6 Fällen der FRI -Fa-Tumorgruppe hatten 4 (66,7%) Tumoren einen pN0-, 1 (16,7%) Karzinom zeigte einen pN1- und 1 (16,7%) einen pN2-Lymphknotenbefall. Von 68 Kolorektalkarzinomen war der Befall der regionären Lymphknotenmetastasen bekannt.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Verteilung der regionären Lymphknotenmetastasen ($p=0,3$).

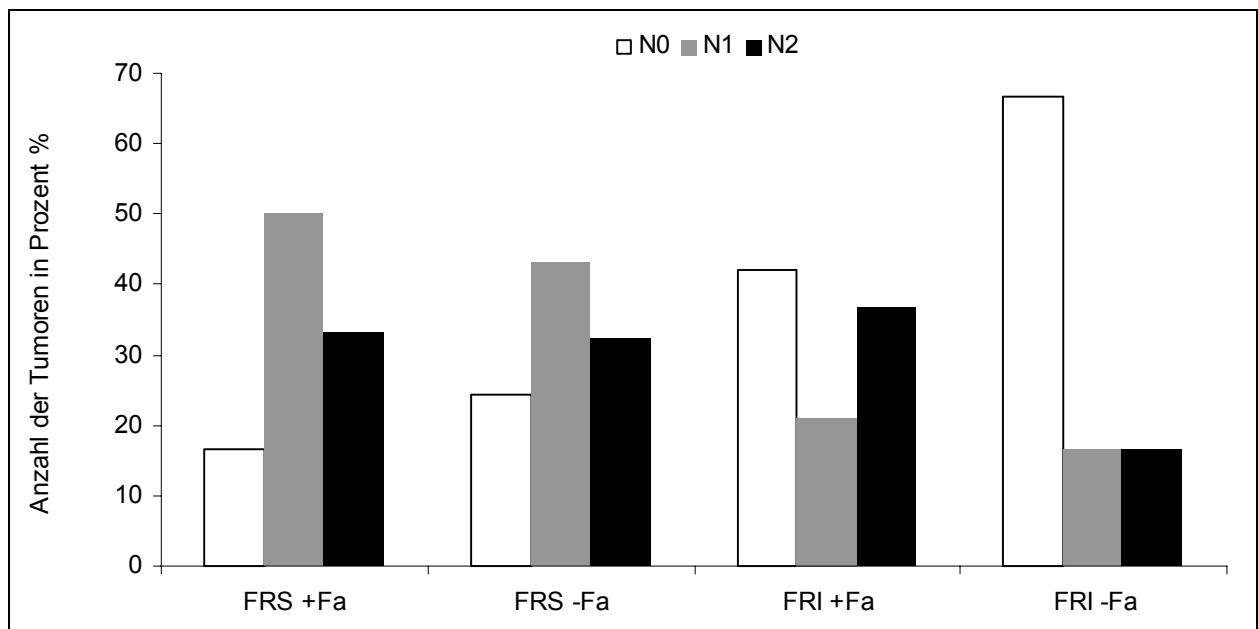


Abb. 16: Die Verteilung des regionären Lymphknotenbefalls zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,3$): N0 - keine regionären Lymphknotenmetastasen; N1 - Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten; N2 - Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

4.3.8 Fernmetastasen

Insgesamt lagen 15 Fernmetastasen vor. In der FRS -Fa-Gruppe zeigten 14 (33,3%) Tumoren und in der FRI +Fa-Gruppe zeigte 1 (4,2%) Tumor Fernmetastasen. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab hierbei einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Fernmetastasen ($p=0,004$).

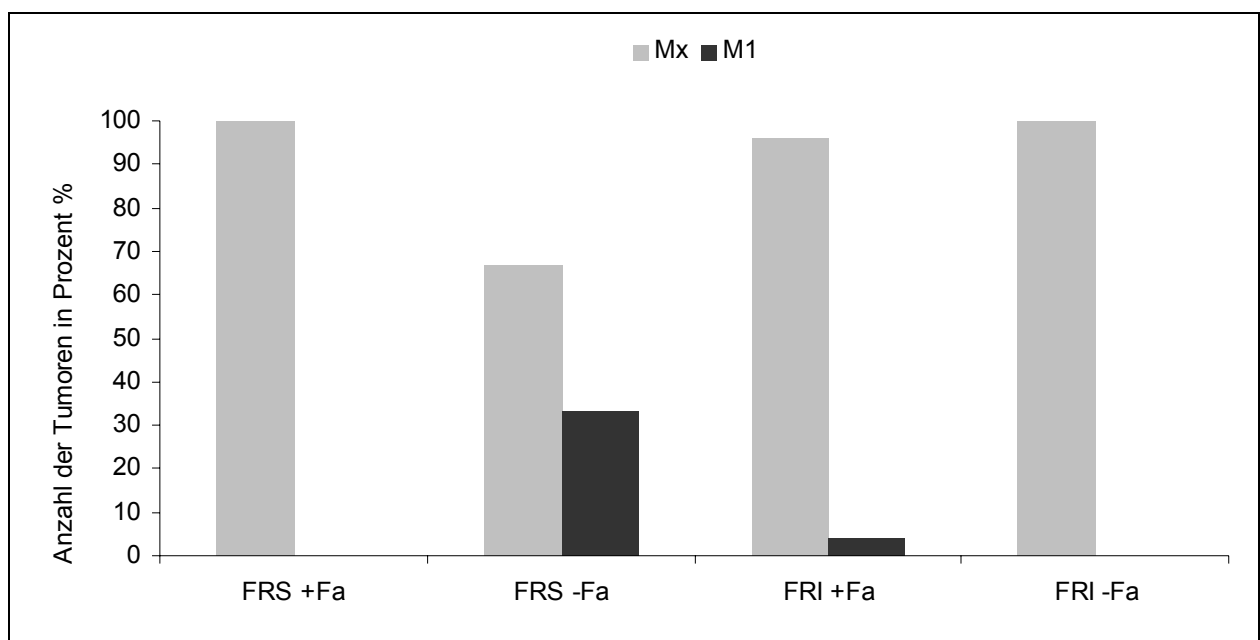


Abb. 17: Verteilung der Fernmetastasen in den Tumorgruppen. Mx-Fernmetastasen können nicht beurteilt werden, M1 – Fernmetastasen

4.3.9 Tumorstadien

Die Tumorstadien wurden anhand der TNM-Klassifikation maligner Tumoren von der „International Union Against Cancer“ (Wittekind et al., 2002) bestimmt. Die FRS +Fa-Tumorgruppe zeigte in einem Fall (16,7%) Merkmale des Stadiums II und 5 (83,3%) des Stadiums III. Bei der Gruppe der FRS -Fa Tumoren gab es 1 (2,6%) Fall im Stadium I, 7 (17,9%) im Stadium II, 17 (43,6%) im Stadium III und 14 (35,9%) im Stadium IV. In der Gruppe der FRI +Fa-Tumoren waren 3 (15,8%) Fälle maligner Entartungen dem Sta-

dium I, 5 (26,3%) dem Stadium II, 10 (52,6%) dem Stadium III und 1 (5,3%) dem Stadium IV zuzuordnen. Von den 6 Fällen der FRI -Fa-Tumorgruppe zeigten jeweils 2 (33,3%) Karzinome Merkmale des Stadiums I, II bzw. III.

Patienten in der FRS +Fa-Gruppe zeigten überwiegend Tumoren im Stadium 3. In der Tumorgruppe FRS -Fa waren die meisten Fernmetastasen zu beobachten. Die FRI +Fa-Tumoren wurden hauptsächlich im Stadium 3 operiert, und in der FRI -Fa-Gruppe gab es die gleiche Anzahl an Tumoren im Stadium 1, 2 und 3. Von 70 Kolorektalkarzinomen konnte das jeweilige Tumorstadium ermittelt werden, bei 12 Tumoren fehlte diese Angabe.

Es ergibt sich mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson eine signifikant unterschiedliche Verteilung ($p=0,02$).

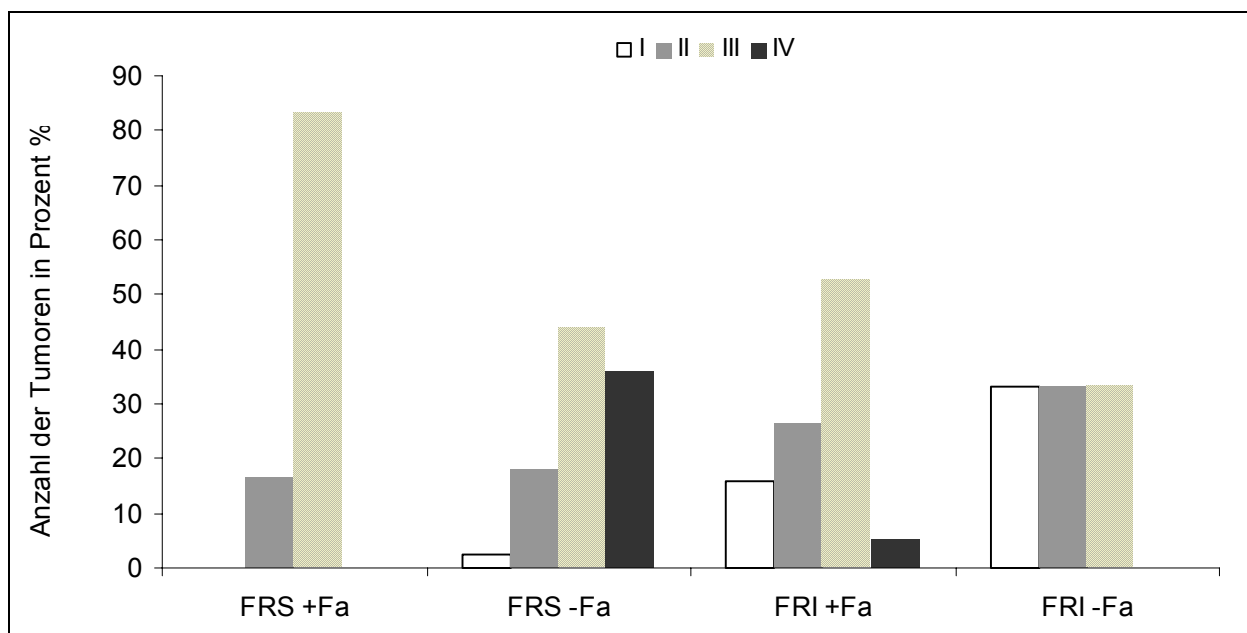


Abb. 18: Die Stadiengruppierung der Tumoren nach der TNM-Klassifikation zeigte eine signifikante Verteilung ($p=0,02$). Stadium I = T1,T2,N0,M0; Stadium II = T3,T4,N0,M0; Stadium III = T1,T2,T3,T4,N1,N2,M0; Stadium IV = T1,T2,T3,T4,N1,N2,M1

4.4 β -Catenin-Expression im tumerösen Gewebe

4.4.1 β -Catenin-Expressionsmuster bei Fehlpaarungsreparatursuffizienten und -insuffizienten Kolorektalkarzinomen und Metastasen

Innerhalb der Tumoren konnte man zum Teil eine große Heterogenität von Expressionsmustern beobachten. β -Catenin-Signale zeigten innerhalb des Tumors verschiedene Intensitäten und fokal unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen.

Um statistische Aussagen über das Expressionsverhalten der β -Catenin-Antikörper in Karzinomen machen zu können, wurden die untersuchten Tumoren anhand ihrer Expressionsmuster in zwei Gruppen eingeteilt. Die Tumoren mit orthologem (membranösem) Expressionsmuster, wie im gesunden Kolonepithel zu beobachten, und die Tumoren mit pathologischem Expressionsmuster, die zytoplasmatische und nukleäre β -Catenin-Signale zeigten.

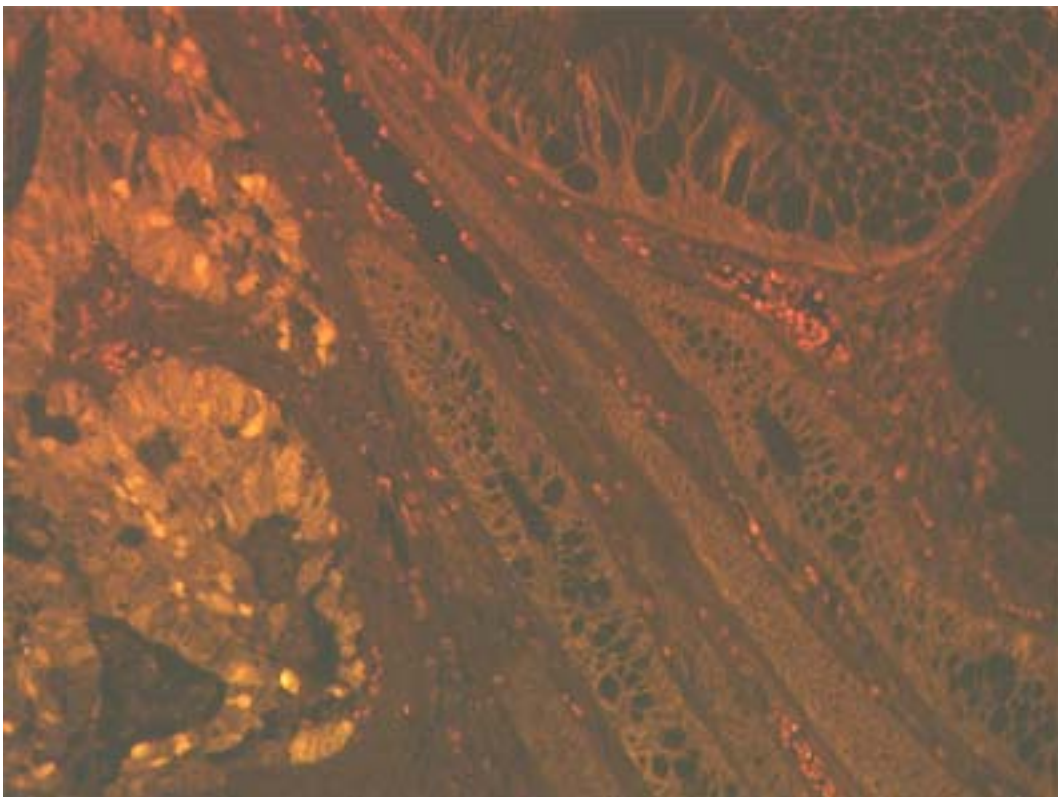


Abb. 19: Bildbeispiel für heterogene Expressionsmuster mit der fluorochromkonjugierten indirekten Methode: links im Bild heterogenes 8e4 β -Catenin-Expressionsmuster, rechts im Bild unveränderte orthologe kolorektale Schleimhaut, Vergrößerung x20

4.4.2 β -Catenin-Expressionsanalyse an Primärtumoren

Die Expressionsanalyse der 82 Primärtumoren ergab überwiegend ein orthologes Expressionsmuster. Mit dem Antikörper 14 zeigten 50% der Tumoren ein orthologes und 50% ein pathologisches Muster. Mit dem Antikörper 8e4 wiesen 57,3% ein orthologes und 42,7% ein pathologisches Signal auf. Der Antikörper 7a7 zeigte in 73,7% der Fälle ein orthologes und in 25,3% der Fälle ein pathologisches Expressionsmuster. Mit dem Antikörper 7d11 zeigten 70,7% der Tumoren ein orthologes und 29,3% ein pathologisches Signal. Der Antikörper 9g2 ließ in 72% ein orthologes und in 28% ein pathologisches Signal erkennen. In 83,3% der Fälle zeigte sich mit dem Antikörper 9g10 ein orthologes und in 16,7% ein pathologisches Muster.

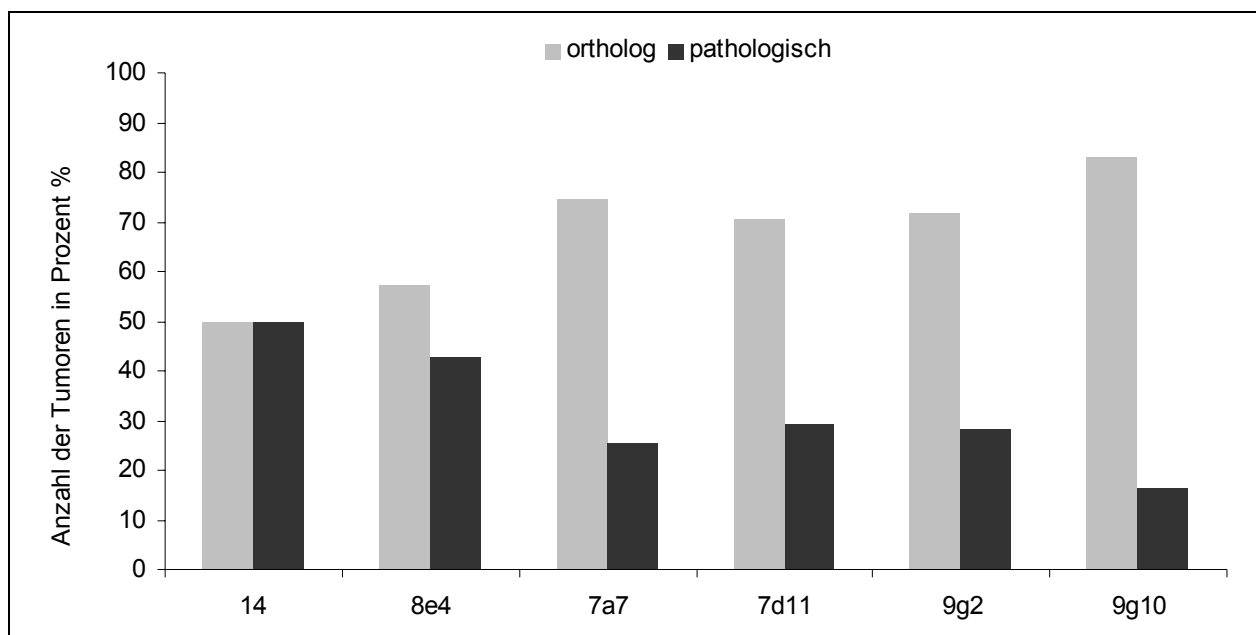


Abb. 20: β -Catenin-Expression der Antikörper 14, 8e4, 7a7, 7d11, 9g2 und 9g10 nach Einteilung in orthologe und pathologische Expressionsmuster

Ein Vergleich der β -Catenin-Expressionsmuster mit den einzelnen Antikörpern ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der FRS- und FRI-Tumorgruppe in Bezug auf die jeweilige +Fa und -Fa (Tabelle 9).

Bei allen Antikörpern und Tumorgruppen überwog das orthologe Expressionsmuster. Eine Ausnahme machte der Antikörper 14 in der FRS -Fa-Gruppe (ortholog 20 (47,6%, pathologisch 22 (52,4%)) und der FRI -Fa-Gruppe (ortholog 2 (25%), pathologisch 6 (75%)) sowie der Antikörper 8e4 in der FRS +Fa-Gruppe (ortholog 3 (37,5%), pathologisch 5 (62,5%)) und in der FRI -Fa-Gruppe (ortholog 3 (37,5%), pathologisch 5 (62,5%)).

Tab. 9: β -Catenin-Expression der Antikörper 14, 8e4, 7a7, 7d11, 9g2, 9g10 in den Tumorgruppen FRS +Fa, FRS -Fa, FRI +Fa und FRI -Fa. Außer der Antikörper 14 in der FRS -Fa- und in der FRI -Fa-Gruppe sowie der Antikörper 8e4 in der FRS +Fa und in der FRI -Fa-Gruppe zeigten alle Antikörper in den Tumorgruppen überwiegend orthologe β -Catenin-Expressionsmuster

	FRS+Fa		FRS -Fa		FRI +Fa		FRI -Fa		Signifikanz p
	ortholog	pathol.	ortholog	pathol.	ortholog	pathol.	ortholog	pathol.	
14 (%)	5 (62,5)	3 (37,5)	20 (47,6)	22 (52,4)	14 (58,3)	10 (41,7)	2 (25)	6 (75)	0,4
8e4 (%)	3 (37,5)	5 (62,5)	24 (57,1)	18 (42,9)	17 (70,8)	7 (29,2)	3 (37,5)	5 (62,5)	0,2
7a7 (%)	5 (71,4)	2 (28,6)	29 (69)	13* (31)	21 (91,3)	2 (8,7)	4 (57,1)	3 (42,9)	0,2
7d11 (%)	4 (50)	4 (50)	30 (71,4)	12* (28,6)	19 (79,2)	5* (20,8)	5 (62,5)	3* (37,5)	0,4
9g2 (%)	4 (50)	4 (50)	30 (71,4)	12 (28,6)	19 (79,2)	5 (20,8)	6 (75)	2 (25)	0,5
9g10 (%)	6 (85,7)	1 (14,3)	34 (85)	6 (15)	19 (82,6)	4 (17,4)	6 (75)	2 (25)	0,9

4.4.2.1 Antikörper-spezifische β -Catenin-Expressionsmuster in kolorektalen Primärtumoren

2 der 82 untersuchten kolorektalen Primärtumoren zeigten einen vollständigen Expressionsverlust des β -Catenin-Antikörpers 7d11. 7d11 hat sein Epitop im Exon3 des β -Catenin-Proteins (nanoTools).

Tab. 10: Merkmale der Patienten und Tumoren mit einem Expressionsverlust des Antikörpers 7d11. Die Primärtumoren mit einem MLH1-Verlust

	Patient 1			Patient 2
	Primärtumor	kostale Metastase	pulmonale Metastase	Primärtumor
Alter	28			30
Fehlpaarungs-reparaturproteine	MLH1neg MSH2pos MSH6 pos	MLH1neg MSH2pos MSH6 pos	MLH1pos MSH2pos MSH6 pos	MLH1neg MSH2pos MSH6 pos
Familienanamnese	positiv			negativ
Tumorstadium / Differenzierungsgrad	Stadium III (pT3, N1); G2			Stadium II (pT3, N0); G2
14 (LSAB-Methode)	cpn	n	fn	cpfn
14 (IF)	pl=cp	pl=cp	pl=fn	cp=n
8e4 (IF)	pl=cp	cp=n	pl	pl=cp=n
7a7 (IF)	cp	cp	pl=cp	cp
7d11 (IF)	neg	pl=cp	pl	neg
9g2 (IF)	fn>pl=cp	pl>cp	pl	pl=cp=n
9g10 (IF)	pl=cp	pl=cp	cp	cp=n

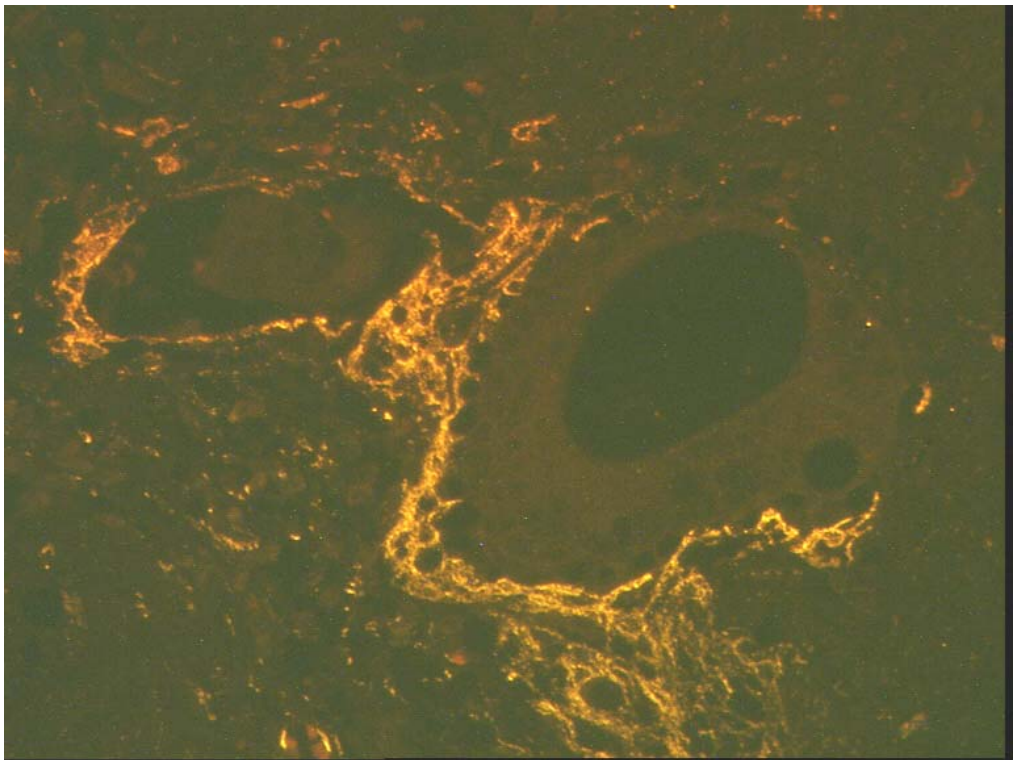
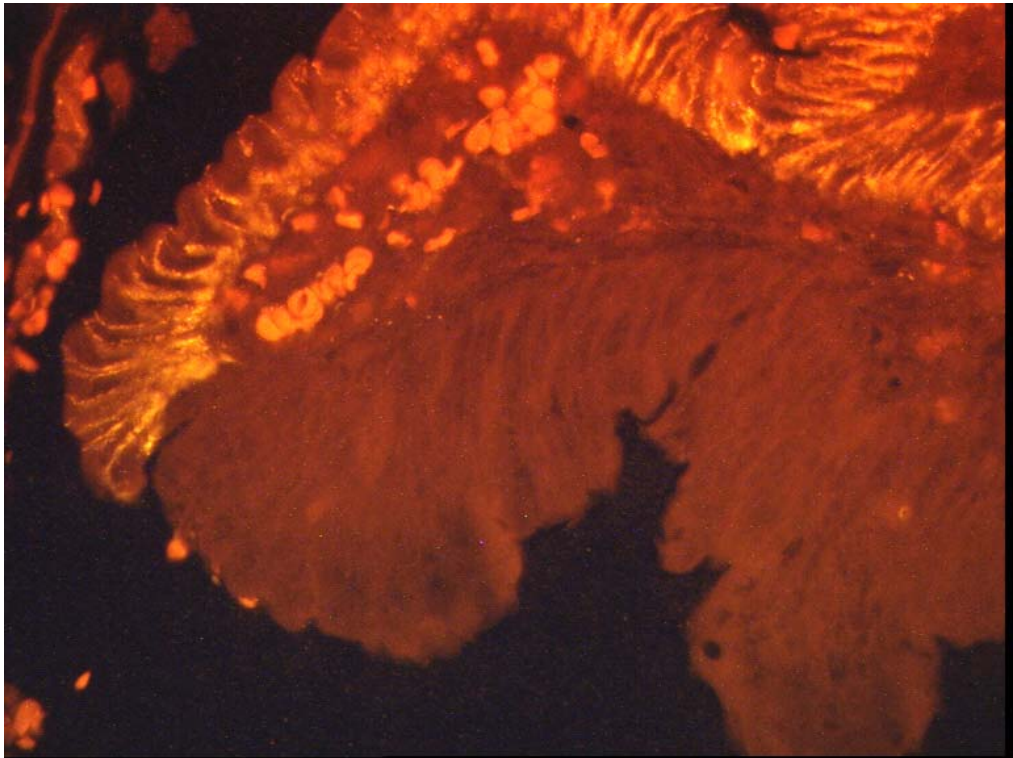


Abb. 21: Kolorektale Tumoren mit einem Expressionsverlust des Antikörpers 7d11. und der fluorochromkonjugierten indirekten Methode
Oberes Bild (Vergrößerung x63): orthologes Epithel mit membranöser Expression neben pathologischem Epithel mit Expressionsverlust. Unteres Bild (Vergrößerung x40): pathologisches Epithel mit Expressionsverlust, welches von exprimierendem perineuralem Gewebe umgeben ist.

Weitere 2 der 82 untersuchten kolorektalen Primärtumoren zeigten einen Expressionsverlust der β -Catenin-Antikörper 7a7 und 7d11. 7a7 hat sein Epitop im Bereich der Aminosäuren 35-50, und 7d11 hat sein Epitop im Exon 3 des β -Catenin-Proteins (nanoTools).

In früheren Untersuchungen wurde bei beiden Tumoren eine Mikrosatelliteninstabilität festgestellt sowie β -Catenin-Mutationen. Bei Patient 3 zeigte sich eine Deletion im Exon 3 / 4 und bei Patient 4 eine Deletion im Exon 2 / 3 des Tumors (Kölble et al., 2000).

Tab. 11: Merkmale der Patienten und Tumoren mit einem Expressionsverlust der Antikörper 7a7 und 7d11, Primärtumoren mit keinem Verlust der Fehlpaarungsreparaturproteine

	Patient 3			Patient 4
	Primärtumor	Lymphknoten Metastase	Lymphknoten Metastase	Primärtumor
Alter	73			66
Fehlpaarungs- reparaturproteine	positiv			positiv
Familienanamnese	negativ			negativ
Tumorstadium / Differenzierungsgrad	Stadium III (pT3, N2), G2			Stadium II (pT3, N0), G1
14 (LSAB-Methode)	cpfn			cp
14 (IF)	fn>pl	pl=fn>cp	pl>cp	pl
8e4 (IF)	pl=cp	pl=fn	pl	pl>cp
7a7 (IF)	neg	cp	cp	neg
7d11 (IF)	neg	het pl	het pl	neg
9g2 (IF)	het pl	pl	pl=cp	pl
9g10 (IF)	pl>cp	pl=cp	cp	pl

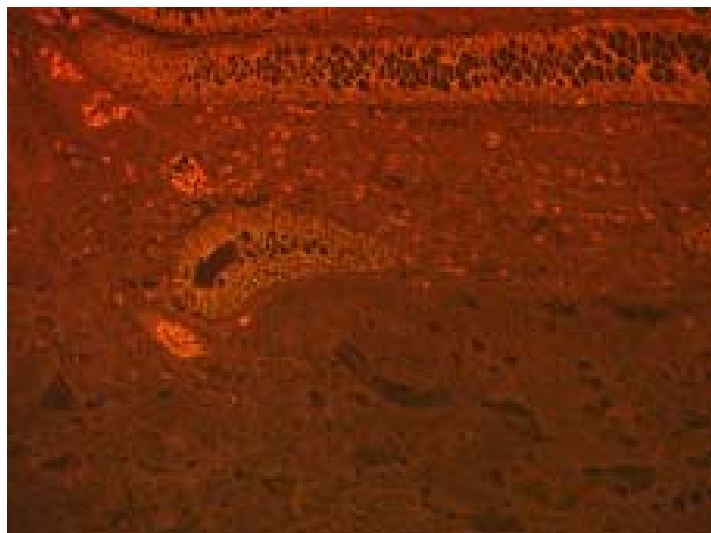
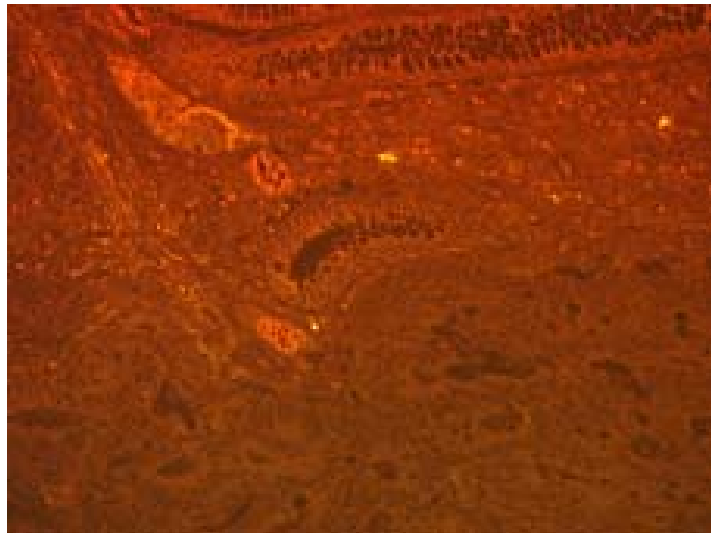
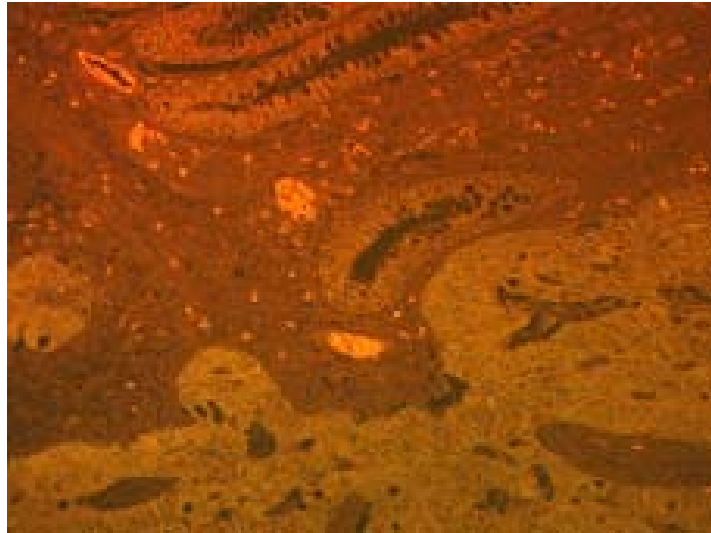


Abb. 22: Positive Expression des Antikörpers 14 (a), Expressionsverlust der Antikörper 7a7 (b) und 7d11 (c), Vergrößerung x40, fluorochromkonjugierte indirekte Methode

4.4.2.2 β -Catenin Expressionsanalyse von Lymphknotenmetastasen

Unter den 30 der 82 untersuchten Fälle fanden sich Lymphknotenmetastasen (LknMx). Die LknMx wurden für jeden Antikörper in Abhängigkeit des Expressionsmusters des Primärtumors untersucht.

Präsentierte der Tumor ein orthologes β -Catenin-Signal, so war dies mit den Antikörpern 14, 8e4, 7a7, 7d11 und 9g2 in der überwiegenden Mehrzahl der LknMx auch zu beobachten. Der Antikörper 9g10 zeigte dagegen bei einem Tumor mit orthologem Muster eine LknMx mit nukleärem Muster.

Wiesen die Primärtumoren nukleäre β -Catenin-Signale auf, war das mit den Antikörpern 14, 8e4 und 9g10 in den LknMx mehrheitlich auch der Fall. Mit dem Antikörper 7d11 zeigten die LknMx überwiegend orthologe Muster. Die Antikörper 7a7 und 9g2 präsentierten jeweils zur Hälfte in LknMx orthologe und nukleäre β -Catenin-Expressionssignale.

Da die Anzahl der Lymphknotenmetastasen in den einzelnen Gruppen sehr klein bis nicht vorhanden ist, wird auf eine Signifikanzprüfung verzichtet.

Tab. 12: β -Catenin-Signale der Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit zum orthologen und nukleären Expressionsmuster der Primärtumoren

	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	18	0	19	14	2	6	8	6
8e4	17	2	22	15	2	11	13	10
7a7	4	0	12	9	1	1	4	3
7d11	24	3	33	22	4	1	5	3
9g2	24	3	29	19	3	3	7	6
9g10	0	1	11	7	0	1	3	3

Es wurden 23 FRS-Tumoren mit 36 LknMx sowie 7 FRI-Tumoren mit 7 LknMx untersucht.

Präsentierte der FRS-Tumor ein orthologes β -Catenin-Signal, so war dies mit den Antikörpern 14, 8e4, 7a7, 7d11 und 9g2 in der überwiegenden Mehrzahl der LknMx auch zu beobachten. Der Antikörper 9g10 zeigte bei einem Tumor mit orthologem Muster dagegen in der LknMx ein nukleäres β -Catenin. Bei den Tumoren mit nukleären Expressionssignalen wiesen die LknMx mit den Antikörpern 14, 8e4 und 9g2 vorwiegend nukleäre β -Catenin-Muster auf. Mit dem Antikörper 7d11 konnten man in den LknMx überwiegend orthologe Muster sehen. Der Antikörper 7a7 präsentierte jeweils eine LknMx mit orthologem und eine mit nukleärem β -Catenin-Signal.

Die FRI-Tumoren mit orthologen β -Catenin-Signalen zeigten dies auch vornehmlich bei den LknMx mit den Antikörpern 14, 8e4, 7d11 und 9g2. Mit den Antikörpern 7a7 und 9g10 gab es keinen Primärtumor mit orthologem Muster, dessen LknMx weder ein orthologes noch ein nukleäres Muster aufwies. Bei den FRI-Tumoren mit nukleären Mustern zeigte jeweils eine LknMx mit den Antikörpern 8e4 und 9g10 auch ein nukleäres Signal. Eine LknMx mit dem Antikörper 9g2 wies ein orthologes Signal auf. Mit den Antikörpern 14, 7a7 und 7d11 war kein Primärtumor mit Kernfärbung zu beobachten.

Tab. 13: β -Catenin-Expressionsmuster der LknMx in Abhängigkeit der FRS- und FRI-Primärtumoren mit orthologen und nukleären β -Catenin-Signalen

FRS	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	15	0	16	11	2	6	8	6
8e4	13	2	17	10	2	10	12	9
7a7	4	0	11	8	1	1	4	3
7d11	20	3	27	16	4	1	5	4
9g2	20	2	23	13	2	3	6	5
9g10	0	1	9	5	0	0	2	2

FRI	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	3	0	3	3	0	0	0	0
8e4	4	0	5	5	0	1	1	1
7a7	0	0	1	1	0	0	0	0
7d11	4	0	6	6	0	0	0	0
9g2	4	1	6	6	1	0	1	1
9g10	0	0	1	1	0	1	1	1

Es wurden 2 FRS +Fa-Tumoren mit 3 LknMx, 21 FRS -Fa-Tumoren mit 5 LknMx, 5 FRI +Fa-Tumoren mit 5 LknMx sowie 2 FRI -Fa-Tumoren mit 2 LknMx untersucht.

Präsentierte ein FRS +Fa-Tumor ein orthologes β -Catenin-Signal, so war dies mit den Antikörpern 14, 8e4, 7d11 und 9g2 in den LknMx auch zu beobachten. Mit dem Antikörper 7d11 zeigte eine von drei LknMx ein nukleäres Muster. Kein Primärtumor zeigte mit den Antikörpern 7a7 und 9g10 ein orthologes β -Catenin-Muster. Ein nukleäres Signal demonstrierte nur der Antikörper 8e4 bei einem Tumor. Zwei LknMx wiesen korrespondierende Muster auf. Mit den Antikörpern 14, 7a7, 7d11, 9g2 und 9g10 zeigte kein Tumor nukleäre Signale.

Wiesen die FRS -Fa-Tumoren ein orthologes β -Catenin-Expressionsmuster auf, so konnte dies mit den Antikörpern 14, 8e4, 7a7, 7d11 und 9g2 mehrheitlich bei den LknMx auch beobachtet werden. Ein Primärtumor wies mit dem Antikörper 9g10 ein orthologes Muster auf, die korrespondierende LknMx zeigte ein nukleäres Muster. Bei den Primärtumoren mit Kernfärbung wiesen auch die LknMx mit den Antikörpern 14, 8e4 und 9g2 vornehmlich nukleäre β -Catenin-Muster auf. Mit dem Antikörper 7d11 überwog das orthologe Muster bei den LknMx. Der Antikörper 7a7 zeigte jeweils eine LknMx mit orthologen und eine mit nukleären Muster. Zwei Primärtumoren mit Kernfärbung konnten, mit dem Antikörper 9g10 gefunden werden, wobei die korrespondierenden LknMx weder ein orthologes noch ein nukleäres Muster aufwiesen.

Die FRI +Fa-Tumoren mit orthologen β -Catenin-Signalen zeigten dies auch vorwiegend bei den LknMx mit den Antikörpern 14, 8e4, 7d11 und 9g2. Einen Tumor mit orthologen Muster gab es mit dem Antikörper 9g10, die korrespondierende LknMx zeigte weder eine orthologe noch eine nukleäre Expression. Mit dem Antikörper 7a7 konnte kein Tumor mit orthologen Muster identifiziert werden. Bei zwei Primärtumoren mit Kernfärbung wiesen die korrespondierenden LknMx mit den Antikörpern 8e4 und 9g10 auch nukleäre β -Catenin-Muster auf. Mit dem Antikörper 9g2 zeigte eine LknMx ein orthologes Muster. Kein Primärtumor mit Kernfärbung konnte mit den Antikörpern 14, 7a7 und 7d11 beobachtet werden.

Präsentierten die FRI -Fa-Tumoren ein orthologes Expressionsmuster, so konnte man bei einer LknMx mit dem Antikörper 8e4 ein orthologes Muster beobachten. Mit dem Antikörper 9g2 zeigte eine LknMx ein orthologes und eine ein nukleäres Muster. Der Antikörper 7d11 demonstrierte in einer LknMx ein nukleäres Muster. Eine LknMx wies

mit dem Antikörper 7a7 weder ein orthologes noch ein nukleäres Muster auf. Keinen Primärtumor mit orthologen Muster konnte man mit den Antikörpern 14 und 9g10 beobachten. In der Gruppe der FRS -Fa-Tumoren zeigte kein Primärtumor Kernfärbung mit den β -Catenin-Antikörpern.

Tab. 14: β -Catenin-Expressionsmuster der LknMx in Abhängigkeit der FRS +Fa- und FRS -Fa- Primärtumoren mit orthologen und nukleären β -Catenin-Signalen

FRS +Fa	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	1	0	1	1	0	0	0	0
8e4	1	0	1	1	0	2	2	1
7a7	0	0	0	0	0	0	0	0
7d11	2	1	3	2	0	0	0	0
9g2	1	0	1	1	0	0	0	0
9g10	0	0	0	0	0	0	0	0

FRS -Fa	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	14	0	15	10	2	6	8	6
8e4	12	2	16	9	2	8	10	8
7a7	4	0	11	8	1	1	4	3
7d11	18	2	24	14	4	1	5	4
9g2	19	2	22	12	2	3	6	5
9g10	0	1	9	5	0	0	2	2

Tab. 15: β -Catenin-Expressionsmuster der LknMx in Abhängigkeit der FRI +Fa- und FRI -Fa-Primärtumoren mit orthologen und nukleären β -Catenin-Signalen

FRI +Fa	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	3	0	3	3	0	0	0	0
8e4	3	0	4	4	0	1	1	1
7a7	0	0	0	0	0	0	0	0
7d11	3	0	5	5	0	0	0	0
9g2	3	0	4	4	1	0	1	1
9g10	0	0	1	1	0	1	1	1

FRI -Fa	Tumor ortholog				Tumor nukleär			
	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.	LknMx ortholog	LknMx nukleär	LknMx insges.	Tumor insges.
14	0	0	0	0	0	0	0	0
8e4	1	0	1	1	0	0	0	0
7a7	0	0	1	1	0	0	0	0
7d11	0	1	1	1	0	0	0	0
9g2	1	1	2	2	0	0	0	0
9g10	0	0	0	0	0	0	0	0