

## 5 Diskussion

### 5.1 $\beta$ -Catenin-Expression im unveränderten kolorektalen Epithel

Die Kontrolle und Aufrechterhaltung der normalen interzellulären Adhäsion wird reguliert vom Cadherin-Catenin-Komplex (Takeichi et al., 1991).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin bilden mit der intrazellulären Domäne des E-Cadherins einen Komplex und stellen die Verbindung zu den Actin-Filamenten der Zelle her (Kemler et al., 1993). Biochemische Untersuchungen zeigen, daß  $\alpha$ -Catenin keine direkte Verbindung zum E-Cadherin hat. Vielmehr vermittelt es die Verbindung des Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplexes mit dem Actin-Zytoskelett. Zwischen  $\beta$ -Catenin und E-Cadherin besteht eine direkte Verbindung (Ozawa et al., 1989; 1992). Bei immunhistologischen Untersuchungen von E-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin wurde im gesunden kolorektalen Epithel ein membranöses Färbemuster nachgewiesen (Aust et al., 2001; Ikeguchi et al., 2001; Takayama et al., 1998; Valizadeh et al., 1997). Ein membranöser Expressionsverlust von E-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin steht im Zusammenhang mit Entdifferenzierung, Invasion und Metastasierung des Tumors.

Auch in dieser Arbeit konnte in allen Fällen im unveränderten epithelialen Gewebe des Kolorektums eine membranös betonte Expression mit den  $\beta$ -Catenin-Antikörpern nachgewiesen werden. Die Menge des  $\beta$ -Catenins im Zytoplasma und im Zellkern liegt unterhalb der immunhistologischen Detektionsschwelle im unveränderten Gewebe.

Das zytoplasmatische Expressionsverhalten der Antikörper 7a7 und 9g10 könnte auf ihre Bindungsregionen am Protein oder unbekannte Kreuzreaktionen in der Zelle zurückzuführen sein. Der Antikörper 7a7 bindet im Bereich der Aminosäuren 35-50, und der Antikörper 9g10 hat Affinitäten zur Armadillo-Region. In einigen Tumoren wie Pankreas-, Ösophagus-, Schilddrüsen-, Magen-, Blasen-, Kolorektal- und Lungenkarzinomen zeigt das Expressionsmuster des E-Cadherin-Catenin-Komplexes nicht immer eine membranöse Reduktion oder einen Verlust, häufig ist eine Umverteilung von der Zellmembran zum Zytoplasma zu beobachten (Bailey et al., 1998; Bringuier et al., 1999; El-Hariry et al., 1999; Hiscox et al., 1997; Jawhari et al., 1999; Nawrocki et al.,

1998; Serini et al., 1996). Diese Umverteilung wird auf eine veränderte Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenins zurückgeführt (Nawrocki et al., 1998; Serini et al., 1996). Eine Anzahl von Rezeptoren und non-Rezeptor-Tyrosinkinasen und Phosphatasen, eingeschlossen EGFR, c-erbB2-onkogen und Hepatozytenwachstumsfaktor-Rezeptor, c-met, interagieren mit den Cateninen. Die Interaktion verändert den Phosphorylierungsstatus der Catenine und folglich die E-Cadherin vermittelte Adhäsion (Barth et al., 1997; Hiscox et al., 1999; Liu et al., 1997; Müller et al., 1999; Soler et al., 1998). So ist nicht auszuschließen, daß aufgrund ihrer Bindungsaffinität am  $\beta$ -Catenin-Protein die Antikörper 7a7 und 9g10 Hinweise geben auf diese oder ähnliche Modifikationen im Cadherin-Catenin-Komplex.

## **5.2 Unterschiede im Expressionsverhalten des $\beta$ -Catenin-Antikörpers 14 mit der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz**

Bei der LSAB-Methode kommt es zur enzymatischen Reaktion mit einem Chromogen. Häufig ist neben der spezifischen Reaktion mit dem Enzymkomplex eine unspezifische Verteilung des Chromogens zu beobachten, welches auch durch gründliches Spülen nicht vermieden werden kann. Durch das diffus verteilte Chromogen leidet die histologische Zellauflösung, was bei der späteren Beurteilung zu ungenauen und sogar falschen Ergebnissen führen kann. Anders sieht es bei der Immunfluoreszenz aus, deren großer Vorteil ein blasser unspezifischer Hintergrund ist. Hierbei setzen sich die fluoreszierenden Signale scharf und deutlich ab. Da Fluoreszenzfarbstoffe gegenüber den Farbmolekülen bei der LSAB-Methode wesentlich kleiner sind, lassen sich einzelne und feine Strukturen leichter und genauer detektieren.

Aufgrund dieser Tatsachen verglichen wir die LSAB-Methode mit der fluorochromkonjugierten indirekten Methode. Wir untersuchten 45 Tumoren mit beiden Methoden und dem Antikörper 14, welcher überwiegend auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet wird. 2/3 der Karzinome wiesen identische Ergebnisse auf. 1/3 der Tumoren zeigten mit der LSAB-Methode ein pathologisches Expressionsverhalten und mit der Immunfluoreszenz ein orthologes Signalmuster.

Immunhistochemische Studien zum  $\beta$ -Catenin mit der ABC- (Avidin-Biotin-Komplex) / LSAB-Methode und der APAAP- (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase) Methode zeigten überproportional häufig nukleäre Färbungen (Tabelle 16).

Es ist anzunehmen, daß nicht nur das diffus verteilte Chromogen zu Interpretationsproblemen führt, sondern auch die endogene Peroxidase und die endogene alkalische Phosphatase sowie das endogene Biotin wenig beachtete Fehlerquellen darstellen. Weiterhin gestaltet sich ein Vergleich immunhistochemischer Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen schwierig, da eine Standardisierung bei der Antigendemaskierung, der Geräte und der Puffer schwer zu realisieren sind.

Da bei der Immunfluoreszenz störende Einflüsse durch das endogene Biotin sowie unerwünschte Enzymreaktionen durch die endogene Peroxidase und endogene alkalischen Phosphatase umgangen werden, stellt sie im Vergleich zur ABC-, LSAB und APAAP-Methode das spezifischste und sensitivste Antigennachweisverfahren dar.

Tab. 16: Studien über immunhistochemische Untersuchungen zum  $\beta$ -Catenin an kolorektalen Karzinomen: ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex); APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)

<b>Autor</b>	<b>Anzahl der Tumoren</b>	<b>Antikörper <math>\beta</math>-Catenin</b>	<b>Methode</b>	<b>Ergebnis</b>
Hugh et al., 1999	crc 47	14	ABC	80% nukleär
Hao et al., 1997	crc 52	14	ABC	78,8% nukleär
Shimizu et al., 2002	crc ( nur MSI) 33	14	ABC	94% nukleär und/oder zytoplasmatisch
Iwamoto et al., 2000	crc 83	14	APAAP	100% nukleär und zytoplasmatisch
Kobayashi et al., 2000	crc 44	14	ABC	46% nukleär
Ghadimi et al., 1999	crc 91	14	APAAP	4% membranös reduziert

## **5.3 Hereditäre und sporadische FRS- und FRI-Tumoren und epidemiologische sowie pathologische Merkmale**

### **5.3.1 Alter**

Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei kolorektalen Karzinomen liegt am Ende des 7. und am Beginn des 8. Lebensjahrzehnts (Krebsatlas Deutschland, 2001). Patienten mit familiärer Disposition, bei denen die Amsterdam-Kriterien zutreffen, erkrankten überwiegend vor dem 50. Lebensjahr (Mecklin et al., 1986 (1); Samowitz et al., 2001; Vasen et al., 1999).

Bei unserem Kollektiv erkrankten die Patienten mit FRS +Fa-Tumoren 6,8 Jahre und mit FRI +Fa-Tumoren 3,4 Jahre früher als Patienten mit FRI -Fa-Tumoren (durchschnittliches Erkrankungsalter 48,1 Jahre). Patienten mit FRI -Fa -Tumoren waren im Schnitt 16,7 Jahren früher betroffen als Patienten mit FRS -Fa-Tumoren (durchschnittliches Erkrankungsalter 60,8 Jahre).

Drei Arbeiten, die in Tabelle 17 aufgeführt werden, zeigen für Patienten mit FRI / MSI-Tumoren ein Erkrankungsalter zwischen 61 und >70 Jahren.

Da verschiedene Studien unter verschiedenen Gesichtspunkten eine Vorauswahl getroffen haben, gestaltet sich ein Vergleich schwierig. Gezeigt werden kann, daß Patienten mit positiver Familienanamnese früher erkranken als Patienten mit negativer Familienanamnese. Deutlich wird auch das frühere Erkrankungsalter der Patienten mit FRI -Fa-Tumoren gegenüber den FRS -Fa-Tumoren.

Es ist anzunehmen, daß bei einem Defekt im Fehlpaarungsreparatursystem in kürzerer Zeit mehr Gene von Mutationen betroffen sind und dadurch die Schwelle zur Tumorentstehung schneller überschritten wird als bei Tumoren ohne Defekte im Fehlpaarungsreparatursystem.

Tab. 17: Studien zur Altersverteilung bei kolorektalen Karzinomen mit und ohne Fehlpaarungsreparaturdefekt

<b>Autor</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>durchschnittliche Altersangaben</b>		
Furlan et al., 1998	100	MSS 64,4 Jahre; MSI-L 70 Jahre; MSI-H 63,5 Jahre		
Gafá et al., 2000	216	Jahre	MSI-H (%)	MSI-L / MSS (%)
		≤45	4,5	5,8
		46-60	13,7	23,3
		61-75	47,7	52,3
		>75	34,1	18,6
Lanza et al., 2002	724	Jahre	MSI-H (%)	MSI-L / MSS (%)
		<50	9,5	5,8
		50-70	39,3	65,3
		>70	51,2	28,9

### 5.3.2 Geschlecht

Am kolorektalen Karzinom leiden 22% mehr Frauen als Männer in Deutschland (Krebsatlas Deutschland 2001), wobei Frauen im Durchschnitt 5 Jahre später erkranken als Männer.

In der vorliegenden Arbeit waren mehr Männer als Frauen sowohl in der FRS- als auch in der FRI-Tumorgruppe betroffen. Bei Betrachtung der Tumorgruppen hinsichtlich der Familienanamnese gab es mehr Männer als Frauen in den FRS +Fa-, FRS -Fa- und FRI +Fa-Tumorgruppen. Anders zeigte sich das Verhältnis in der FRI -Fa-Tumorgruppe, hier gab es mehr Frauen als Männer.

Die in Tabelle 18 aufgeführten Arbeiten zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Was einerseits an der Anzahl der Patienten liegen kann, aber auch auf epidemiologische Unterschiede des untersuchten Kollektivs zurückzuführen ist.

Bei den sporadischen FRI-Tumoren gibt es Hinweise, daß es auf Grund von Methylierungen des Promotors des MLH1-Gens zu dessen Funktionsverlust kommt (Herman et al., 1998; McGivern et al., 2004; Toyota et al., 1999). Einige Arbeiten berichten von einem höheren Frauenanteil in dieser Tumorgruppe (Laghi et al., 2003; Malkhosyan et al., 2000).

Tab. 18: Studien zur Verteilung der Geschlechter bei kolorektalen Karzinomen mit und ohne Fehlpaarungsreparaturdefekt

Autor	Anzahl der Patienten	Verteilung der Geschlechter		
			MSI / FRI (%)	MSS / FRS (%)
Furlan et al., 1998	100	m	38,6	50
		w	61,4	50
Gafá et al., 2000	216	m	66,6	38,5
		w	33,3	61,5
Lanza et al., 2002	724	m	40,9	49,7
		w	59,1	50,3

### 5.3.3 Histopathologische Differenzierungsgrade

Das kolorektale Karzinom kann histopathologisch in die Differenzierungsgrade gut, mäßig, schlecht und undifferenziert nach dem TNM-System der UICC (International Union against Cancer) eingeteilt werden. Differenzierungsgrade geben insofern Hinweise auf die biologische Qualität von Karzinomen, als niedrig differenzierte im allgemeinen eine höhere Progressionsneigung zeigen.

Bei histopathologischen Untersuchungen weisen FRI-Tumoren meistens eine typische Pathologie auf. Es zeigen sich häufig schleimbildende bzw. etwas seltener Siegelringzell-Tumoren, welche nur schlecht differenziert sind und plexiforme oder keine Drüsen bilden (Jass et al., 1998). Trotz der schlechten Differenzierung haben die Patienten eine bessere Prognose als Patienten mit FRS-Tumoren (Halling et al., 1999; Kim et al., 1994; Lothe et al., 1993).

Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der histopathologischen Differenzierungsgrade sind in dieser Arbeit zu sehen. Dennoch zeigen die FRI-Tumoren prozentual einen größeren Anteil an schlecht bzw. undifferenzierten Tumoren.

Die Diskrepanz zwischen den aggressiven histologischen Merkmalen und der besseren Überlebensrate könnte mit der in der Regel beobachteten lymphozytären Infiltration in Zusammenhang stehen. Denkbar wäre, daß die Mutationen, welche bei FRI-Tumoren vorkommen, nicht überwiegend das Zellwachstum beeinflussen, sondern auch die Expression von tumorassoziierten Antigenen veranlassen, die dann eine Immunreaktion hervorrufen (Kim et al., 1994).

#### **5.3.4 Tumorstadien**

Die Tumorausbreitung wird nach den Regeln der TNM-Klassifikation für Kolorektalkarzinome bestimmt. Die Prognose der Tumorerkrankung korreliert mit der Infiltration des Karzinoms in die Darmwand und seiner Ausdehnung in benachbarte Strukturen (T), dem Ausmaß des Lymphknotenbefalls (N) und dem Auftreten von Fernmetastasen (M). Patienten mit FRI-Tumoren zeigen eine bessere Überlebensrate als Patienten mit FRS-Tumoren. In Studien wurde gezeigt, daß die Überlebensrate gut mit dem Tumorstadium korreliert. FRI-Tumoren wachsen eher verdrängend und haben seltener lymphogene oder hämatogene Metastasen, weswegen sie auch bei Diagnosestellung in der Regel niedrigere Tumorstadien aufweisen (Gryfe et al., 2000; Ward et al., 2001).

Keine signifikante Korrelation konnte in dieser Studie gefunden werden zwischen den FR-System und den Tumorstadien. Dennoch ist zu sehen, daß Fernmetastasen in 35,9% der FRS -Fa-Tumoren diagnostiziert wurden und nur in 5,3% der FRI +Fa-Tumoren sowie in keinem Fall der FRI -Fa-Tumoren.

Während des Prozesses der Metastasierung müssen Barrieren wie die Extrazellulärmatrix und die Basalmembran durchbrochen werden, so daß Tumorzellen Anschluß zum Blut- und Lymphgefäßsystem finden. Eine große Anzahl an Untersuchungen konnte die Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen im Rahmen der Tumorausbreitung nachweisen, die an der Degradierung extrazellulärer Matrix beteiligt sind. In 90% der kolorektalen Adenokarzinome wird MMP-7 vermehrt exprimiert (Adachi et al., 1999). Diese gesteigerte Expression von MMP-7 in kolorektalen Karzinomen korreliert mit dem Vorkommen von LknMx und Fernmetastasen (Hasegawa et al., 1998). MMP-7 ist ein Zielgen von  $\beta$ -Catenin. Ein positiver Zusammenhang konnte zwischen nukleärem  $\beta$ -Catenin und der MMP-7-Konzentration gezeigt werden (Crawford et al., 1999). Da überwiegend FRS- weniger FRI-Karzinome APC-Mutationen aufweisen, dies die  $\beta$ -Catenin-Konzentration beeinflusst und damit die MMP-7-Expression, könnte dadurch das vermehrte Vorkommen von Fernmetastasen in FRS-Tumoren erklärt werden.

#### **5.4 $\beta$ -Catenin-Expression bei Primärtumoren**

Es ist mehrfach gezeigt worden, daß zur Degradierung des  $\beta$ -Catenins das APC-Protein,  $\beta$ -Catenin und GSK3 $\beta$  einen Komplex bilden. In 80% der kolorektalen Karzinome wurden Mutationen im APC-Gen gefunden (Miyoshi et al., 1992). Mutiertes APC hat nicht mehr die Fähigkeit zur Komplexbildung, und  $\beta$ -Catenin kann sowohl im Zytoplasma als auch im Kern akkumulieren. Nicht nur genetische Veränderungen im APC-Gen führen zum  $\beta$ -Catenin-Konzentrationsanstieg, sondern auch Mutationen in der Regulationsdomäne des  $\beta$ -Catenins. Man muß davon ausgehen, daß nicht nur mutagene Veränderungen im APC- und  $\beta$ -Catenin-Gen die Konzentration des  $\beta$ -Catenins beeinflussen, sondern daß jede pathogenetische Veränderung von Faktoren des Wnt-Signalweges das Konzentrationsgleichgewicht des  $\beta$ -Catenin-Proteins in der Zelle stören kann.

Unsere Untersuchungen an Primärtumoren zeigten, daß mit allen Antikörpern das orthologe Expressionsmuster überwog. Einige Tumoren wiesen abhängig vom Antikörper unterschiedliche  $\beta$ -Catenin-Signale auf. So ist anzunehmen, daß bei pathologischen



$\beta$ -Catenin-Signalen nur eines Antikörpers die  $\beta$ -Catenin-Konzentration nicht normale Spiegel aufweist. Da es Anzeichen dafür gibt, daß Proteinmodifikationen eine wichtige Rolle in Regulationsprozessen spielen (Behrens et al., 1993; Shibamoto et al., 1995), könnte dies auch zur veränderten Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Protein geführt haben.

Proteinmodifikationen können sehr vielfältig sein. Es kann zu Glykosylierungen, Acetylierungen, zur Oxidation und Reduktion, zu Phosphorylierungen und Methylierungen kommen. Zudem entfalten Proteine ihre spezifischen Funktionen oft erst in Komplexen mit anderen Proteinen, und einige Proteine werden durch Anbindung kleinerer Moleküle in ihrer Aktivität moduliert. Das Genom gibt den Bauplan der Proteine vor, aber ihre spezifischen Funktionen werden erst im jeweiligen Funktionszusammenhang festgelegt. Es ist anzunehmen, daß eine sich ändernde Proteinmodifikation Einfluß auf die Entstehung von Karzinomen hat.

Durch Verwendung nicht nur eines  $\beta$ -Catenin-Antikörpers konnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, veränderte  $\beta$ -Catenin-Spiegel in tumorösen Zellen aufzuspüren. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob morphologisch ähnliche Karzinome gleiche  $\beta$ -Catenin-Muster zeigen und ob dies ein Hinweis auf unterschiedliche Proteinmodifikationen in Tumoren sein könnte.

## **5.5 $\beta$ -Catenin-Expression bei fehlpaarungsreparatursuffizienten und -insuffizienten Primärtumoren**

Nach dem heutigen Stand der Untersuchungen nimmt man an, daß Mutationen im APC-Gen als auch Mutationen in der regulierenden Domäne des CTNNB1 die hauptsächlichen Faktoren sind, die zur unkontrollierten Aktivierung des Wnt-Signalweges führen (Ilyas et al., 1999; Morin et al., 1997).

Neben kolorektalen Karzinomen mit APC-Gen Mutationen weisen 10-15% Mutationen in der regulierenden Domäne des CTNNB1 auf (Ilyas 1997; Iwao et al., 1998; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Sparks et al., 1998). In weiterführenden Untersuchungen konnten zwei Studien einen Zusammenhang zwischen APC-Mutationen und

MSS-Tumoren aufzeigen (Olschwang et al., 1997; Salashor et al., 1997). Mutationen im CTNNB1 wurden von einigen Untersuchern mit MSI-Tumoren in Verbindung gebracht (Kitaeva et al., 1997; Mirabelli-Primdahl et al., Müller et al., 1998; 1999; Shito et al., 2001; Sparks et al., 1998).

Abnormale immunhistologische  $\beta$ -Catenin-Muster, speziell eine Umlokalisierung vom membranösem Muster zum zytoplasmatischen und nukleären, wird als Hinweis für einen Funktionsverlust des APC-Proteins oder Mutationen in der regulierenden Domäne im  $\beta$ -Catenin-Gen gewertet (Jass et al., 1999).

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen FRS und FRI mit und ohne Familienanamnese und den  $\beta$ -Catenin-Mustern nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein überwiegend orthologes Expressionsmuster mit den Antikörpern 7a7, 7d11, 9g2 und 9g10. Der Antikörper 14 in der FRS -Fa- und der FRI -Fa-Gruppe als auch der Antikörper 8e4 in der FRS +Fa- und der FRI -Fa-Gruppe zeigten in den meisten Fällen ein pathologisches  $\beta$ -Catenin-Signal.

Aufgrund unserer Ergebnisse mit 6 verschiedenen  $\beta$ -Catenin-Antikörpern muß man davon ausgehen, daß zwischen Mutationen im APC-Gen und im  $\beta$ -Catenin-Gen und somit einer Umverteilung des  $\beta$ -Catenin-Proteins in der Zelle kein direkter Zusammenhang besteht. Weiterhin lassen die Untersuchungen zur Fehlpaarungsreparatur und den  $\beta$ -Catenin-Mustern keine Korrelation erkennen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Arbeit von Jass (1999). Jass untersuchte 115 Tumore und konnte bei 26 MSI-Tumoren kein auffallend nukleäres  $\beta$ -Catenin-Muster beobachten. Seine Untersuchungen bei MSS-Tumoren zeigten eine Umlokalisierung des  $\beta$ -Catenins von membranös zu nukleär-zytoplasmatisch. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte durch die unterschiedlichen immunhistochemische Untersuchungsmethoden bedingt sein.

Wenn man davon ausgeht, daß nicht nur CTNNB1-Mutationen zu einem Konzentrationsanstieg des  $\beta$ -Catenins in der Zelle führen, sondern Mutationen in allen regulierenden Komponenten des Wnt-Signalwegs, dann sollten bei über 80% der kolorektalen Karzinome veränderte Expressionsmuster zu finden sein. Untersuchungen fanden nukleär-zytoplasmatische Expressionsmuster bei 25% bis über 90% der kolorektalen Karzinome (Miyaki et al., 1999; Shimizu et al., 2002; Young 2001). Dieser große Unterschied läßt sich auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden zurückführen, auch werden Unterschiede bei der Auswahl der Materialien eine Rolle spielen.

Eine Arbeit berichtet von inhomogenen  $\beta$ -Catenin-Mustern (Brabletz et al., 1998). So fanden sie nukleäres  $\beta$ -Catenin vermehrt in der Invasionsfront. Im Zentrum des Tumors wiesen die Zellen membranöse Muster auf. Man vermutet, daß extrazelluläre Signale die Tumorzellen beeinflussen. Die Signale könnten über Invasivität und Wachstumsmuster entscheiden.

### **5.5.1 Antikörper-spezifisches CTNNB1-Expressionsmuster in kolorektalen Primärtumoren**

Von mehr als 70  $\beta$ -Catenin-Mutationen in kolorektalen Karzinomen wird berichtet. Zirka 90% der Mutationen wurden in 11 Codons als Missens-Mutation oder Frameshift-Deletion beschrieben. Frameshift-Deletionen kommen vorwiegend in FRI-Tumoren vor (Kim et al., 2003; Kitaeva et al., 1997).

Bei den von uns untersuchten Tumoren zeigten vier einen Expressionsverlust mit dem Antikörper 7d11. Der Antikörper bindet in Höhe der Aminosäuren 35-50 des  $\beta$ -Catenins. In dieser Region liegen die Aminosäuren 33, 37, 41, und 45 (Exon 3), welche essentiell für die Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$  und damit für die Regulation des  $\beta$ -Catenins im Wnt-Signalweg sind. Da sowohl die Antikörper 8e4 und 7a7 als auch 9g2 kein Expressionsverlust erkennen lassen, muß man dies als Deletion im Exon 3 der Bindungsstelle des Antikörpers 7d11 werten.

In drei Arbeiten wird von Deletionen im  $\beta$ -Catenin berichtet (Iwao et al, 1998; Murata et al., 2000; Müller et al., 1998). Iwao et al. fand bei sieben Kolorektalkarzinomen und Murata et al. bei drei Tumoren Deletionen im Exon 3, welche mehrere hundert Basenpaare umfaßt. Müller untersuchte eine 73jährige Frau mit einer Drei-Basen-Deletion im  $\beta$ -Catenin, die einen Verlust des Serins an Position 45 verursachte. Die Patientin wies keine Familienanamnese hinsichtlich Karzinome auf.

Zwei von uns untersuchte Patienten waren 30 Jahre oder jünger, und zwei Patienten hatten das 65. Lebensjahr schon überschritten. Fehlpaarungsreparaturinsuffizienzen zeigten die jüngeren Patienten, wobei nur einer eine positive Familienanamnese

aufwies. Die beiden älteren Patienten zeigten keinen Verlust der Fehlpaarungsreparaturproteine, und waren auch hinsichtlich einer positiven Familienanamnese leer. Diese Ergebnisse lassen keinen Zusammenhang zwischen Deletionen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenins und Fehlpaarungsreparaturinsuffizienz erkennen.

Da Deletionen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenins eher eine Rarität darstellen, gibt der Antikörper 7d11 die Möglichkeit diese mit immunistochemischen Untersuchungsmethoden und damit kostengünstig zu erkennen.

## **5.6 $\beta$ -Catenin-Expression bei Lymphknotenmetastasen**

Eine maligne Neubildung zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Invasion und zur Metastasierung aus. Für diese Prozesse müssen die Tumorzellen die Fähigkeit besitzen sich aus dem Zellverband zu lösen, zur Migration und zur Invasion in Lymph- und Blutgefäße befähigt sein. Differenzierte gesunde epitheliale Zellen zeigen diese Merkmale nicht. Gut differenzierte kolorektale Adenokarzinome wachsen in tubulären Strukturen und behalten einen epithelialen Phänotyp, nichtsdestotrotz besitzen sie die Fähigkeit zu metastasieren. Der Funktionsverlust des APC-Gens ist die häufigste initiale Mutation in kolorektalen Tumoren. Dies führt zur zytoplasmatischen und nukleären Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Nicht nur Zielgene wie c-myc und cyclin D1 sondern auch Gene, welche für invasives und metastasierendes Wachstum nötig sind wie Matrilysin (MMP-7), Fibronectin, CD44 and uPAR werden vom nukleären  $\beta$ -Catenin aktiviert.

Wir analysierten das  $\beta$ -Catenin-Expressionsmuster der LknMx im Vergleich zu denen in Primärtumoren. Orthologe Tumore zeigten vornehmlich auch orthologe Muster in den LknMx, wobei das nukleäre Muster eher selten zu beobachten war. Bei den Primärtumoren mit nukleären Mustern fiel auf, daß mit dem Antikörper 8e4 in allen Gruppen außer in der FRI -Fa-Tumorgruppe die LknMx überwiegend korrespondierende nukleäre  $\beta$ -Catenin-Signale zeigten. Die Antikörper 9g2 und 14 präsentierten bei den LknMx der FRS -Fa-Tumoren vornehmlich nukleäre  $\beta$ -Catenin-Muster.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß bei orthologen  $\beta$ -Catenin-Mustern in Primärtumoren diese auch in den LknMx zu sehen sind. Anders sieht es bei den Tumoren mit

nukleären Mustern aus. Hier fällt auf, daß das  $\beta$ -Catenin-Muster mit dem Antikörper 8e4 der LknMx vorrangig mit der Expression in den Primärtumoren korrespondiert. Der Antikörper 8e4 hat seine Bindungsstelle in der Region der Aminosäuren 27-37. Dieser Abschnitt liegt vor, für den Abbau wichtigen, Aminosäuren S37, T41 und S45. Da die Expressionsmuster in Primärtumoren und LknMx nur mit diesem Antikörper eine große Übereinstimmung bezüglich der nukleären Muster aufweisen, liegt die Annahme nahe, daß sich der Proteinabschnitt im Zuge der Metastasierung nicht verändert. Die Antikörper 9g2 und 14 zeigen ein ähnliches Verhalten wie der Antikörper 8e4, aber vornehmlich bei den FRS -Fa-Tumoren.

Man geht heute davon aus, daß in den meisten kolorektalen Karzinomen nukleärem  $\beta$ -Catenin bei der Invasion und Metastasierung eine entscheidende Rolle zukommt (Brabletz et al., 2000). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß neben Mutationen im  $\beta$ -Catenin- und APC-Gen mit Aktivierung der Zielgene sowie mesenchymale Faktoren auch Proteinmodifikationen eine Rolle spielen. Einen Einfluß von Zytokinen, extrazellulärer Matrix und Bindegewebszellen konnte an Karzinomen der Brust nachgewiesen werden (Bissell et al, 1999). Dies läßt ähnliche Prozesse in kolorektalen Karzinomen wahrscheinlich erscheinen. Die  $\beta$ -Catenin-Expression präsentiert sich sowohl innerhalb der epithelialen Neubildung als auch mit unterschiedlichen  $\beta$ -Catenin-Antikörpern überaus heterogen. Eine Möglichkeit wäre, daß extrazelluläre Faktoren, angelockt durch die Tumorzelle selber, Einfluß auf intrazellulären Proteine, deren Lokalisationen und Modifikationen nehmen und damit auf Invasivität und Metastasierung des Tumors.