

2. Material und Methode

2.1. Überblick

Die Grundlage der vorliegenden Untersuchung bildet das im Zeitraum von 1982 – 1994 in der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin im Rahmen der kurativen Resektion entfernte Tumorgewebe von 127 Patienten. Die retrospektive Ermittlung der klinischen Daten erfolgte anhand von Krankenunterlagen. Die Angaben zur Verlaufsbeobachtung wurden dem Tumornachsorgeregister der chirurgischen Poliklinik entnommen. Anschließend erfolgte aus dem von der Pathologie zur Verfügung gestellten Tumorgewebe die Herstellung von histologischen Schnitten. Nach Etablierung der immunhistochemischen Färbetechnik (Titration der Antikörper anti-MSH2/anti-MLH1) schloß sich die Färbung aller Gewebeschnitte an, die abschließend mikroskopisch mittels eines Scores ausgewertet wurden.

2.2. Erhebung der Patientendaten

Es erfolgte die Zusammenstellung der Daten von Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom (d.h. innerhalb einer Familie neu aufgetretene CRC, die keiner genetischen Disposition entspringen), die sich im Zeitraum von 1982 - 1994 im Universitätsklinikum Benjamin Franklin der FU Berlin einer Operation unterzogen hatten. Die allgemeinen Patientendaten sowie die Angaben zum Tumor, zur Therapie und Nachsorge wurden aus den Krankenblättern und dem chirurgischen Tumornachsorgeregister entnommen. Erfasst wurden verstorbene Patienten und überlebende Patienten mit einer Mindestnachbeobachtungszeit von fünf Jahren. Die Tumornachsorge beinhaltete neben der körperlichen Untersuchung die Bestimmung der Tumormarker, bildgebende Verfahren (Ultraschall, Röntgen, CT) sowie die Endoskopie (Tabelle 1). Folgende klinisch-pathologische Daten wurden aus dem Archivmaterial ermittelt:

1. Patientendaten:

- Name
- Geburtsdatum
- Geschlecht
- Identifikationsnummer

2. Therapiedaten:

- Operationsdatum und Operationsmethode
- prä- und postoperative Chemotherapie und/oder Strahlentherapie

3. Tumordaten:

- Tumorlokalisation
- TMN-Kategorie (nach UICC 1987)
- Anzahl der entfernten Lymphknoten
- Grading (nach Bloom und Richardson, 1957)
- R-Klassifikation
 - R0 = kein Residualtumor
 - R1 = nur histologisch nachweisbarer Residualtumor (Resektionsrand)
 - R2 = makroskopisch nachweisbarer Residualtumor bzw. nicht resektable Metastasen
- Angiosis
- Lymphangiosis
- Histologienummer

4. Nachsorgedaten:

- Tumorrezidiv
 - Lokalrezidiv (Diagnosedatum, Therapie, Histologienummer)
 - Fernmetastasen (Diagnosedatum, Lokalisation, Therapie, Histologienummer)
- letzter Kontakt zum Patienten, Todesdatum, Todesursache

Tabelle 1: Nachsorgeschema für kolorektale Neoplasien

Kontrolluntersuchungen	1. Jahr	2. Jahr	3. - 10. Jahr
Anamnese klinische Untersuchung Labor (CEA, BB, AP) Sonografie	vierteljährlich	halbjährlich	1x-jährlich
Rö-Thorax Rekto- und Koloskopie	halbjährlich	halbjährlich	1x-jährlich
CT-Becken (bei Rektosigmoid-Karzinomen)	1x-jährlich	bei Symptomatik	bei Symptomatik

2.3. Ein- und Ausschlußkriterien

Die Auswahl des Patientenguts richtete sich nach bestimmten Ein- und Ausschlußkriterien, die zu Beginn der Studie determiniert wurden. Insgesamt wurden die Krankenunterlagen von 582 Patienten gesichtet. Voraussetzung war die Erfüllung folgender Bedingungen, so daß insgesamt 127 Patienten eingeschlossen werden konnten.

↳ **Einschluß:** Sporadische kolorektale Karzinome
Kurative Operation (R0)
Lückenloses Follow-up
Vorhandensein der Tumorgewebeblöcke

↳ **Ausschluß:** UICC IV
Zweit-/ Doppelkarzinome
Operation in einem auswärtigen Krankenhaus

2.4. Anfertigung der histologischen Schnitte

Vom Institut für Pathologie (UKBF) wurden die formalin-fixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebeblöcke von 127 Patienten zur Verfügung gestellt. In allen Fällen richtete sich die Auswahl der repräsentativen Blöcke nach den Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten. Daraufhin erfolgte die Herstellung ca. 3 - 5 µm dicker histologischer Schnitte mit dem Mikrotom. Überwiegend enthielten die Paraffinblöcke einen Bereich mit normaler Darmmukosa, die an das Karzinom angrenzte. In den wenigen Fällen, wo keine Referenzmukosa enthalten war, wurden Schnitte von den Abtragungsebenen angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger (ChemMate™ Capillary Gap Plus Slides, DAKO, Code No. S 2024) aufgetragen und über Nacht im Ofen bei einer Temperatur von 60° C getrocknet. Nach der Entparaffinierung der Schnitte mittels Xylol und absteigender alkoholischer Reihe folgte eine 5-minütige hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Citratpuffer (pH 6,0).

2.5. Immunhistochemische Technik

2.5.1. Etablierung der Immunhistochemie von MLH1 und MSH2

Die Untersuchung der Proteinexpression von MLH1 und MSH2 mittels Immunhistochemie ist erst möglich geworden, seitdem es die entsprechenden paraffin-gängigen Antikörper zu erwerben gibt. Zu Beginn der experimentellen Arbeit gab es nur wenige Publikationen zu diesem neuen Verfahren, so daß wir in eigenen Verdünnungsreihen die optimale Konzentration, die zu einem zuverlässigen und reproduzierbaren Färberesultat führt, austitrierten. Dabei dienten histologische Schnitte mit normalem Darm als positive Kontrolle.

2.5.2. APAAP-Technik

Dieses Färbeverfahren baut sich aus der Kombination von drei Reagenzien auf. Dabei ist der Primärantikörper spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Der

Sekundärantikörper (Brückenantikörper) verbindet den primären Antikörper mit einem gegen ein Markerenzym (Alkalische Phosphatase) gerichteten Antikörper (Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex), dem APAAP-Komplex (Abbildung 3). Hierbei handelt es sich um eine sog. unkonjugierte Methode, da das Markerenzym über einen Anti-Enzym-Antikörper an den Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion fixiert wird. Der primäre und der gegen die Alkalische Phosphatase gerichtete Antikörper stammen von der gleichen Spezies (Maus), während als Brückenantikörper ein Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper benutzt wird. Durch Wiederholung der Inkubationen mit dem Brücken-AK und APAAP-Komplex ist es möglich, die Intensität der Farbreaktionen zu verbessern. Gleichzeitig werden so unspezifische Bindungen reduziert. Die histochemische Reaktion der alkalischen Phosphatase (Markerenzym) mit Neufuchsin-haltiger Entwicklungslösung führt zu einem roten Reaktionsprodukt, welches den Antigen-Antikörper-Komplex und damit die lokale Immunreaktion sichtbar macht (Cordell et al. 1984).

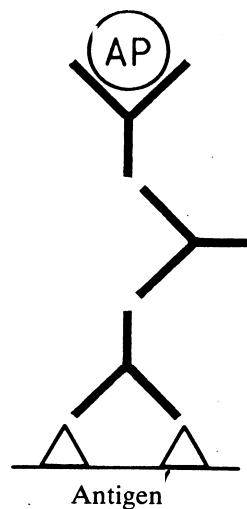


Abbildung 3: Alkalische-Phosphatase (AP)-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex-Methode

2.5.3. Durchführung der Expressionsanalyse

Im Anschluß an die Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden die primären monoklonalen Antikörper anti-hMSH2 (Mouse anti-human MSH2, Clone G219-1129, PharMingen) und anti-hMLH1 (Mouse anti-human MLH1, Clone G168-15, PharMingen) appliziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für beide Antikörper galt die gleiche Verfahrenstechnik. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Brückenantikörper (Rabbit anti-Mouse von DAKO, No. Z 0259) und mit dem Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP, Herstellung im UKBF) für jeweils 30 Minuten inkubiert. Darauf erfolgte eine Wiederholung der Inkubationen mit dem Brückenantikörper und APAAP-Komplex für jeweils 10 Minuten. Schließlich wurden die Schnitte für eine Dauer von 20 Minuten in eine Entwicklungslösung gebracht und nachfolgend mit Hämalan gegengefärbt.

Nach den Vorbehandlungen und zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Präparate mehrmals in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung gespült. Die primären Antikörper (monoklonale Mausantikörper) wurden in einer Verdünnung von 1:25 (hMSH2) und 1:10 (hMLH1) angewendet. Als Verdünnungsmedium diente "Antibody Diluent" von DAKO (S 2022). Der Brückenantikörper (Rabbit Anti-Mouse) wurde in einer Lösung (mit SUSE = RPMI + Humanserum) von 1:20 angewendet. Die Verdünnung von APAAP erfolgte mit RPMI in einem Verhältnis von 1:20.

Die Entwicklungslösung setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: Entwicklungspuffer, Propandiol, Levamisole (Sigma L-9756), Naphtol-AS-Bi-Phosphat (Sigma N-2250), DMF (Merck 3034), Natriumnitrit (Merck 102 F-0220) und Neufuchsin (Merck 4040). Die Lösung wurde auf einen pH 8,8 eingestellt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalan. Zum Eindecken der Präparate diente Kaisers Glyceringelatine (Merck 9242).

2.6. Mikroskopische Auswertung

Mittels der immunhistochemischen Methode ist es möglich, das Genprodukt der Mismatch-Repair-Gene (hMSH2, hMLH1) nachzuweisen. Bei positiver Expression des Genproduktes zeigen die proliferativen Zellen der normalen Darmmukosa und die Tumorzellen eine Färbung der Zellkerne. Häufig konnte auch eine Zytoplasmafärbung beobachtet werden. Blieb eine Kernfärbung in den Tumorzellen aus, nicht aber in der normalen Darmmukosa (positive Kontrolle), dann wurde dieses Färberesultat als fehlende Proteinexpression gedeutet. Eine negative Kontrolle erfolgte durch Weglassen des Primärantikörpers. Die Auswertung der Immunfärbungen mit den Antikörpern anti-hMLH1 und anti-hMSH2 wurde semiquantitativ vorgenommen. Dabei erfolgte zunächst die lichtmikroskopische Einstellung einer Übersicht über Tumor und angrenzendes Gewebe (normaler Darm) zur Beurteilung der Färbe- und Schnittqualität. Bei der Auswertung wurden nur Bereiche mit gleichmäßiger Färbung berücksichtigt. Jedoch wurde diese Auswahl bei Tumoren erschwert, die im Inneren und an ihren Randgebieten unterschiedlich starke Farbreaktionen aufwiesen. Die Gradeinteilung, die in Anlehnung an Jin et al. (Cancer 1999) bei der mikroskopischen Auswertung vorgenommen wurde, ist aus der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Scoreeinteilung

Gradeinteilung	Proteinexpression von MLH1 und MSH2 im Tumor
I	keine
II	schwach
III	mäßig
IV	stark

Demnach entspricht Grad I einer negativen Proteinexpression. Grad II weist eine schwache Expression auf, während Grad III und IV eine mäßige bis stark positive Proteinexpression repräsentieren. Die Auswertung der normalen Darmmukosa erfolgte nach der gleichen Gradeinteilung. Wiesen die Zellen in den distalen Zweidritteln der intestinalen Krypten (da

sich hier die rasch proliferierenden Zellen befinden) eine Expression auf, so wurden sie als stark positiv (Grad IV) eingestuft. Zusätzlich wurde die Qualität der Färbungen und Schnitte beurteilt und dokumentiert. Die mikroskopische Auswertung wurde durch gemeinsame Begutachtung mit einem Pathologen an 50 Gewebeschnitten erlernt. Die weitere Begutachtung der Schnitte erfolgte allein. Zur Qualitätssicherung wurden zufällig ausgewählte Fälle von einem Pathologen überprüft. Die lichtmikroskopische Durchsicht der Objektträger erfolgte bei 200-facher Vergrößerung zweimal in 5-wöchigem Abstand, in abweichenden Fällen dreimal. Teilweise wurde bei den diskordanten Fällen die Immunhistochemie wegen intratumoraler Heterogenität wiederholt.

Die basalen Anteile der Krypten des normalen Kolongewebes zeigen eine positive Färbung von MSH2 (Abbildung 4). Eine negative Proteinexpression von MLH1 im Karzinom und angrenzendes positives Darmgewebe ist in der Abbildung 5 zu sehen. Eine schwach positive Expression von MLH1 und mäßig starke Expression von MSH2 im Karzinom sind in den Abbildungen 6 und 7 zu sehen. Hier weisen nur einige Tumorzellen sowie nicht-neoplastische Stromazellen eine positive Immunreaktion auf. Stark positive Proteinexpression im Karzinom (obere Bildhälfte) und angrenzendem normalem Darmgewebe in der Abbildung 8.

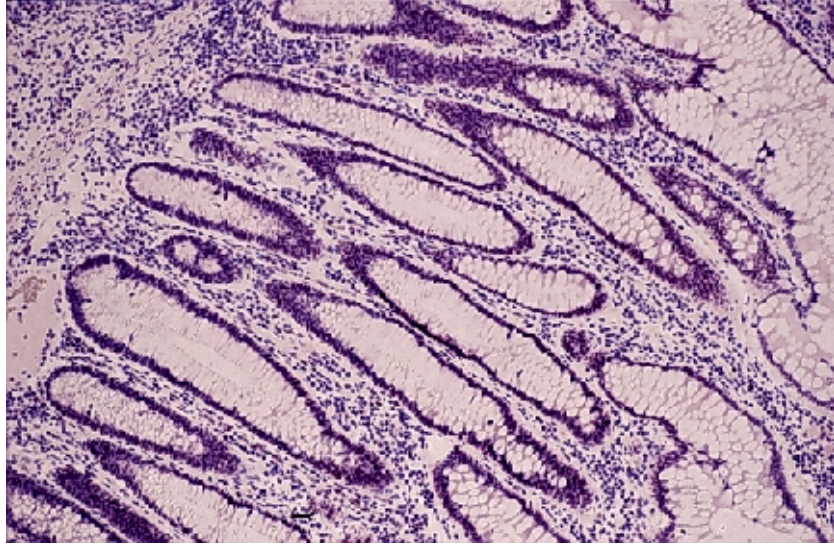


Abbildung 4: Referenzmucosa mit Proteinexpression von MSH2

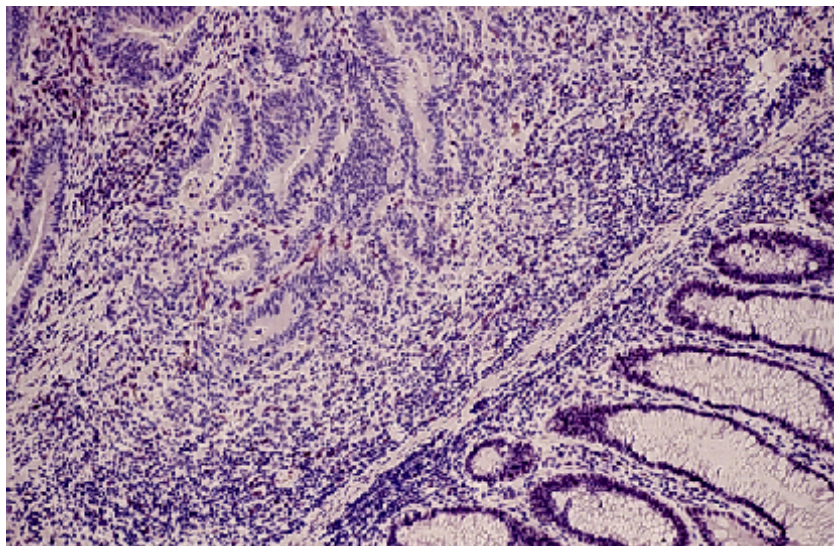


Abbildung 5: Fehlende Expression von MLH1 im Tumor

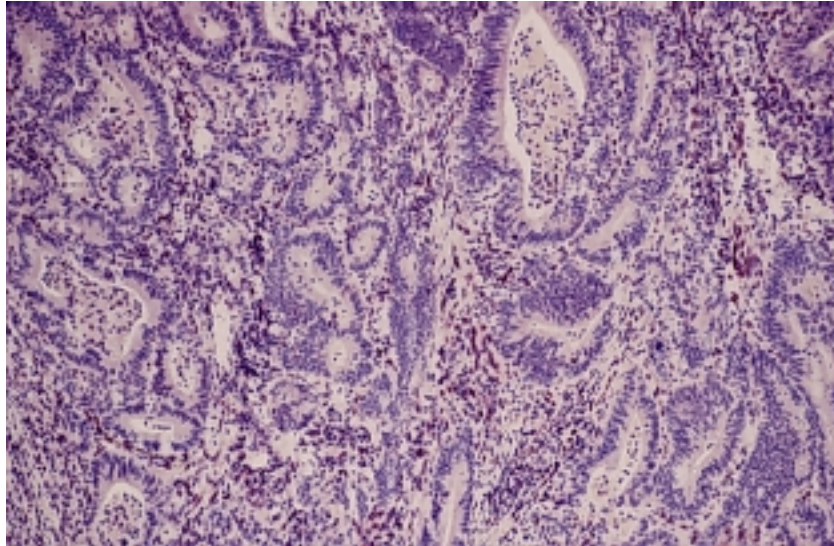


Abbildung 6: Schwache Expression von MLH1 im Tumor

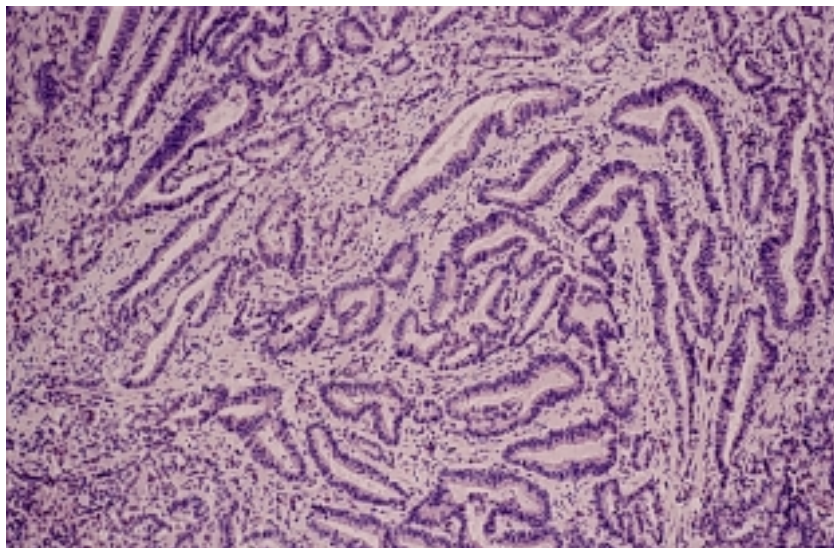


Abbildung 7: Mäßige Expression von MSH2 im Tumor

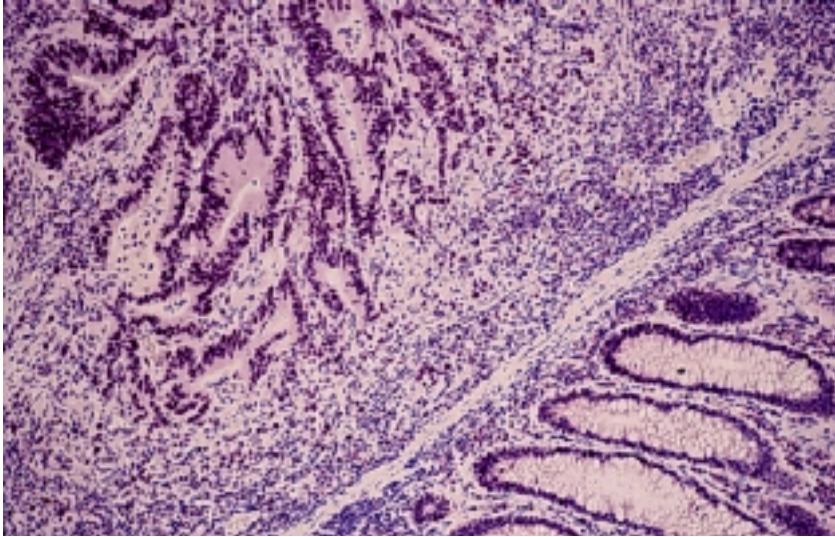


Abbildung 8: Starke Expression von MSH2 im Tumor

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Ermittlung einer Beziehung zwischen Proteinexpression von hMSH2/ hMLH1 und den verschiedenen klinisch-pathologischen Faktoren erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Die Überlebensanalysen wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Mit dem Log-Rank-Test wurden Unterschiede im Überleben ermittelt. Als Signifikanzniveau galt $p < 0.05$.