

4. Diskussion

4.1. Einführung

Das Wissen über genetische Grundlagen von Krankheitsdispositionen bietet neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Neben der klinischen Diagnostik des kolorektalen Karzinoms erlangt die Ermittlung von Gendefekten zunehmend an Bedeutung, um so Menschen mit erhöhtem Risiko ermitteln und entsprechend versorgen zu können. Der Nachweis von mutierten Genen erfordert aufwendige molekulargenetische Analysetechniken. Die genomische DNA-Sequenzierung ist der „Goldstandard“ dieser Mutationsanalysen. Sie bedürfen einer speziellen Laborausstattung, die nicht überall zur Verfügung steht. Für die Differenzierung zwischen Keimbahn- (pränatal erworben) und somatischen Mutationen (postnatal erworben) ist eine Sequenzanalyse unentbehrlich, jedoch als Screeningmethode zur Identifizierung von MMR-Genmutationen aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands nicht geeignet. Daher werden in jüngster Zeit andere Verfahren zum Screening erprobt, die rasch und einfach durchführbar sind. Derzeit steht hierbei der Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität mittels PCR-Technik an erster Stelle. Die MSI-Bestimmung ist hilfreich bei der Erkennung von HNPCC-Patienten, da diese Tumoren in 90 % der Fälle eine Instabilität aufweisen (Aaltonen et al. 1994). Allerdings erfordert diese Untersuchung nicht nur Zeit, sondern auch extrahierte DNA, so daß nicht alle Tumoren routinemäßig damit getestet werden können (Cawkwell et al. 1999). Eine alleinige MSI-Analyse ist nicht ausreichend, da keine Aussage darüber getroffen werden kann, welches Gen mutiert ist. Zudem haben nicht alle MSI-positiven Tumoren einen nachweisbaren MMR-Gendefekt.

Ein neues Verfahren zur Identifizierung von Repairgendefekten ist die immunhistochemische Expressionsanalyse. Das Ausbleiben der Proteinexpression im Tumor liefert einen präzisen Hinweis auf das betroffene Genprodukt, wodurch aufwendige Sequenzanalysen aller MMR-Gene überflüssig werden (Leach et al. 1996). In Untersuchungen von Thibodeau et al. (1996, 1998) und Cawkwell et al. (1999) wurde die Beziehung zwischen der Proteinexpression von MLH1/MSH2 und dem Nachweis einer Mutation sowie dem Nachweis der MSI analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß instabile Tumoren mit Mutation in einem MMR-Gen eine

veränderte Proteinexpression aufweisen. Hingegen war bei stabilen und Mutation-negativen Tumoren keine veränderte Proteinexpression sichtbar (Thibodeau et al. 1996).

Sporadische CRC mit Mikrosatelliteninstabilität und hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome entstehen aufgrund eines Defektes im DNA-Reparatursystem. Die gemeinsame genetische Grundlage ist mit spezifischen klinisch-pathologischen Charakteristika sowie einer besseren Prognose assoziiert. Da nicht alle mikrosatelliteninstabilen Tumoren Veränderungen in den MMR-Genen aufweisen, war es das Ziel dieser Arbeit, an einem kurativ operierten Patientenkollektiv mit sporadischem kolorektalen Karzinom die Häufigkeit von MMR-Gendefekten zu bestimmen. Nach Etablierung des immunhistochemischen Verfahrens führten wir die Expressionsanalyse der MMR-Gene MLH1 und MSH2 durch. Desweiteren wurde überprüft, ob Defekte in den Reparaturgenen einen Einfluß auf den klinischen Verlauf und das tumorbiologische Verhalten von sporadischen CRC ausüben.

4.2. Diskussion der Methodik

Eine starke Expression von MSH2 und MLH1 ist in den proliferierenden Zellen der intestinalen Krypten, die für eine kontinuierliche Produktion differenzierter Zellen verantwortlich sind, zu beobachten. Differenzierte Zellen, die sich in der Nähe des Darmlumens befinden, exprimieren keine Repairproteine, denn sie benötigen deren Funktion nicht mehr (Wilson et al. 1995, Leach et al. 1996). Die normale Darmmucosa, die in unserer Untersuchung als positive Kontrolle diente, zeigte wie erwartet eine MSH2- und MLH1-Expression in den unteren Zweidritteln der intestinalen Krypten. Kolorektale Karzinome mit funktionstüchtigen MMR-Genen exprimieren das entsprechende Genprodukt, dagegen bleibt in HNPCC-assoziierten CRC mit bekannter Keimbahnmutation in MSH2 oder MLH1 eine Expression aus. Auch bei Untersuchungen an familiären und sporadischen kolorektalen Karzinomen blieb bei bekanntem Gendefekt die Proteinexpression aus (Thibodeau et al. 1996).

In der vorliegenden Studie war das normale Färbemuster für beide Antikörper im Kern (Thibodeau et al. 1996) und oftmals auch im Zytoplasma (Fujiwara et al. 1998). Tumorzellen, die keine Kernfärbung in Anwesenheit von kerngefärbten nicht-neoplastischen Zellen zeigten,

wurden als negativ gewertet (Thibodeau et al. 1996, Maeda et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). In mehreren Fällen war, wie bei Fujiwara et al. (1998) beschrieben, eine intratumorale Heterogenität in der Kernfärbung der Tumorzellen zu beobachten. Ein Teil des Karzinomgewebes zeigte eine deutliche Expression, während andere Bereiche kaum exprimierende Tumorzellen enthielten. Meist zeigten die Randgebiete eine intensive Reaktion, während im Inneren des Tumors eine Färbung ausblieb. Diese Heterogenität wirkte sich nachteilig auf die Interpretation der Immunhistochemie aus. Ursächlich dafür sind Vorbehandlungen des Gewebematerials, wie die Art des Fixierungsmittels (Formalin), die Entwässerung, Paraffineinbettung und Entparaffinierung. Während dieser Prozeduren bilden sich Quervernetzungen zwischen den Proteinen, wodurch sich die dreidimensionale Struktur der Proteine in unterschiedlichem Maße verändert und die Antigenität beeinträchtigt wird. Mit der hitzeinduzierten Antigendemaskierung werden einige dieser Veränderungen wieder rückgängig gemacht. Hierzu wird häufig, wie auch von uns, der Citratpuffer verwendet.

Die immunhistochemische Färbetechnik mit dem APAAP-Komplex ist in der pathologischen Routinediagnostik ein weit verbreitetes Verfahren. Die Hintergrundfärbung infolge der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe wird durch den APAAP-Komplex eliminiert (Cordell et al. 1984). Es ist somit nicht mehr erforderlich, in einem zusätzlichen Blockierungsschritt die endogene Peroxidase zu hemmen. Die Entwicklung des Markerenzym (Alkalische Phosphatase) mit Neufuchsin ergibt ein kräftiges rotes Färberesultat, welches einen guten Kontrast zur Gegenfärbung mit Hämalaun darstellt.

Eine positive Proteinexpression im Tumor impliziert nicht zwangsläufig, daß ein funktionstüchtiges Protein vorliegt. MMR-Genmutationen führen in 70 - 80 % zu einem Abbruch der Proteinsynthese, wodurch ein funktionsloses Protein entsteht (Kölble und Schlag 1999), d. h. die Proteinexpression im Tumorgewebe bleibt aus. Das Mutationsspektrum umfaßt Deletionen, Einzelbasenverluste, nonsense- und missense-Mutationen, die bei HNPCC-Patienten ein verändertes Molekulargewicht des betroffenen Proteins verursachen (Chung und Rustgi 1995). Jedoch ist die Immunhistochemie nicht in der Lage alle Mutationen aufzudecken. So führen missense-Mutationen zwar zu funktionslosen Proteinen, aber anscheinend zu einer normalen Proteinexpression (Thibodeau et al. 1996, Rüschoff et al. 1998, Jass 1999). Die klinische Bedeutung der missense-Mutation ist noch unbekannt. In

Untersuchungen an kleinen Patientenkollektiven mit HNPCC- und sporadischen CRC mittels Sequenzanalyse und IHC sind missense-Mutationen selten beschrieben worden. Wie hoch der Anteil von missense-Mutationen bei sporadischen kolorektalen Karzinomen ist, läßt sich aus der Literatur nicht entnehmen. Daher muß auch mit einigen nicht detektierten Gendefekten in unserem Kollektiv gerechnet werden.

Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, erfolgte die Einteilung der immunhistochemischen Ergebnisse bislang in positive und negative Expression (Thibodeau et al. 1996 und 1998, Maeda et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). Eine positive Färbung war vorhanden, wenn Tumorzellen eine Kernfärbung zeigten, während bei fehlender nukleärer Färbung der neoplastischen Zellen eine negative Expression vorlag. Alle immungefärbten Kerne wurden als positiv gedeutet, ungeachtet ihrer Färbeintensität. In der zugrundeliegenden Studie erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Proteinexpression in Anlehnung an eine Gradeinteilung von Jin et al. (Cancer 1999). Hierbei wurde die Expression in den Tumoren als fehlend (negativ), schwach, mäßig oder stark beurteilt. Anschließend wurden alle Fälle in zwei Gruppen eingeteilt, in eine mit verminderter (negativ und schwach) und eine mit vorhandener (mäßig und stark) Proteinexpression.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Immunhistochemie in ihrer Aussagekraft abhängig ist von der Art und Dauer der Gewebefixation, der Dicke der Tumorschnitte, der verwendeten Antikörper, der posttranslationalen Modifikation der Proteine sowie der subjektiven Beurteilung des Untersuchers. Jedoch ist die immunhistochemische Expressionsanalyse eine zuverlässige und vielversprechende Methode, die, zusätzlich zur pathologischen Routinediagnostik angewandt, weitere Informationen über Tumoren liefern kann (Thibodeau et al. 1998, Marcus et al. 1999). Bei einer Multizenterstudie, durchgeführt von der International Collaborative Group - HNPCC, stellte sich die immunhistochemische Methode als ein sensitives und spezifisches Screening-Verfahren heraus (Möslein et al. 2000).

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Häufigkeit von MMR-Gendefekten beim sporadischen CRC

Im eigenen Untersuchungsgut konnte bei 127 Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom ein Expressionsverlust der MMR-Gene (MLH1 und MSH2) in 12 % nachgewiesen werden. Immunhistochemische Studien von Cawkwell et al. (1999) und Chaves et al. (2000) an sporadischen CRC ergaben auch eine fehlende Expression von MLH1 und MSH2 in 11 % bzw. 12 %. Einen Überblick über die Häufigkeit von MMR-Gendefekten beim kolorektalen Karzinom gibt die Tabelle 8. Gleichzeitig bietet sie auch eine Übersicht über die Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität beim CRC. Die verschiedenen Untersuchungsmethoden, die zur Ermittlung des MMR-Genstatus führten, sind aufgelistet.

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den in der Tabelle 8 aufgeführten Publikationen ist zu berücksichtigen, daß nicht nur sporadische CRC, sondern auch HNPCC-assoziierte CRC und familiär gehäufte kolorektale Tumoren in den Analysen eingeschlossen waren (Thibodeau et al. 1996, 1998; Dietmaier et al. 1997). Die Prävalenz von mikrosatelliteninstabilen Tumoren ist größer, wenn Fälle mit positiver Familienanamnese von Karzinomen in Untersuchungen eingeschlossen sind (Bubb et al. 1996). Darüber hinaus handelt es sich in der Mehrheit um zuvor diagnostizierte MSI-positive kolorektale Karzinome, bei denen eher ein MMR-Gendefekt zu erwarten ist. Beim Vergleich der Angaben zur MSI in Tabelle 8 ist zu beachten, daß einige Autoren (Dietmaier et al 1997, Thibodeau et al. 1998) zwischen MSI-high- und MSI-low-Tumoren unterscheiden, während andere die Differenzierung zwischen hoch und gering instabilen Tumoren nicht vornehmen (Aaltonen et al. 1998, Chaves et al. 2000). Einige Studien untersuchten entweder nur die Expression von MSH2 oder von MLH1.

Tabelle 8: Häufigkeit von MMR-Gendefekten beim kolorektalen Karzinom

Autoren / Jahr	Fallzahl [n]	MSI+ [%]	MMR- Genmutationen [%]	Untersuchungs- methode
Sasaki, 1996	129	6	2	MA ①
Thibodeau, 1996	28	68 ②	28 50	MA IHC ①
Herfarth, 1997	61	21	10	MA
Dietmaier, 1997	58	26 ③	24	IHC
Thibodeau, 1998	188	22 ③	21	IHC
Senba, 1998	103	16	1	MA
Lleonart, 1998	125	19	5	MA
Kim, 1998	32	18	15	IHC
Maeda, 1998	94	-	26 ④	IHC
Aaltonen, 1998	509	12	2	MA
Cawkwell, 1999	117	-	11	IHC
Chaves, 2000	76	25	12	IHC
Eigene Ergebnisse	127	-	12	IHC

① MA: Mutationsanalyse; IHC: Immunhistochemie

② Einschluß von HNPCC, familiären und sporadischen CRC

③ nur MSI-high, Patientenkollektiv enthält auch HNPCC-Fälle

④ IHC nur an MSH2

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte eine Beziehung zwischen mikrosatelliteninstabilen CRC und einer veränderten Proteinexpression bzw. Mutation von MLH1/MSH2 festgestellt werden. Die Proteinexpression blieb nur in den Fällen aus, wo auch durch Mutationsanalysen ein Gendefekt nachgewiesen werden konnte. Jedoch war die Anzahl der instabilen Tumoren beträchtlich höher als die der nachweisbaren Mutationen in MLH1

und MSH2 (Senba et al. 1998, Leonart et al. 1998). Möglicherweise sind noch andere Defekte in bislang unbekannt Genen für die genetische Instabilität verantwortlich (Möslein et al. 1996). Aber auch Mutationsanalysen haben technische Grenzen. Einerseits sind sie durch die Größe der MMR-Gene erschwert (MSH2: 73 Kilobasen mit 16 Exons/ MLH1: 58 Kilobasen mit 19 Exons). Andererseits gibt es keine eindeutig bevorzugten Mutationsorte ("hot spots") (Chung und Rustgi 1995, Rüschoff et al. 1998). Die meisten Mutationen kommen in kodierenden Sequenzen vor, aber auch in Introns, Intron-Exon-Verbindungen und in regulatorischen Regionen (Chung und Rustgi 1995). Trotz moderner Untersuchungstechniken konnten bislang nur bei 70 % der HNPCC-Familien Keimbahnmutationen in MSH2 und/oder MLH1 nachgewiesen werden, aber bei über 90 % eine MSI (Rüschoff et al. 1998).

Die unterschiedlichen Angaben in den Studien zur Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilität beim kolorektalen Karzinom sind vermutlich durch die Untersuchung unterschiedlicher Patientenkollektive sowie durch Differenzen in der Durchführung der Methoden bedingt. Lange Zeit erfolgte die MSI-Bestimmung ohne einheitliche Definition und mit fehlendem Konsens darüber, welche und wieviel Mikrosatelliten-Marker bestimmt werden sollen. Dadurch ergaben sich zwischen den Publikationen Unterschiede, was die Ursache von erhöhten Angaben zur Instabilität beim CRC sein könnte. Seit der Standardisierung der MSI-Untersuchung (Boland et al. 1998) und der Klassifizierung der instabilen Tumoren in drei Subgruppen wurde jedoch über eine hohe Signifikanz zwischen dem immunhistochemisch nachweisbaren Expressionsverlust von MLH1/MSH2 und MSI-high-Tumoren berichtet (Dietmaier et al. 1997, Thibodeau et al. 1998). So wiesen 37 von 38 MSI-high-CRC einen Verlust der MMR-Proteinexpression auf (Marcus et al. 1999). In einer anderen Studie wurde sogar eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen RER-positiven CRC und dem Verlust der Expression von MSH2 und MLH1 ermittelt (Cawkwell et al. 1999).

Bei den MSI-high-Tumoren weisen über 40 % der untersuchten Mikrosatelliten-Marker eine Instabilität auf (Boland et al. 1998). Dieser Phänotyp, der in ca. 12 % beim kolorektalen Karzinom vorkommt, ist gekennzeichnet durch bestimmte histopathologische Merkmale (u. a. muzinös und schlecht differenziert), einem weniger aggressiven Verhalten und durch eine bessere Prognose. MSI-low-Tumoren haben in weniger als 40 % instabile Marker und repräsentieren 10 % aller CRC, während die Mehrheit der kolorektalen Karzinome (78 %) mikrosatellitenstabil (MSS) ist (Jass 1999). MSI-low- und MSS-Tumoren ist gemeinsam, daß

sie nicht durch eine fehlende Expression in den MMR-Genen gekennzeichnet sind (Dietmaier et al. 1997, Thibodeau et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). Die genannten Subgruppen unterscheiden sich in ihrem molekularen Profil, in klinisch-pathologischen Merkmalen, der Prognose und im Therapieverhalten (Jass 1999). Auch andere Studien konnten dem MSI-high-Typ bestimmte Merkmale und eine genetische Grundlage zuordnen, während die Bedeutung des MSI-low-Typs noch unklar ist (Gryfe et al. 2000).

In unserer Untersuchung lag eine negative Expression häufiger im MLH1- als im MSH2-Genprodukt vor. Bei HNPCC-Patienten liegen MLH1-Mutationen (60 %) an erster Stelle, gefolgt von MSH2 (38 %) und PMS1/PMS2 (2 %) (Trojan et al. 1999). Ältere Publikationen beschrieben Mutationen bei HNPCC häufiger in MSH2 (50 %) als in MLH1 (30 %) (Lynch et al. 1996). Die Verteilung beim sporadischen CRC läßt sich nicht genau bestimmen, da manche Studien nur die Expression eines Gens untersucht haben. Der in einer immunhistochemischen Analyse von Maeda et al. (1998) beschriebene hohe Anteil mit negativer MSH2-Expression (25 %) beim sporadischen CRC war bei uns und auch im Vergleich zu anderen Studien nicht zu beobachten, obwohl in der Untersuchung Patienten mit positiver Familienanamnese, FAP und HNPCC ausgeschlossen und nicht nur MSI-positive CRC einbezogen waren. Insgesamt scheint MLH1 jedoch häufiger betroffen zu sein (Herfarth et al. 1997, Thibodeau et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). In einer Arbeit von Thibodeau et al. (1998) zeigten 95 % der hochinstabilen CRC eine veränderte MLH1-Proteinexpression, während in der Studie von Dietmaier et al. (1997) beide MMR-Gene von einem Expressionsverlust gleichermaßen betroffen waren. Seit kurzem werden auch vor allem für das MLH1-Gen Veränderungen in genregulatorischen Einheiten, wie zum Beispiel dem Promotor beschrieben. Dies deutet daraufhin, daß nicht nur intragenische Mutationen, sondern auch hypermethylierende Prozesse zur Geninaktivierung führen können, die durch Mutationsanalysen nicht nachweisbar sind (Rüschoff et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). Bei der Mehrzahl der sporadischen CRC ist die fehlende MLH1-Proteinexpression mit der Methylierung des MLH1 Genpromotors assoziiert, denn demethylierende Agenzien bewirken eine Expression (Veigl et al. 1998, Herman et al. 1998). Dagegen ließ sich beim MSH2-Gen keine Hypermethylierung finden (Herman et al. 1998). Die epigenetische Modifikation (Methylierung von DNA) kann eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Genexpression

spielen. Durch das Vorhandensein von CpG methylierten Sequenzen in der Promoterregion kann es zur Suppression der Genexpression kommen (Mompalao et al. 2000).

In einem Fall war bei einer Patientin aus unserem Kollektiv eine fehlende Proteinexpression sowohl im MLH1- als auch im MSH2-Gen zu beobachten. Eine gleichzeitige Betroffenheit beider Gene ist selten (Dietmaier et al. 1997, Thibodeau et al. 1998, Cawwell et al. 1999). Da Untersuchungen oft nur zu einem Gen stattfinden, kann dieses Phänomen kaum beobachtet werden. Lediglich in einer Studie von Thibodeau et al. (1996) war ein familiäres CRC mit fehlender Expression in beiden Genen beobachtet worden.

4.3.2. Zusammenhang zwischen der MMR-Proteinexpression und Tumorcharakteristika

Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome und mikrosatelliteninstabile sporadische CRC sind sich in bestimmten klinisch-pathologischen Merkmalen ähnlich. Die Übereinstimmung in klinischen und histologischen Merkmalen ist ein Hinweis auf eine gemeinsame genetische Grundlage (Watson et al. 1998). Bedingt ist die Genese dieser Tumoren durch die Inaktivierung der MMR-Gene (Mutator-Pathway) (Chaves et al. 2000). Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß eine signifikante Assoziation zwischen mikrosatelliteninstabilen CRC und schlechter Differenzierung (Lothe et al. 1993, Gryfe et al. 2000), Muzinproduktion und lymphozytärer Reaktion in der Umgebung des Tumors (Kim et al. 1994), diploidem Status (Thibodeau et al. 1998, Feeley et al. 1999), Tumorgröße über 5 cm (Feeley et al. 1999) und jungem Alter der Patienten zum Diagnosezeitpunkt (Kim et al. 1994) besteht.

MSI-positive CRC sind signifikant häufiger proximal lokalisiert (Thibodeau et al. 1993 und 1998, Feeley et al. 1999, Gryfe et al. 2000) und auch HNPCC-assoziierte CRC sind vornehmlich (60 – 70 %) im rechtsseitigen Kolon lokalisiert (Rüschoff et al. 1998) .

In unserer Untersuchung waren die sporadischen kolorektalen Karzinome mit fehlender MLH1-Expression signifikant häufiger im proximalen Kolon lokalisiert, während dies für die Tumoren mit fehlender MSH2-Expression nicht zutrif. In vorangegangenen Studien waren Tumoren mit fehlender MMR-Proteinexpression ebenfalls mit einer rechtsseitigen Lokalisation im Kolon (Maeda et al. 1998, Chaves et al. 2000) assoziiert.

Eine signifikante Assoziation zwischen Lymphangiosis und fehlender MLH1-Expression, wie in unserer Studie ermittelt, ist bislang nicht beschrieben worden. Lediglich MSH2-negative Blasenkarzinome zeigten eine Tendenz zu vaskulärer und lymphatischer Invasion (Jin et al. 1999). Das Vorhandensein einer lymphatischen Invasion beim kolorektalen Karzinom wirkt sich prognostisch (wahrscheinlich unabhängiger prognostischer Faktor) ungünstig aus (Hermanek 1997).

In unserer Studie bestand keine Assoziation zwischen der MLH1-Expression und den anderen klinisch-pathologischen Faktoren, wie UICC-Stadium, TMN-Kategorie, Grading und Angiosis. Bezüglich der MSH2-Expression und den erwähnten klinisch-pathologischen Merkmalen fand sich kein statistischer Zusammenhang. In einer Expressionsanalyse von Chaves et al. (2000) wurden hinsichtlich der histologischen Differenzierung, TNM-Stadium und vaskulärer Tumorerinvasion keine Unterschiede zwischen MMR-Genprodukt exprimierenden und nicht exprimierenden CRC gefunden.

In anderen Untersuchungen konnte eine signifikante Assoziation zwischen fehlender MSH2-Expression und dem Auftreten von multiplen kolorektalen Karzinomen (synchrone und metachrone CRC) hergestellt werden (Maeda et al. 1998). Patienten mit defektem MMR-System haben ein 5,54-faches relatives Risiko ein metachrones CRC zu entwickeln (Cawkwell et al. 1999). Auch bei 40 % der HNPCC-Patienten kommt es innerhalb von 10 Jahren zu einem weiteren Karzinom. Eine hohe Rezidivrate ist typisch für HNPCC, während Fernmetastasen selten sind. Hochinstabile CRC von unter 50-jährigen Patienten sind ebenfalls assoziiert mit multiplen CRC sowie seltener auftretenden Metastasen (Gryfe et al. 2000). Aufgrund der Neigung zu multiplen CRC benötigen Patienten mit MMR-Gendefekten eine engmaschige Langzeitbeobachtung (Maeda et al. 1998, Cawkwell et al. 1999). In unserer Studie konnte kein Zusammenhang zwischen negativer MMR-Expression und erhöhter Rezidivrate (lokoregionäre Rezidive und Fernmetastasen) hergestellt werden. Bei der Zusammenstellung des Patientenkollektivs waren Zweit- und Doppelkarzinome sowie andere Tumorentitäten ausgeschlossen worden.

4.3.3. Einfluß der MMR-Gene auf die Prognose

Weitere Studien zeigten, daß sich HNPCC-assoziierte CRC und mikrosatelliteninstabile CRC durch eine bessere Prognose auszeichnen. Die 5-Jahresüberlebensrate betrug bei HNPCC-Patienten 65 % im Vergleich zu 44 % bei sporadischen kolorektalen Karzinomen (Sankila et al. 1996). Bei einem Teil der Patienten mit dokumentierter MMR-Keimbahnmutation war die Überlebensrate sogar noch höher. Auch in anderen Studien konnte der Überlebensvorteil für HNPCC-Patienten bestätigt werden (Myrhoj et al. 1997, Percesepe et al. 1997, Watson et al. 1998). Dagegen ergab eine Analyse von Bertario et al. (1999) keinen wesentlichen Überlebensvorteil für HNPCC- und FAP-Patienten verglichen mit Patienten mit sporadischem CRC. Hinsichtlich der besseren Prognose gibt es zwar widersprüchliche Angaben, die meisten Autoren favorisieren jedoch einen Überlebensvorteil für HNPCC-Patienten. Auch in einer stadienspezifischen Überlebensanalyse zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für HNPCC-Patienten (Watson et al. 1998). Allerdings bestand hier kein Unterschied im Überleben zwischen mutationspositiven und –negativen HNPCC-Fällen. Dagegen zeigten in einer anderen Studie Patienten mit mutationspositiven HNPCC ein verlängertes Überleben (Heinimann et al. 1999). Noch bestehen unterschiedliche Auffassungen darüber, ob dieser Überlebensvorteil durch Mutationen in den MMR-Genen hervorgerufen wird. So wiesen HNPCC-Patienten mit vorherigem Ausschluß von mutationspositiven Fällen einen Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit sporadischen CRC auf (Watson et al. 1998). Das könnte bedeuten, daß die bessere Prognose nicht nur auf der Basis von MMR-Genmutationen beruht, sondern noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Auch Patienten mit mikrosatelliteninstabilen sporadischen CRC zeigen im Vergleich zu genetisch stabilen Tumoren eine bessere Prognose (Thibodeau et al. 1993, Lothe et al. 1993, Bubb et al. 1996). Studien, die einen Überlebensvorteil für Patienten mit instabilen CRC beschrieben, sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Einfluß der MSI auf die Prognose des kolorektalen Karzinoms

Autor/Jahr	Fallzahl n	MSI+ ① [%]	Selektion der Patienten/Tumoren ②	Prognose ③
Thibodeau, 1993	86	28 *	E: CRC, synchrone Tumoren	+
Lothe, 1993	243	16,5 **	E: CRC, HNPCC, Patienten mit positiver FA	+
Bubb, 1996	215	16,4 * 10,5 **	E: sporadische CRC, synchrone Tumoren	+
Lukish, 1998	36	47 **	E: Patienten < 40 Jahre	+
Senba, 1998	103	15,7 *	E: metachrone CRC, extrakolonische Tumoren A: Patienten mit positiver FA	-
Feeley, 1999	50	10 **	E: sporadische CRC A: Patienten mit positiver FA	-
Salashor, 1999	181	12 **	E: sporadische CRC	-
Gryfe, 2000	587	17 ** MSI-H	E: CRC von Patienten < 50 Jahren, HNPCC-Patienten	+ unabhängiger prognostischer Faktor

① Die Definition der Mikrosatelliteninstabilität variiert zwischen den Studien:

* MSI+, wenn mindestens ein instabiler Mikrosatellitenmarker

** MSI+, wenn mindestens zwei instabile Marker

② E: Einschlußkriterien; A: Ausschlußkriterien; FA: Familienanamnese

③ Vergleich der kolorektalen Karzinome mit MSI+ und MSS hinsichtlich der Prognose:

+: Überlebensvorteil; -: kein Überlebensvorteil

Einige Autoren betrachten das Vorhandensein der MSI beim CRC als prognostisch günstigen Marker. In einer multivariaten Analyse von Gryfe et al. (2000) war die MSI ein unabhängig prognostischer Faktor, verbunden mit einem signifikanten Überlebensvorteil. Allerdings waren hier nur Patienten mit CRC eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 50 Jahre oder jünger waren, von denen einige (15 %) die Amsterdam-Kriterien erfüllten. Der Literatur ist zu entnehmen, daß jüngere Patienten häufiger MSI-positive Tumoren haben als ältere Patienten (Liu et al. 1995, Lukish et al. 1998).

Der Überlebensvorteil von Patienten mit instabilen CRC konnte jedoch nicht immer bestätigt werden (Senba et al. 1998, Feeley et al. 1999, Salahshor et al. 1999). Auch wenn nur proximal lokalisierte MSI-positive mit -negativen CRC verglichen wurden, ergab sich kein Unterschied im Outcome (Feeley et al. 1999). In älteren Studien, die einen Überlebensvorteil für MSI-positive CRC beschrieben, lag noch keine einheitliche Definition und standardisierte Untersuchung der MSI zugrunde, woraus potentiell fehlerhafte Analysen resultierten (Gryfe et al. 2000). Ob die genetische Instabilität bei kolorektalen Karzinomen zu einer besseren Prognose beiträgt, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Möglicherweise führt sie zu einem weniger aggressiven Verhalten (Shibata et al. 1994). Aufgrund der genomischen Instabilität werden weitere Mutationen in anderen Genen begünstigt; infolgedessen wird der programmierte Zelltod eingeleitet, wodurch das Tumorwachstum und die Metastasenbildung verringert werden (Lukish et al. 1998). Dies spiegelt sich histologisch in peritumoralen lymphozytären Infiltraten ("Crohn's like lymphoid reaction") wider, die in vielen instabilen CRC nachweisbar sind (Jass 1999, Offit 2000). In den meisten Tumorzellen geht die Fähigkeit zur Apoptose verloren, wodurch das unkontrollierte Wachstum ausgelöst wird. Bei anderen Tumorentitäten dagegen, wie dem Mammakarzinom, ist die MSI sogar mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Rüschoff et al. 1998).

In unserer Studie wollten wir überprüfen, ob sporadische CRC mit MMR-Gendefekten eine bessere Prognose haben. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens gab es in unserer Untersuchung keinen Unterschied zwischen MLH1- und MSH2-exprimierenden und nicht-exprimierenden kolorektalen Karzinomen. In einer anderen Studie dagegen, tendierten Patienten mit sporadischem CRC und negativer MSH2-Expression zu einer höheren

“krankheitsfreien Überlebensrate“ als Patienten mit positiver Expression (Maeda et al. 1998). Bei Vorliegen einer negativen MSH2-Expression bei Patienten mit Blasenkarzinom war die rezidivfreie Überlebensrate hingegen geringer als für Patienten mit positiver Expression (Jin et al. 1999).

Hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit war in unserer Studie ein Unterschied sowohl für die MLH1- als auch für die MSH2-Expression statistisch nicht erkennbar. Obwohl Patienten mit MLH1-negativen Tumoren im Durchschnitt 9 Monate länger lebten als Patienten mit positiver MLH1-Expression (72 vs. 63 Monate), ließ sich ein statistischer Unterschied nicht ermitteln, was wahrscheinlich auf die zu geringe Fallzahl (10/127) zurückzuführen ist.

Die prognostische Relevanz der Mismatch-Repair-Gene beim sporadischen kolorektalen Karzinom bleibt somit unklar. Im Gegensatz zu unserer Studie waren in vorangegangenen MMR-Proteinexpressionsanalysen nicht nur sporadische CRC in den Patientenkollektiven enthalten, sondern auch HNPCC-Fälle und syn- und metachrone CRC eingeschlossen (Marcus et al. 1999, Cawkwell et al. 1999). In den überwiegenden Fällen wurden immunhistochemische Analysen nur an Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität durchgeführt, die zuvor bestimmt worden war (Thibodeau et al. 1998). Teilweise wurden Subgruppen hinsichtlich ihres Überlebensvorteils untersucht, wie nur rechtsseitig lokalisierte CRC oder Tumoren von jungen Patienten unter 50 Jahren (Gryfe et al. 2000). Diese Auswahlkriterien haben einen Einfluß auf statistisch ermittelte Zusammenhänge, wie zum Beispiel zwischen MSI und Überleben und führen zu selektionsbedingten Ergebnissen, was bei der Interpretation der Studien berücksichtigt werden muß. Bislang gibt es noch keine Studien, die eindeutig einen Überlebensvorteil für sporadische CRC mit MMR-Defekten beschreiben. Lediglich in einer Publikation waren proximal lokalisierte CRC mit immunhistochemisch nachgewiesenen Defekten in MLH1 und MSH2 durch eine signifikant bessere Prognose gekennzeichnet, wobei beide Gene zum MMR-Status zusammengefaßt wurden (Cawkwell et al. 1999).

Überlebensanalysen, die nur proximal lokalisierte CRC oder andere Subgruppen einschließen, liefern noch keine Informationen darüber, ob Patienten mit sporadischen CRC und Mutationen in den MMR-Genen generell einen Überlebensvorteil haben.

4.4. Schlußfolgerung

10 – 15 % der sporadischen kolorektalen Karzinome weisen Defekte in den MMR-Genen auf. Sporadische kolorektale Karzinome ohne Expression des Mismatch-Repair-Gens MLH1 zeigen im Vergleich zu exprimierenden Tumoren signifikant häufiger eine Lokalisation im rechtsseitigen Kolon sowie eine Lymphangiosis, während dies bei fehlender Expression von MSH2 nicht nachweisbar ist. Eine prognostische Relevanz ließ sich in unserem Krankengut bei beiden Genen nicht nachweisen, so daß der Stellenwert der MMR-Gene als Prognoseparameter für die Klinik derzeit weiter offen ist.