

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**“Immunhistologische Expressionsanalyse
des CTNNB1-Genprodukts (β -Catenin)
bei kolorektalen Karzinomen mit
Fehlpaarungsreparaturdefekten“**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Astrid Stein
aus Magdeburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M.Dietel
 2. Prof. Dr. med. A.Marx
 3. Priv.-Doz. Dr. med. V.Bürkle

Datum der Promotion: 12.10.2007

1	Einleitung	6
1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	6
1.2	Ätiologie des kolorektalen Karzinoms	6
1.3	Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	7
1.4	Morphologisches Spektrum des kolorektalen Karzinoms	8
1.5	Familiäre Dispositionen kolorektaler Krebserkrankungen	8
1.5.1	Kolorektale Karzinome mit Fehlpaarungsreparaturdefekten	11
1.6	Wnt-Signalweg und kolorektale Karzinome	12
1.7	Das CTNNB1-Genprodukt (β-Catenin) im Wnt-Signalweg	12
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Untersuchte Gewebeproben	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Immunhistochemische Untersuchung mit der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode	18
3.2.2	Immunfluoreszenz Untersuchung mit der fluorochromkonjugierten indirekten Methode	21
3.2.3	Verwendete Lösungen	24
3.2.3.1	Arbeitsschritte bei der Detektion von Antigenen	25
3.2.4	Methode zur Auswertung des β-Catenin-Expressionsverhaltens	26
3.2.5	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Untersuchung des Antikörpers 14 an Primärtumoren mit der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode und der Immunfluoreszenz	30

4.2	β-Catenin-Expression im gesunden Gewebe	33
4.3	Charakterisierung des untersuchten Patientengutes bezüglich epidemiologischer und pathologischer Kriterien	36
4.3.1	Expressionsanalyse der DNA-Fehlpaarungsreparaturproteine MLH1, MSH2 und MSH6	36
4.3.2	Familienanamnese	37
4.3.3	Altersverteilung	38
4.3.4	Verteilung der Geschlechter	39
4.3.5	Histopathologische Differenzierungsgrade	40
4.3.6	Ausbreitung des Primärtumors	41
4.3.7	Regionäre Lymphknotenmetastasen	42
4.3.8	Fernmetastasen	43
4.3.9	Tumorstadien	43
4.4	β-Catenin-Expression im tumorösen Gewebe	45
4.4.1	β-Catenin-Expressionsmuster bei Fehlpaarungsreparatur-suffizienten und -insuffizienten Kolorektalkarzinomen und Metastasen	45
4.4.2	β-Catenin-Expressionsanalyse an Primärtumoren	46
4.4.2.1	Antikörper-spezifische CTNNB1-Expressionsmuster in kolorektalen Primärtumoren	48
4.4.2.2	β-Catenin Expressionsanalyse von Lymphknotenmetastasen	52
5	Diskussion	58
5.1	β-Catenin-Expression im unveränderten kolorektalen Epithel	58
5.2	Unterschiede im Expressionsverhalten des β-Catenin-Antikörpers 14 mit der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz	59

5.3	Hereditäre und sporadische FRS- und FRI-Tumoren und epidemiologische sowie pathologische Merkmale	61
5.3.1	Alter	61
5.3.2	Geschlecht	62
5.3.3	Histopathologische Differenzierungsgrade	63
5.3.4	Tumorstadien	64
5.4	β-Catenin-Expression bei Primärtumoren	65
5.5	β-Catenin-Expression bei fehlpaarungsreparatursuffizienten und -insuffizienten Primärtumoren	66
5.5.1	Antikörper-spezifisches CTNNB1-Expressionsmuster in kolorektalen Primärtumoren	68
5.6	β-Catenin-Expression bei Lymphknotenmetastasen	69
6	Zusammenfassung	71
7	Abkürzungen	73
8	Literaturverzeichnis	74

- Unterschiede im β -Catenin-Expressionsverhalten mit dem Antikörper 14 konnte bei einem Vergleich der LSAB- und der fluochromkonjugierten indirekten Methode nachgewiesen werden. Bei 45 untersuchten Tumoren zeigten 1/3 nicht konkordante β -Catenin-Signale. Eine Beeinflussung des Expressionsmusters durch endogene Peroxidasen, endogene alkalische Phosphatasen und endogenes Biotin ist anzunehmen. Außerdem konnte man eine unspezifische Verteilung des Chromogens beobachten.
- Die sechs untersuchten β -Catenin-Antikörper, welche an verschiedenen Stellen des Proteins ihre Bindungsaffinitäten aufweisen, zeigten in gesunden epithelialen Geweben eine membranöse β -Catenin-Expression. Die Antikörper 7a7 und 9g10 wiesen neben der membranösen auch eine zytoplasmatische Komponente auf.
- Die Untersuchung der epidemiologischen Faktoren zeigte ein deutlich früheres Erkrankungsalter bei Patienten mit FRS- und FRI-Tumoren und positiver Familienanamnese als bei Patienten ohne genetische Disposition. Beim Geschlecht dominierten in den FRS +Fa-, FRS -Fa und FRI +Fa-Tumorgruppen die Männer und in der FRI -Fa-Tumorgruppe die Frauen. In der FRI -Fa-Gruppe wurde bei Frauen eine vermehrte Methylierung des Promotors des MLH1-Gens nachgewiesen (Malkhosyan et al., 2000), was für das vermehrte Vorkommen von FRI -Fa-Tumoren bei Frauen ursächlich sein kann.
- Die histopathologischen Differenzierungsgrade ließen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorgruppen erkennen. Dennoch konnte bei den FRI-Tumoren prozentual ein größerer Anteil an schlecht bzw. undifferenzierten Tumoren sowie eine lymphozytäre Infiltration in der Umgebung beobachtet werden. Bei der Betrachtung der Tumorstadien zeigten die FRS-Tumoren häufiger Fernmetastasen

und somit ein höheres Stadium als FRI-Tumoren. Da sich die FRS- von den FRI-Tumoren hinsichtlich des tumorumgebenden Bindegewebes unterscheiden, liegt die Annahme nahe, daß mesenchymale Faktoren Einfluß auf Differenzierung und Metastasierung der Tumoren nehmen.

- Die β -Catenin-Expressionssignale in Primärtumoren zeigten vornehmlich heterogene Muster. Dies läßt vermuten, daß β -Catenin in Tumorzellen durch Faktoren modifiziert ist, die eine Bindung der Antikörper nicht mehr ermöglichen. Da das β -Catenin-Signal in einem Tumor mit jedem Antikörper variieren kann, muß das β -Catenin vom Zellkompartiment abhängige Modifikationen erfahren. β -Catenin-Muster ließen keinen Zusammenhang zwischen dem FRS- und FRI-Tumoren erkennen.
- Vier untersuchte Primärtumoren wiesen einen 7d11-Antikörper-spezifischen vollständigen β -Catenin-Verlust auf. Diese Tumoren waren sowohl der FRS- als auch der FRI-Tumorgruppe zuzuordnen. In diesen vier Fällen läßt sich eine Deletion im Protein vermuten.
- Primärtumoren mit orthologen β -Catenin zeigten mit allen Antikörpern bei den LknMx korrespondierende Muster. Anders die Tumoren mit nukleären β -Catenin-Expressionsmustern. Bei den LknMx konnte man vornehmlich keine nukleäre β -Catenin-Lokalisation beobachten. Eine Ausnahme machte der Antikörper 8e4 in allen Tumorgruppen sowie die Antikörper 9g2 und 14 in den FRS-Tumorgruppen. Eine Beeinflussung durch extrazelluläre Matrix auf die Tumorzelle und weiter auf das β -Catenin kann gemutmaßt werden.

7 Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APC	„adenomatous polyposis coli“
CRC	Kolorektalkarzinom
CKI	Casein-Kinase
Dvl	Dishevelled
+Fa	Familienanamnese positiv
-Fa	Familienanamnese negativ
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FRI	Fehlpaarungsreparaturinsuffizienz
FRS	Fehlpaarungsreparatursuffizienz
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HNPCC	Familiäres nicht-polypöses kolorektales Krebsyndrom („hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrom“)
IF	Immunfluoreszenz
LEF	Lymphoid enhancer factor
LknMx	Lymphknotenmetastase
LSAB	Labeled-Strept-Avidin-Biotin
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
TBS	Tris Buffered Saline
TCF	„T cell factor“
UICC	Union internationale contre le cancer

Danksagung

Prof. Dr. M.Dietel danke ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Promotionsarbeit.

Dr. Dr. K. Kölblle danke ich für die Betreuung sowie für die umfangreiche und kompetente Einführung in das Fachgebiet der Pathologie.

Ganz besonderen Dank möchte ich Frau Siegrun Blauhut sagen, die mir im immunhistologischen Labor des Instituts für Pathologie der Chaitè am Campus Mitte bei der Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen eine große Hilfe war.

Meinen Eltern, Herta und Berthold Stein, möchte ich für die jahrelange Unterstützung in allen ihm möglichen Bereichen und den Glauben an mich und das Projekt danken.

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht“

Erklärung

„Ich, Astrid Stein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Immunhistologische Expressionsanalyse des CTNNB1-Genprodukts (β -Catenin) bei kolorektalen Karzinomen mit Fehlpaarungsreparaturdefekten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“