

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Ergebnisse:

Die immunhistochemischen Ergebnisse unserer Auswertung sind in den nachfolgenden Tabellen für die einzelnen Antikörper dargestellt. Insgesamt wurden für unsere Untersuchung 3797 Gewebeproben immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Es wurden 11 verschiedene Antikörper verwendet. Das Kolonnormalgewebe zeigte keine relevante Anfärbung für die untersuchten Gene. Lediglich bei der Färbung von Connexin 26 wurde eine schwache zytoplasmatische Färbung in 2 von 6 Schnitten aus Kolonnormalgewebe beobachtet. In einigen Fällen wurde Mukus aus muzinproduzierenden Zellen der Darmschleimhaut angefärbt. Diese Anfärbung wurde als nicht spezifisch gewertet. Eine Übersicht über die Ergebnisse des gesamten Kollektivs liefert Tabelle 3. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte semiquantitativ durch eine Skala der Färbestärke von 0 bis 3 (0=negativ, 1=schwache Anfärbung, 2=moderate Anfärbung, 3=starke Anfärbung).

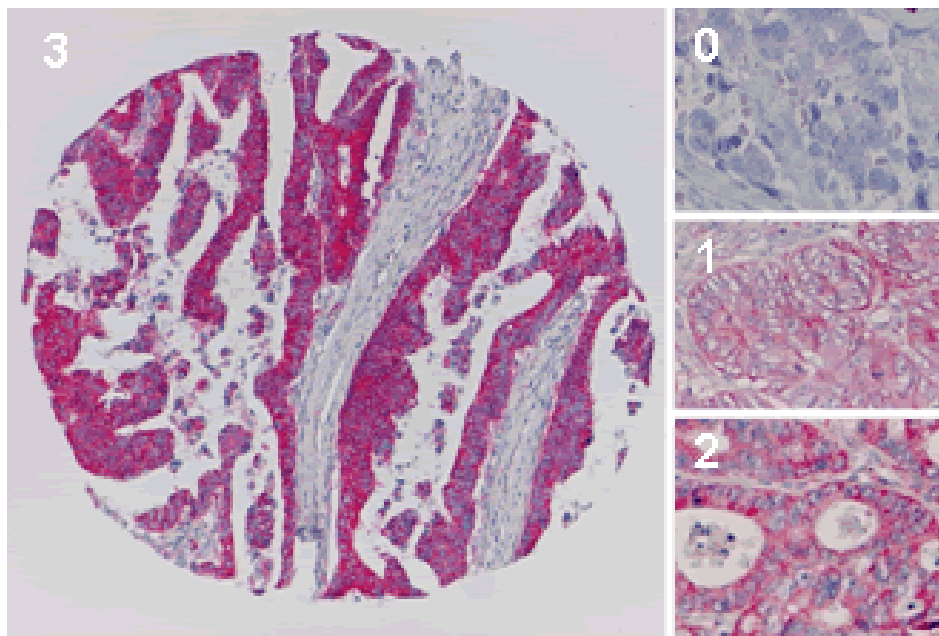


Abbildung 2: Darstellung von immunhistochemischen Färbungen von Connexin 26 (Cx26) in kolorektalen Karzinomen in TMAs. Negative Färbung von Tumorzellen (0), schwach positiv (1), moderat positiv (2) und stark positiv (3) in 50-facher Vergrößerung. Weitere immunhistochemische Färbeergebnisse sind zu sehen unter <http://pathoweb.charite.de/tmaportal>.

Für die Clusteranalyse wurde dieses Schema beibehalten. Für die statistische Analyse der einzelnen Gene und ihre Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern inklusive des Überlebens wurde die Einteilung in ein Zweierschema umgewandelt (0/1 negativ, 2/3 positiv). Für die Marker YB-1 und Casein Kinase 2 Beta (CK2B) wurden die nukleäre und zytoplasmatische Anfärbung getrennt ausgewertet. Für die statistische binäre Analyse wurden gegeneinander verglichen: pT1/pT2 und pT3/pT4, pN0 und pN1pN2, G1/2 und G3, pM0 und pM1.

Tabelle 3 Untersuchte Proben und ihre immunhistochemischen Resultate:

Alle evaluierten Proben n=3791	Anfärbbarkeit	
	negativ (n=1924) n (%)	positiv (n=1867) n (%)
Adam 10	90 (28)	236 (72)
Annexin 2	140 (44)	177 (56)
CK 2b zytoplasmatisch	100 (33)	206 (67)
CK 2b nukleär	245 (80)	61 (20)
Cyclin D1	207 (60)	138 (40)
NFkB	135 (45)	167 (55)
IGFBP4	173 (79)	46 (21)
RAD 51	67 (27)	180 (73)
YB-1 zytoplasmatisch	255 (86)	43 (14)
YB-1 nukleär	158 (53)	139 (42)
P32 zytoplasmatisch	106 (32)	221 (68)
c-fos	124 (62)	75 (38)
Connexin 26	124 (41)	178 (59)

Im weiteren folgt eine Übersicht über die Ergebnisse nach Proteinen geordnet:

3.1.1. Adam 10

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	8	82	90
positiv	42	190	232
Gesamt	50	272	322

p-Wert 0,040

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	14	75	89
positiv	39	186	225
Gesamt	53	261	314

p-Wert 0,733

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	58	23	81
positiv	167	60	227
Gesamt	225	83	308

p-Wert 0,732

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	29	60	89
positiv	89	146	235
Gesamt	118	206	324

p-Wert 0,377

3.1.2. CK2B cytosolisch

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	14	85	99
positiv	30	171	201
Gesamt	44	256	300

p-Wert 0,857

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	19	78	97
positiv	30	167	197
Gesamt	49	245	294

p-Wert 0,346

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	65	29	94
positiv	141	56	197
Gesamt	206	85	291

p-Wert 0,671

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	M0	M1	Gesamt
negativ	83	160	69
positiv	25	36	104
Gesamt	108	196	304

p-Wert 0,370

3.1.3. CK2B nukleär

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	37	206	243
positiv	7	50	57
Gesamt	44	256	300

p-Wert 0,572

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	42	196	238
positiv	7	49	55
Gesamt	49	245	294

p-Wert 0,352

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	168	66	234
positiv	38	19	57
Gesamt	206	85	291

p-Wert 0,445

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	36	63	99
positiv	72	133	205
Gesamt	108	196	304

p-Wert 0,832

3.1.4. Cyclin D1

Tumorinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	28	177	205
positiv	23	112	135
Gesamt	51	289	340

p-Wert 0,393

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	31	171	202
positiv	26	106	132
Gesamt	57	277	334

p-Wert 0,302

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	137	55	192
positiv	101	33	134
Gesamt	238	88	326

p-Wert 0,421

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	91	115	206
positiv	37	100	137
Gesamt	128	215	343

p-Wert 0,001

3.1.5. Annexin 2

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	20	120	140
positiv	29	143	172
Gesamt	49	263	312

p-Wert 0,534

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	25	111	136
positiv	28	141	169
Gesamt	53	252	305

p-Wert 0,678

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	91	40	131
positiv	125	42	167
Gesamt	216	82	298

p-Wert 0,302

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	60	79	74
positiv	59	117	88
Gesamt	119	196	315

p-Wert 0,080

3.1.6. NFkB

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	20	112	132
positiv	25	140	165
Gesamt	45	252	297

p-Wert 1,000

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	25	104	129
positiv	27	135	162
Gesamt	52	239	291

p-Wert 0,548

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	93	34	127
positiv	113	45	158
Gesamt	206	79	285

p-Wert 0,749

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	48	86	68
positiv	58	108	166
Gesamt	106	194	300

p-Wert 0,874

3.1.7. YB1 nukleär

Tumorstadium

Anfärbarkeit	pT1/pT2	pT3/pT4	Gesamt
negativ	24	132	156
positiv	19	118	137
Gesamt	43	250	293

p-Wert 0,714

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1/pN2	Gesamt
negativ	27	127	154
positiv	24	108	132
Gesamt	51	235	286

p-Wert 0,886

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1/G2	G3	Gesamt
negativ	112	38	150
positiv	94	40	134
Gesamt	206	78	284

p-Wert 0,395

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	56	100	156
positiv	43	96	139
Gesamt	99	196	295

p-Wert 0,368

3.1.8. YB1 zytosolisch

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	39	212	251
positiv	5	38	43
Gesamt	44	250	294

p-Wert 0,507

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pN2	Gesamt
negativ	45	199	244
positiv	6	37	43
Gesamt	51	236	287

p-Wert 0,478

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
negativ	175	70	245
positiv	32	8	40
Gesamt	207	78	285

p-Wert 0,260

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	86	167	253
positiv	14	29	43
Gesamt	100	196	296

p-Wert 0,854

3.1.9. P32 zytosolisch

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	22	82	104
positiv	33	186	219
Gesamt	55	286	323

p-Wert 0,174

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pN2	Gesamt
negativ	22	79	101
positiv	31	184	215
Gesamt	53	263	316

p-Wert 0,102

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
niedrig	77	24	101
hoch	156	55	211
Gesamt	233	79	312

p-Wert 0,661

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
niedrig	42	64	106
hoch	76	143	219
Gesamt	118	207	325

p-Wert 0,387

3.1.10. RAD51

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	15	50	65
positiv	29	148	177
Gesamt	44	198	242

p-Wert 0,232

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pT2	Gesamt
negativ	10	54	64
positiv	37	138	175
Gesamt	47	192	239

p-Wert 0,342

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
negativ	56	8	64
positiv	131	39	170
Gesamt	187	47	234

p-Wert 0,076

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	26	39	65
positiv	69	111	180
Gesamt	95	150	245

p-Wert 0,813

3.1.11. IGFBP-4

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	30	140	170
positiv	7	38	45
Gesamt	37	178	215

p-Wert 0,741

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pN2	Gesamt
negativ	21	145	166
positiv	8	37	45
Gesamt	29	182	211

p-Wert 0,376

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
negativ	122	44	166
positiv	35	9	44
Gesamt	157	53	210

p-Wert 0,411

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	58	113	171
positiv	23	23	46
Gesamt	81	136	217

p-Wert 0,045

3.1.12. C-fos

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	22	99	121
positiv	8	66	74
Gesamt	30	165	195

p-Wert 0,166

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pN2	Gesamt
negativ	25	95	120
positiv	13	59	72
Gesamt	38	154	192

p-Wert 0,640

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
negativ	86	31	117
positiv	55	18	73
Gesamt	141	49	190

p-Wert 0,778

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	38	84	122
positiv	29	46	75
Gesamt	67	130	197

p-Wert 0,279

3.1.13. Connexin 26

Tumordinfiltration

Anfärbarkeit	pT1,pT2	pT3,pT4	Gesamt
negativ	19	101	120
positiv	32	145	177
Gesamt	51	246	297

p-Wert 0,615

Nodalstatus

Anfärbarkeit	pN0	pN1,pN2	Gesamt
negativ	16	104	120
positiv	33	137	170
Gesamt	49	241	290

p-Wert 0,174

Tumordifferenzierung

Anfärbarkeit	G1,G2	G3	Gesamt
negativ	77	32	109
positiv	141	31	172
Gesamt	218	63	281

p-Wert 0,026

Fernmetastasen

Anfärbarkeit	pM0	pM1	Gesamt
negativ	42	81	123
positiv	73	104	177
Gesamt	115	185	300

p-Wert 0,214

3.1.14. Klinisch-pathologische Parameter:

Eine Überexpression von Connexin 26 (score 2 und 3) war signifikant mit einem niedrigeren Tumorgrading (G1/G2 im Vergleich zu G3) assoziiert ($p=0,026$).

Eine Überexpression von Adam 10 war signifikant mit einem höheren Tumorstadium assoziiert (pT1/pT2 versus pT3/pT4, $p=0,04$).

Bei der Korrelation mit dem Metastasierungsgrad war eine stärkere Expression von Cyclin D1 (score 2 und 3) signifikant positiv mit einer Fernmetastasierung korreliert (pM0 vs pM1, $p=0,001$).

Eine schwächere Expression von IGFBP-4 war signifikant positiv mit einer Fernmetastasierung korreliert (pM0 vs pM1, $p=0,045$).

Eine Überexpression von Annexin II zeigte einen Trend zu einem höheren Metastasierungsgrad (pM0 vs pM1, $p=0,08$).

Ebenfalls ein Trend ergab sich für die Überexpression von RAD51 mit einem höheren Tumorgrading mit $p=0,076$ (G1/G2 im Vergleich zu G3).

Für alle anderen Antikörper konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern TNM und G und der Antikörperexpression gezeigt werden.

3.2. Hierarchische Clusteranalyse der immunhistochemischen Färbungen

Bei unserer Auswertung führten wir eine Clusteranalyse der einzelnen Gewebeprobe auf der Basis ihrer Ähnlichkeiten im Färbeverhalten der 13 verschiedenen Auswertungen durch. Für jede einzelne Gewebeprobe wurde für die Auswertung verlangt, dass mindestens 80% interpretierbare immunhistochemische Ergebnisse vorhanden waren. Insgesamt wurden für die Analyse 2470 Einzeldaten verwendet. Die Antikörperexpression wurde anhand ihrer Ähnlichkeit im Färbeverhalten eines Kollektivs von 190 Tumoren geclustert (Abbildung 3). In den Dendogrammen, die in Abbildung 3 dargestellt sind, stellen die Länge und die Unterteilung der einzelnen Zweige die Verbindung zwischen den kolorektalen Tumoren (links) und der Genexpression (oben) dar. Eine nicht supervisierte hierarchische Clusteranalyse erbrachte eine Aufteilung unseres Tumorkollektivs in 4 Gruppen (Abbildung 3A). Wie erwartet, befand sich das Normalgewebe in einem separaten Cluster (unten). Die anderen Tumoren wurden anhand ihres Färbeverhaltens der einzelnen Antikörper in 3 weitere Clustergruppen unterteilt. Für jeden Antikörper, der in der oberen Leiste markiert ist, wurde das Färbeverhalten durch ein gefärbtes Kästchen näher definiert. So zeigt ein roter Kasten eine stark positive, ein hellbrauner Kasten eine moderat positive, ein dunkelbrauner Kasten eine schwach positive und ein schwarzer Kasten eine negative Färbung an. Nicht verfügbare Daten wurden durch ein graues Kästchen gekennzeichnet.

Eine Clustergruppe von Tumoren, das sogenannte „higher tumor stage cluster“, zeigte in 85% der Fälle entweder pT3 oder pT4 als Tumorstadium und zeichnete sich durch eine gesteigerte Adam 10 und IGFBP4 Expression aus, während in dieser Gruppe keine nukleäre Expression von CK2B beobachtet wurde (Abbildung 2B).

Die zweite Tumorgruppe, das sogenannte „shorter survival cluster“, zeigte insgesamt eine geringere Expression von Connexin 26, Adam 10 und IGFBP4 als in der ersten Tumorgruppe, während die nukleäre Anfärbbarkeit von CK2B ebenfalls negativ war (Abbildung 3C).

Die dritte Tumorgruppe zeichnete sich im Kontrast dazu durch eine positive nukleäre Expression des CK2B Antigens aus.

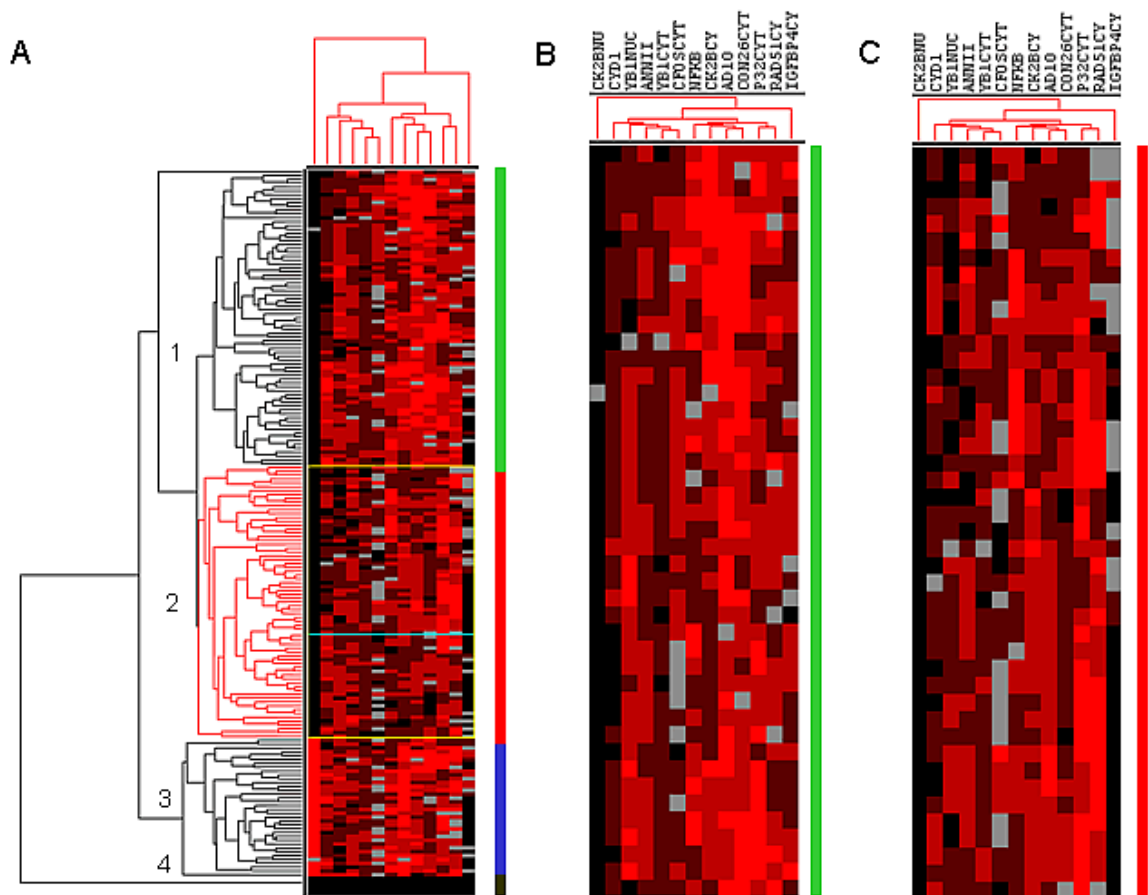


Abbildung 3: Clusteranalyse

- (A) Abbildung 3A zeigt die hierarchische Clusteranalyse der Ergebnisse der immunohistochemischen Auswertung unseres Tumorkollektivs. Die verwendeten Antikörper sind oben an der Abbildung angegeben. Die unterschiedlichen Färbintensitäten sind durch unterschiedliche Farben angegeben. Eine stark positive Färbung ist durch einen roten Kasten gekennzeichnet, eine moderat positive Anfärbung durch einen hellbraunen Kasten und eine schwach positive Anfärbung durch einen dunkelbraunen Kasten. Eine fehlende Anfärbung ist durch einen grauen Kasten gekennzeichnet. Ein grauer Kasten wurde auch dort verwendet, wo keine Daten vorlagen. Das Dendrogramm seitlich an der Übersicht fasst die Gruppen zusammen, welche sich durch ein ähnliches Färbverhalten in bezug auf die einzelne Tumorschnitte auszeichnen. Das Dendrogramm an der Spitze der Übersicht zeigt das Clusterverhalten der Antikörper basierend auf der Ähnlichkeit der einzelnen Tumore in bezug auf ihre Anfärbbarkeit.
- (B) Abbildung 3B stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem sogenannten „higher tumor stage cluster“ (Ausschnitt aus Abbildung A, nämlich dem Teil, der rechts in Abbildung A mit einem grünen Balken gekennzeichnet ist und links in Bild A mit 1 bezeichnet ist).
- (C) Abbildung 3C ist eine vergrößerte Abbildung des „shorter survival stage cluster“ mit deutlich reduzierter Anfärbung von Connexin 26. Diese Darstellung ist ebenfalls ein vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung A, nämlich der Teil, der rechts in Abbildung A mit einem roten Balken bezeichnet ist und links mit der Ziffer 2.

3.3. Überlebensanalyse :

Die immunhistochemischen Ergebnisse und das krankheitsspezifische Überleben wurden korreliert. Das krankheitsspezifische Überleben wurde für alle Patienten ausgewertet. Die Beobachtungszeit betrug 809 Wochen.

In 124 Proben (41%) wurde eine Überexpression (score 2 und 3) von Connexin 26 (Cx26) beobachtet. In 178 Proben (59%) wurde keine oder nur geringe Connexin 26 (Cx 26) Färbung beobachtet (score 0 und 1).

Die zu der Connexin 26 Expression korrespondierenden Überlebenskurven werden in Abbildung 4 dargestellt. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten betrug 194,68 Wochen. Die statistische Analyse zeigte eine signifikant längere Überlebenszeit für Patienten mit einer hohen Connexin 26 Expression als für Patienten mit einer niedrigen Connexin 26 Expression ($P=0,02$). Für alle anderen untersuchten Antigene fand sich keine prognostische Relevanz ($p>0,05$). Im Vergleich von Cluster 1 („higher tumor stage cluster“) mit Cluster 2 („shorter survival cluster“) in allen untersuchten Patienten fand sich ein signifikanter Unterschied ($P=0,039$) mit einem kürzeren Überleben für Patienten aus Cluster 2 (Abbildung 5).

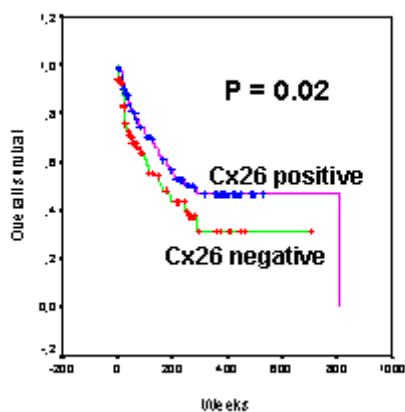


Abbildung 4: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier. Vergleichende Darstellung des krankheitsspezifischen Überlebens von Patienten mit Connexin 26 positiven kolorektalen Tumoren (n=178) und Patienten mit Connexin 26 negativen Tumoren (n=124), p=0,02.

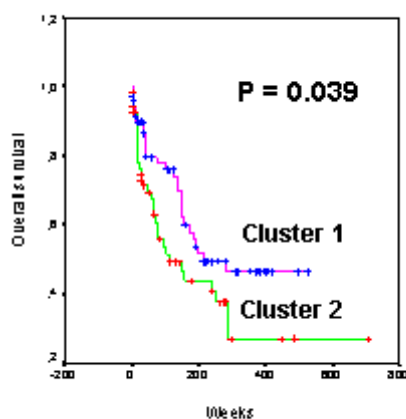


Abbildung 5: Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier und Vergleich des krankheitsspezifischen Überlebens von Cluster 1, dem „higher tumor stage cluster“ und Cluster 2, dem „shorter survival cluster“, p=0,039.

Eine Übersicht über typische Expressionsmuster der einzelnen untersuchten Gene sind auf dem Berlin-TMA-Web-Portal zu sehen.

<http://pathoweb.charite.de/tmaportal>.

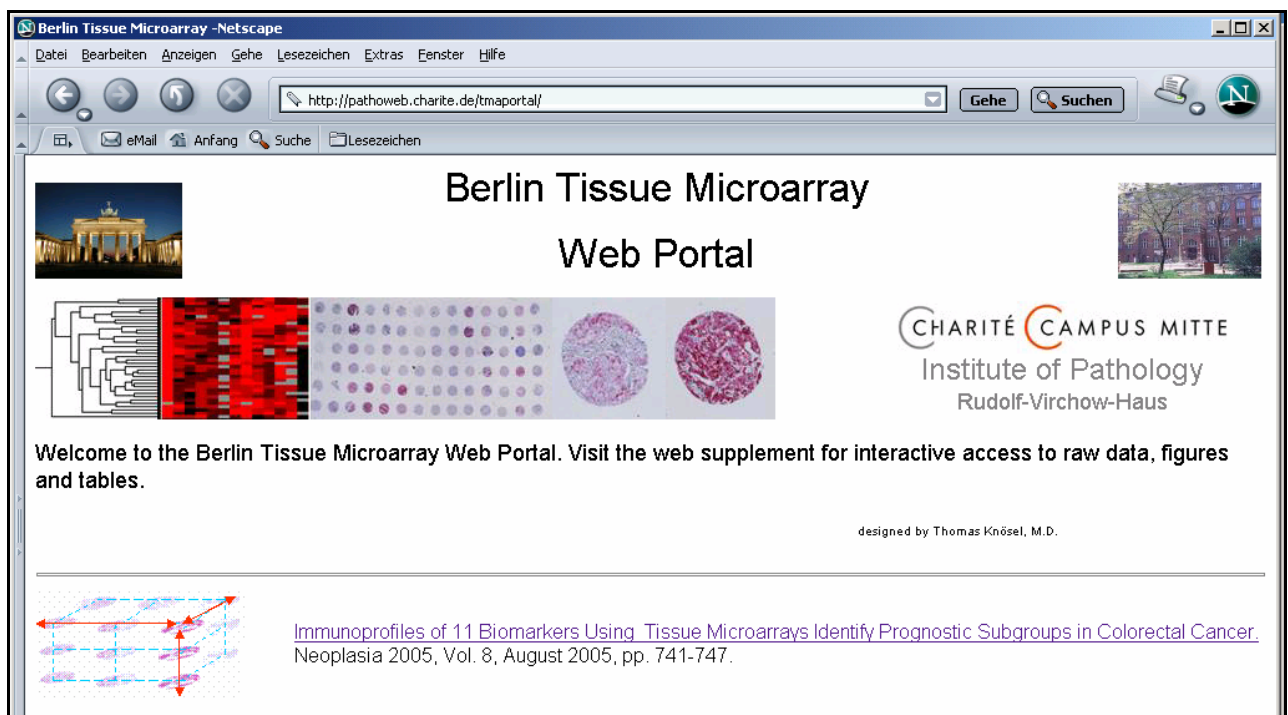


Abbildung 6: Internetseite des Berlin Tissue Microarray Web Portal