

4. Diskussion

Diese Untersuchung ist eine der ersten und grössten umfassenden Untersuchungen verschiedener Biomarker an einem grossen Kollektiv kolorektaler Karzinome und Metastasen. In unserer Analyse konnten wir die Synergie aus der Tissue Microarray Technik und der hierarchischen Clusteranalyse nutzen. Zielsetzung dieser Arbeit war, neue potentielle Biomarker des kolorektalen Karzinoms zu detektieren. Dazu wurden insgesamt 3797 Proben von kolorektalen Karzinomen, Metastasen und kolorektalem Normalgewebe untersucht. Die Untersuchung erfolgte immunhistochemisch mittels der Streptavidin-Biotin-Methode an Tissue Microarrays, mit einem Durchmesser der Gewebespots von 0,6 mm. Es wurden insgesamt 351 Proben von 270 Patienten auf die Expression von 11 Markern untersucht: Adam 10, Annexin II, Cyclin D1, NFkB, Casein Kinase 2 Beta (CK2B), YB-1, P32, RAD51, c-fos, IGFBP-4 and Connexin 26 (Cx 26). Neue potentielle Biomarker des kolorektalen Karzinoms konnten detektiert werden.

Es ist sehr zeit- und materialaufwendig, eine so umfassende Studie an Grossschnitten von kolorektalen Karzinomen und Metastasen durchzuführen. Mit der Einführung der Tissue Microarray Technik, auch kurz TMA-Technik, ist dies in einem kürzeren Zeitraum möglich geworden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Ergebnisse, die an TMAs erhoben werden konnten, an Grossschnitten bestätigt wurden. Die geringe Grösse der einzelnen Gewebestanden und damit auch die Gefahr der Tumorerheterogenität kann durch die hohe Zahl an Proben kompensiert werden [Torhorst et al. 2001, Bubendorf 2001]. Bei der Analyse aufeinanderfolgender Schnitte durch die TMA-Technik wird mit grosser Wahrscheinlichkeit Tumorgewebe des gleichen Tumorzellklons analysiert. Zusätzlich zu der zweidimensionalen Analyse eines einzelnen TMA-Gewebeschnitts bedeutet die Analyse aufeinanderfolgender Schnitte eine dreidimensionale Analyse des Tumors (siehe Abbildung 1, Seite 21). Ein weiterer Vorteil der TMAs ist das gleichzeitige Anfärben der verschiedenen Proben in einem Arbeitsgang. Dadurch können Schwankungen in der Färbeintensität, die durch äussere Umstände an Material oder im Labor auftreten können, minimiert werden.

Bisher verwendeten nur wenige Studien die Synergie aus Tissue Microarrays, Immunhistochemie und der hierarchischen Clusteranalyse [Nielsen et al. 2003, van de Rijn et al. 2004, Makretsov et al. 2004]. Dabei wurde für die Auswertung entweder ein Dreierschema (keine Färbung, schwache Färbung, stark positive Färbung) oder ein Viererschema ähnlich unserer Auswertung benutzt. Bisher gibt es noch keine eindeutigen Argumente für die Bevorzugung eines der beiden Schemata. Bei unserer Auswahl orientierten wir uns an der

konventionellen Praxis, zum Beispiel der Einteilung der HER/NEU2 Expression in ein Viererschema, welches anschliessend in ein Zweierschema umgewandelt wird (positiv/negativ). In weiteren Studien wird sich zeigen, ob eine Einteilung in ein Dreier- oder in ein Viererschema von Vorteil ist. Zusätzlich wurden für zwei Marker, CK2B und YB-1, die zytoplasmatische und nukleäre Expression getrennt ausgewertet. Die Synergie aus TMAs und hierarchischer Clusteranalyse besitzt ein sehr hohes Potential, prognostische und diagnostische Signaturen zu erstellen. Zusätzlich ermöglichen serielle Schnitte einen direkten Vergleich von verschiedenen Antikörpern am gleichen Tumorzellklon. Der Vorteil dieser Untersuchung ist, dass nicht nur einzelne Biomarker, sondern gleich mehrere Marker eine sogenannte Signatur erstellen, die prognostisch und diagnostisch wertvoll ist.

Bei unserer hierarchischen Clusteranalyse von 190 kolorektalen Karzinomen war es uns möglich, diagnostische und prognostische Subgruppen zu erstellen, die sich anhand ihrer Genexpression unterscheiden (Abbildung 7).

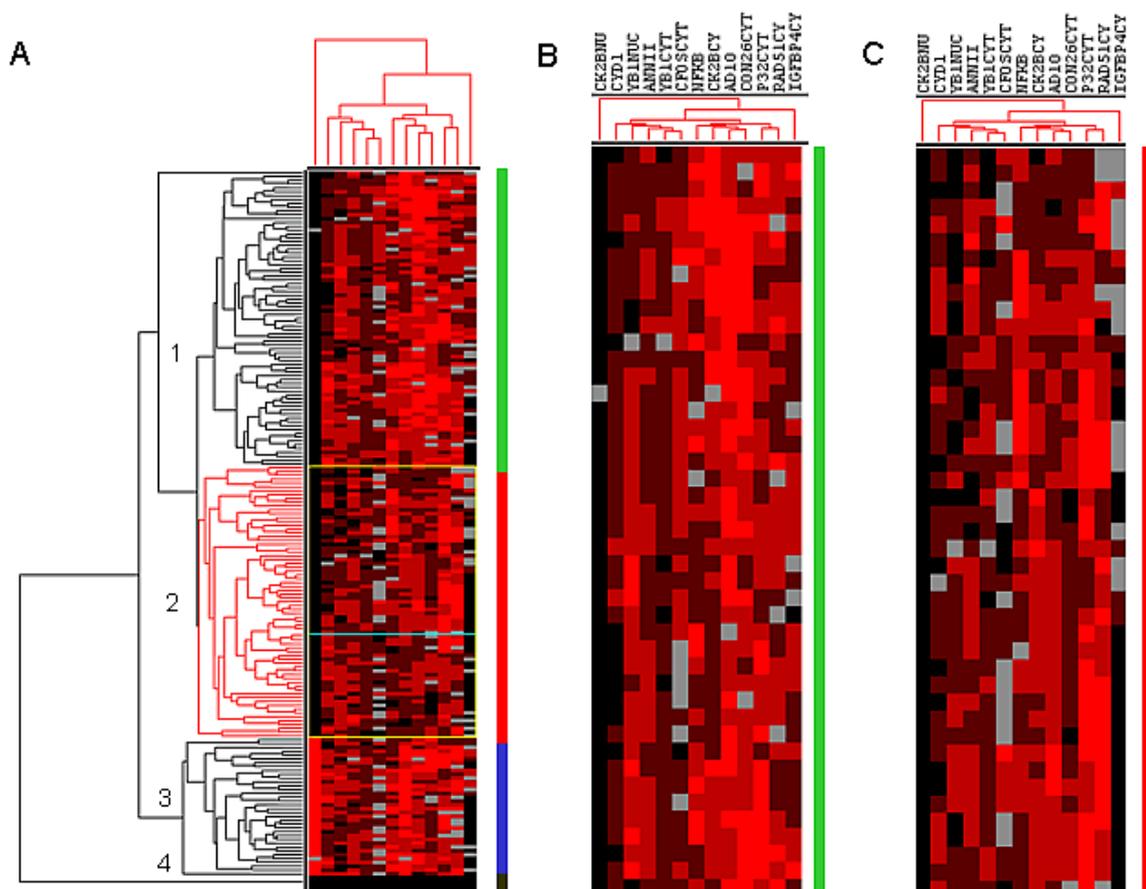


Abbildung 7

Die Clusteranalyse ergibt eine Aufteilung der untersuchten Proben in vier Gruppen. Wie erwartet clustert das Normalgewebe in einem separaten Cluster 4 (unten in Abbildung 7). Die anderen Tumore können in 3 Gruppen anhand ihrer Genexpressionsprofile eingeteilt werden. Bemerkenswerterweise sind im oberen Tumorcluster 85% der Tumore im T3 bzw. T4 Stadium, somit ergibt sich die Einteilung in ein „higher tumor stage cluster“. Diese Aussage wird durch die erhöhte Expression von Adam 10 in diesem Cluster unterstützt. Eine erhöhte Expression von Adam 10 zeigte in der statistischen Einzelauswertung eine signifikante Assoziation mit einem höheren Tumorstadium ($p=0,04$). Das zweite Cluster ist durch ein kürzeres Überleben der Patienten charakterisiert. Im sogenannten „Shorter Survival Cluster“ lebten 79% der Patienten kürzer als 200 Wochen und eine relativ hohe Prozentzahl der Patienten (39%) hatten G3-Tumore. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der auffallend reduzierten Expression von Connexin 26 in dieser Gruppe. Das dritte Cluster wird durch die hohe nukleäre Expression von Casein Kinase 2 Beta (CK2B) charakterisiert. Die zytosolische Überexpression von CK2B clustert zusammen mit Adam 10, Connexin 26 und NFkB, was biologische Relevanz haben könnte. Da die Anzahl der Tumore in diesem Cluster relativ klein ist ($n=36$), sollte diese Aussage jedoch mit Zurückhaltung interpretiert werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass die verminderte Expression von Connexin 26 signifikant ($p=0,02$) mit einem kürzeren Überleben der Tumorpatienten und einem höheren Tumorgrading ($p=0,026$, G1 und G2 versus G3) einhergeht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die die Connexin 26 Expression in Tumoren der Blase [Grossman et al. 1994] und der Lunge untersuchten [Chen et al. 2005]. Dort wurde in den untersuchten Karzinomen der Blase und der Lunge ebenfalls eine verminderte Connexin 26 Expression festgestellt und in den Karzinomen der Lunge mit einem kürzeren Überleben korreliert. Das Connexin 26 Gen wurde als potentielles Tumor-Suppressor-Gen in Karzinomen der Brust isoliert [Lee et al. 1991]. Connexine sind an der „Gap Junctional Intercellular Communication“ beteiligt, kurz auch GJIC genannt, die den Transfer von Ionen, Metaboliten und kleinen Molekülen bis ungefähr 1 kDa Grösse reguliert, die an der Zell-Zell-Kommunikation und -steuerung beteiligt sind [Knuechel et al. 1996]. Es besteht ein grosses Interesse, die Rolle GJIC in bezug auf die Tumorentstehung zu erforschen. Den Connexinen und auch der GJIC wird dabei eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [Chen et al. 2005]. Unsere Ergebnisse stützen inhaltlich diese Beobachtung. Genauere Mechanismen müssen in Zukunft noch erforscht werden. Eine reduzierte oder aberrierende GJIC- oder Connexinexpression wurde bisher in verschiedenen Tumoren und Tumorzelllinien gefunden [Saitoh et al. 1997, Laird et al. 1999]. Eine Wiederherstellung der

GJIC in Tumorzelllinien durch die Transfektion von Connexinen kann Wachstum und Tumorigenität reduzieren [Zhang et al. 1998].

Die Überexpression eines anderen von uns untersuchten Proteins, ADAM 10, zeigte eine signifikante Korrelation mit einem höheren Tumorstadium ($p=0,04$, T1,T2 versus T3,T4). In einer Studie über die Expression von Matrixmetalloproteinasen in kolorektalen Karzinomen fand sich eine starke Expression von MMP-3 und MMP-10 (ADAM 3 und ADAM 10) in allen untersuchten Fällen [Bodey et al. 2000], besonders in der Extrazellulärmatrix in der Nähe von Blutgefäßen. Diese Aussage wurde bisher noch nicht prognostisch validiert. Die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) ist eine Familie von Enzymen, die an der Umwandlung der Extrazellulärmatrix beteiligt ist und so einen Beitrag zu Zellinvasion und Metastasierung von neoplastischen Prozessen leistet. In Magenkarzinomen wurde eine hohe Expression von ADAM 10, ADAM 17 und ADAM 20 gefunden [Yoshimura et al. 2002]. Es wurde weiterhin eine temporäre Veränderung der Expression von ADAM 10 und ADAM 17 in Magenepithelzellen beobachtet, die durch eine *Helicobacter pylori* Infektion des Magens vermittelt wurde. In kleinzelligen Karzinomen der Lunge fand sich eine Überexpression von ADAM 10 [Lin et al. 2004]. In Studien über chromosomale Veränderungen in kolorektalen Karzinomen aus unserem Institut wurde eine Überexpression auf der chromosomalen Region 15q22-23 mit einem kürzeren Überleben der Patienten und einer weiteren Tumorprogression assoziiert [Knösel et al. 2003, Knösel et al. 2004]. Interessanterweise liegt der chromosomale Lokus von Adam 10 auf 15q22. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit unseren Ergebnissen.

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 $pM1$, $p=0,001$). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Aussagen bezüglich der Funktion von Cyclin D1 in der Onkogenese und in der Zellzykluskontrolle. Cyclin D1 wird als potentieller prognostischer Marker des kolorektalen Karzinoms angesehen [Maeda et al. 1997]. Bei CGH-Untersuchungen aus unserem Institut [Knösel et al. 2003] wurde in Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms ein signifikanter Gewinn auf Chromosom 11 detektiert, auf dem auch das kodierende Gen für Cyclin D1 (11q13, NCBI genesearch) lokalisiert ist.

Eine schwächere Expression von IGFBP-4 war signifikant positiv mit einer Fernmetastasierung korreliert ($pM0$ vs $pM1$, $p=0,045$). Dies ist die erste Untersuchung, die die hochsignifikante Korrelation zwischen der erhöhten Expression von IGFBP-4 und einer Fernmetastasierung im kolorektalen Karzinom zeigt. Zuvor wurde in epidemiologischen Studien ein Zusammenhang zwischen IGF- und IGFBP-Blutspiegeln und damit verbundenen Abnormitäten in der

Proliferation und einem erhöhtem Krebsrisiko festgestellt [Yu et al. 1999]. Dies bezog sich auf Tumore der Lunge.

Eine Überexpression von Annexin II zeigte einen Trend zur Korrelation mit einem höheren Metastasierungsgrad (pM0 vs pM1, $p=0,08$). Dieses Ergebnis stimmt mit einer Untersuchung von Emoto et al. von 2001 überein, der für das kolorektale Karzinom eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Annexin II und dem histologischen Typ, der Tumorgrosse, der Infiltrationstiefe und dem pTMN-Stadium zeigen konnte [Emoto et al. 2001]. Laut Emoto et al. ist eine Expression von Annexin II mit einer schlechteren Prognose von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom assoziiert. In einer anderen Arbeit wurde eine Überexpression von Annexin II in fortgeschrittenen Magenkarzinomen festgestellt [Emoto et al. 2001]. Dort hatten Patienten mit einer Überexpression von Annexin II eine signifikant schlechtere Prognose.

Für die Überexpression von RAD51 zeigte sich ebenfalls eine Trend zur Korrelation mit einem höheren Tumorgrading mit $p=0,076$ (G1/G2 im Vergleich zu G3). In dukalen Karzinomen der Mamma korreliert eine Überexpression von RAD51 signifikant mit einem höheren Tumorgrading. Unsere Arbeit ist die erste, die einen tendenziellen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von RAD51 und dem höheren Tumorgrading im kolorektalen Karzinom zeigen konnte.

In den letzten Jahrzehnten war die Klassifizierung von Tumoren nach dem TNM-Stadium und dem Tumorgrading G die gebräuchliche Einteilung zur klinischen Bewertung und Behandlungsplanung von Tumoren. Diese Einteilung liefert jedoch oft nur unzureichende Informationen über das tatsächliche maligne Potential eines Tumors. Im Falle des kolorektalen Karzinoms werden dringend neue Marker zur besseren Einschätzung des Krankheitsverlaufs benötigt. 40% der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom in Dukes Stadium B entwickeln nach der Primärbehandlung ein Tumorrezidiv. Die Bedeutung der adjuvanten Chemotherapie für das kolorektale Karzinom im Dukes Stadium B ist trotz intensiver Forschung bisher nicht eindeutig geklärt [McDonald et al. 1999]. In diesem klinischen Rahmen wäre eine neue Einteilung auch nodalnegativer Patienten von grosser Bedeutung für eine individuelle Risikostratifizierung und Behandlungsplanung [O'Connell et al. 1992]. Dabei ist eine wichtige Frage, welche Patienten nach einer radikalen Operation von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren könnten [McLeod et al. 1999]. Gross angelegte Analysen, wie sie durch die Anwendung von TMA-Technik und Clusteranalysen möglich geworden sind, liefern entscheidende Informationen über einzelne Biomarker und ihre Assoziation zu bestimmten Tumoren. Trotz vieler auf unterschiedlichem Wege entstandener Einzelergebnisse ist es

schwierig, den prognostischen Aussagewert und die Validität und Reliabilität der einzelnen Untersuchungen in verschiedenen Studien in bezug auf die einzelnen Marker zu gewichten. Eine Wiederholung der Ergebnisse in breit angelegten retrospektiven Studien mit standardisierten Färbe- und Auswertungsprotokollen wäre wünschenswert, um Marker in ihrer studienbezogenen Aussage zu validieren und vielleicht in Zukunft als entscheidendes Kriterium für die prognostische Einschätzung und Behandlung von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom einsetzen zu können.