

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A.
Dekan
Referentin: Priv.-Doz. Dr. Möslein-Wagner
Referent: Priv.-Doz. Dr. Müller

Aus der
Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Röher

Die Expressionsanalyse
der Mismatch-Repair-Enzyme **hMLH1**, **hMSH2** und **hMSH6**
in unselektionierten Endometriumkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Andreas Röhrig

2002

Inhaltsverzeichnis

1.0 Einleitung

1.1 Genetische Grundlagen

1.2 Klinische Merkmale und Diagnose

1.3 Molekulargenetische Diagnostik und klinische Vorsorge

1.4 Epidemiologie

1.5 Ätiologie

1.6 Management

1.7 Klinische Relevanz

2.0 Material

2.1 Patienten

2.2 Erfolgte Therapie

3.0 *Methodik*

3.1 Die Immunhistochemie

3.2 Protokoll der Färbung

4.0 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Färbungen

4.2 Streptavidinfärbung

4.3 Fixierungsprobleme

4.4 Auswertungskriterien

4.5 Verteilung in den Färbegruppen

- 4.6 Altersverteilung in den Färbegruppen**
- 4.7 Altersverteilung**
- 4.8 hMLH1**
- 4.9 hMSH2/hMSH6**
- 4.10 hMSH6**
- 4.11 Rezidive**
- 4.12 Familienanamnese**
- 4.13 Andere Malignome**
- 4.14 X²-Test zur Rezidivhäufigkeit bei hMSH2-negativen Tumoren**

5.0 Diskussion

- 5.1 Viele Tumore ohne Proteinexpression in unselektionierten Endometriumkarzinomen**
- 5.2 Die Bedeutung des hMSH6-Gens bei Endometriumkarzinomen**
- 5.3 hMLH1 und das Hypermethylierungsmodell**
- 5.4 hMSH2 und das Dimermodell**
- 5.5 Die Immunhistochemie als Screeningmethode**
- 5.6 Managementbesonderheiten bei den HNPCC-Patienten**
- 5.7 Zusammenfassung**

6.0 Auswertungsschlüssel

7.0 Literaturquellenkatalog

1.0 Einleitung

1.1 Genetische Grundlagen

HNPCC (Hereditäres Nicht-Polypöses Kolorektales Syndrom): Das Syndrom der defekten Mismatch-Reparatur-Gene

Die Erstbeschreibung des Syndroms geht auf Aldred Warthin zurück, der im Jahr 1895 die Familie G* mit auffälliger Häufung an Magen-, Colon- und Endometriumkarzinomen beschrieb. Die in dieser Familie dominierenden Magenkarzinome reflektieren primär exogene Einflüsse und stehen heute nicht im Vordergrund, was mit der allgemeinen Abnahme der Morbidität dieses Tumors in der Gesamtbevölkerung zusammenhängen könnte. Nach Berichten über weitere betroffene Familien etablierte sich der Begriff „Cancer Family Syndrome“. In der Mitte der 60-er Jahre erkannte Lynch die hereditäre Natur der Erkrankung, die einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus zu haben schien und vermehrt Endometriumkarzinome zeigte. Zu dieser Zeit wählte man die deskriptive Bezeichnung „Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer“ (HNPCC) um das Syndrom von der „Familiären Adenomatösen Polyposis“ abzugrenzen. Der Name ist insoweit nicht ganz glücklich gewählt worden, als daß es durchaus polypöse Vorstufen und extrakolische Tumore im Rahmen dieses Syndromes gibt.

Der erste bahnbrechende Erfolg, der schließlich zu der Identifizierung der Mismatch-Reparatur-Gene führte, war die Beschreibung der Mikrosatelliteninstabilität. Mikrosatelliten sind sich wiederholende, meist aus poly-A oder CA bestehende DNA Sequenzen, deren physiologische Bedeutung noch unverstanden ist. Es wurden Unterschiede bei sporadischen Kolonkarzinomen in der Länge der Mikrosatelliten zwischen Tumorzellen und Normalgewebe beobachtet – die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (Synonym: Replication Error Positive (RER+)). Kurze Zeit später stellten Forscher fest, daß die meisten HNPCC-Tumore eine hohe Mikrosatelliteninstabilität zeigten, was zu der Annahme führte, bei dem Syndrom handele es sich um Defekte in den DNA-Reparaturgenen. Der molekulare Mechanismus soll auf dem Beispiel der Escherichia coli erläutert werden.

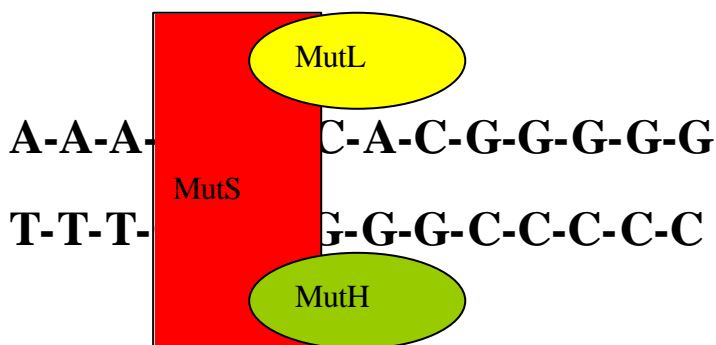
Drei Proteine nehmen an der Reparatur der Replikationsfehler teil: MutH, MutL und MutS. MutS erkennt die falsche Basenpaarung und bindet an diese Stellen, MutH wird benötigt um an dem neusynthetisierten DNA-Strang die Base zu ersetzen und nicht auf der Matrix. Mit Hilfe von MutL wird dann die Korrektur vorgenommen.

Beim Menschen wurden die entsprechende Gegenstücke als hMSH2 (humanes MutS Homolog) und GTBP für MutS, hMLH1 und hPMS2 für MutL identifiziert. Die Differenzierung zwischen der Matrix und dem neusynthetisierten Strang erfolgt wohl auf einem anderen Wege.

Kommt die Störung des Mismatch-Reparatur-Systems zustande, sind die Zellen nicht mehr in der Lage die in der S-Phase der Mitose auftretende Replikationsfehler zu korrigieren und akkumulieren so Mutationen in einer hohen Anzahl. Dafür scheint aber die Inaktivierung beider Allele notwendig zu sein. Die Betroffene mit HNPCC sind Träger eines mutierten, insuffizienten Allels und es ist die spontane Mutation des Zweiten, also des Wild-Typ Allels, die cancerogen wirkt, es handelt sich dabei um eine sogenannte Theorie der Zwei-Punkt – Mutation.

Die zwei am häufigsten betroffene Gene sind hMLH1 und hMSH2, die jeweils für etwa 30% der HNPCC Fälle verantwortlich gemacht werden.

Reparaturmechanismus am Beispiel der Escherichia coli



MutS – Erkennung der Mutation

MutH – Erkennung der Matrix, Schutz der Matrix vor falschen Korrekturen

MutL – Reparatur des Defektes, in unserem Fall die Base „A“ im falschen Paar „A-G“

1.2 Klinische Merkmale und Diagnose

Die klinischen Charakteristika des HNPCC-Syndroms sind folgende: autosomal dominantes Vererbungsmuster; frühes Auftreten der Tumore bei diesen Patienten; die etwa neunzigprozentige Penetranz; überwiegende Lokalisation im rechtsseitigen Colon; synchrones und metachrones Auftreten von kolorektalen Karzinomen; wegweisende, jedoch nicht pathognomonische histologische Muster, wie z.B. lymphozytische Infiltration, schlechte Differenzierung, klinisch bessere Prognose im Vergleich zu sporadischen Karzinomen und schließlich die Entwicklung von extrakolischen Tumoren, u.a. Endometrium-, Magen-, Dünndarm-, Ovarial-, Pankeas-, Ureter- und Nierenbeckenmalignomen (Lynch H.T., Smyrk T., Jane F. Lynch, Molecular Genetics and Clinical-Pathology Features of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma (Lynch Syndrome), Oncology, Vol. 55, 1998, 103-108). Sie haben jedoch keine Berücksichtigung in den Amsterdamer Kriterien I gefunden, so daß die Prävalenz der Erkrankung unterschätzt wurde. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, hat man später in den Amsterdam-II-Kriterien auch extrakolische Karzinome berücksichtigt. Die im internationalen Gebrauch etablierten Amsterdamer Kriterien besagen, daß mindestens drei Mitglieder einer Familie, zwei davon Verwandte ersten Grades, in mindestens zwei Generationen kolorektale Karzinome haben müssen und mindestens einer bei der Diagnosestellung unter 50 Jahren alt ist. Hier hat man einige der typischen Merkmale der Erkrankung festgehalten, nämlich das verhältnismäßig junge Alter der Patienten bei der Erstmanifestation und die familiäre Häufung der Tumore. Weitere Charakteristika sind unter anderem die überwiegend proximale Lokalisation (etwa 70% der Tumore vor der linken Kolonflexur), Auftreten von synchronen und metachronen Malignomen und natürlich extrakolischer Tumoren, wobei Endometrium-, Ovarial- und Magenkarzinome neben einigen anderen die dominierenden Lokalisationen darstellen. Sie haben jedoch keine Berücksichtigung in den Amsterdamer Kriterien gefunden, so daß mehrere Familien, besonders in der Zeit der Kleinfamilien und hoher Mobilität, diese nicht erfüllen können und so die Prävalenz der Erkrankung unterschätzt wird. Man hat den Begriff der HNPCC-like Familien geprägt, um diese Patienten erfassen und ihnen eine angemessene Betreuung anbieten zu können (Lynch H.T., Smyrk T., Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, Cancer, Sept 15, 1996 , Vol 78 , Num 6, 1149-64).

Bereits aus dem oben Gesagten läßt sich ableiten, daß eine genaue und ausführliche Familienanamnese das effektivste und zweifelsohne das kosteneffizienteste Diagnostikum darstellt. Wenn es möglich ist, immer diese Information mit Unterlagen, vor allem die Histologie, sichern. Die Immunhistochemie, die Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität, die Gensequenzierung und weiteres mehr eignen sich zur Diagnosesicherung und sind vom großen wissenschaftlichen Interesse. Da aber für einen relativ großen Anteil der HNPCC-Fälle noch kein genetisches Korrelat gefunden werden konnte, dürfen negative Ergebnisse dieser Methoden auf gar keinen Fall als Ausschlußkriterien gewertet werden. Andererseits ist die Mikrosatelliteninstabilität keineswegs auf das HNPCC-Syndrom beschränkt, auch wenn sie zur primären Abklärung des Syndroms maßgeblich beigetragen hat. Etwa 20-30% unselektionierter kolorektaler Karzinome sind MSI positiv, somit stellt HNPCC nur einen Anteil dieses Kollektivs dar.

1.3 Molekulargenetische Diagnostik und klinische Vorsorge

Die klinische Vorsorge der auf HNPCC verdächtigen Patienten wird durch die Vielfältigkeit der Mutationen der mehreren DNA-Reparaturgene erschwert. Es sollen deswegen sorgfältige klinische Untersuchungen, ausführliche Anamneseerhebung sowie differentialdiagnostische Überlegungen dem molekulargenetischen Screening auf jeden Fall vorausgehen. Die von Liu et al. 1995 vorgeschlagene Vorgehensweise beinhaltet drei Schritte. Zuerst wird die Amplifikation der Gene mittels der PCR Methode mit anschließender elektrophoretischen Trennung der Produkte durchgeführt. Bereits hier ist die Identifikation mehrerer Mutationen möglich. War dies nicht der Fall folgt die Translation der Produkte zu Polypeptiden und die Elektrophorese derselben. Bei diesem Vorgehen manifestieren sich die DNA-Aberrationen meistens durch Abbruch der Peptidkettensynthese und den daraus resultierenden inkompletten Polypeptiden, viel seltener durch Synthese „falscher“ Polypeptiden. Waren die Ergebnisse negativ, muß bei einem weiterbestehendem klinischen Verdacht die komplette Sequenzanalyse der Gene durchgeführt werden.

Es gibt eine Methode, die Mikrosatelliteninstabilität in Paraffinschnitten nachzuweisen. Das Gewebe wird mit Triton X-100 inkubiert, mit fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert und anschließend elektrophoretisch in einem Sequenzer aufgearbeitet.

Der Zeitaufwand reduziert sich von etwa drei Tagen auf 12 Stunden, die Methode ist effizienter und die Kontaminationsgefahr ist geringer.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mittels PCR mit Di- und/oder Mononukleotidrepeat- Mikrosatellitenmarkern.

Die dabei festgestellten MSI+ Tumoren sollen dann der Mutationssuche zugeführt werden. Die MSI ist ein sehr unspezifisches Phänomen, dem offensichtlich unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Die Mutationssuche endet bei den MSI-positiven Tumoren oft ergebnislos, was einerseits durch weitere noch nicht beschriebene Mismatch-Reparatur-Enzyme erklärbar wäre, andererseits kann die Mikrosatelliteninstabilität auch im Rahmen der Hypermethylierungstheorie, also bei völlig intakten Genen, auftreten. Dieser Mechanismus kommt auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Crohn, vor.

Bei den für HNPCC verdächtigen Fällen kann auch eine immunhistochemische Färbung durchgeführt werden, um erstens eine Störung in den DNA-Reparatur-Genen nachzuweisen bzw. auszuschließen, und zweitens um diese einzugrenzen. Die Immunhistochemie ist als Untersuchungsmethode auf Funktionsebene sehr reizvoll, da die hohe Sensitivität (bei Prüfung mehrerer Enzyme) und Spezifität eine zuverlässige Aussage über den Zustand des Mismatch-Reparatur-Systems erlaubt, während die MSI-Analyse nur einen Verdacht äußern läßt.

Läßt sich in der Färbung die Expression der kodierten Proteine nachweisen, so ist eine Mutation mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen, da die Expression von insuffizienten aber strukturähnlichen Produkten als selten angesehen werden darf. Da die Mutationen meistens mit dem Abbruch der Peptidkette einhergehen ist keine Sekundär- und Tertiärstruktur mehr möglich. Und auch wenn es zur Synthese einer „falschen“ Primärkette kommt, ist aufgrund der unterschiedlichen Ladung, Größe und Struktur der einzelnen Aminosäuren das Zusammenfallen der Peptidkette zu einem funktionstüchtigen Enzym nicht möglich. Da die nötigen dreidimensionalen Bindungsstellen für die jeweiligen Antikörper fehlen, sind auch diese seltenen Fälle immunhistochemisch negativ.

Bei negativen Ergebnissen muß unbedingt weiterführende Diagnostik angeschlossen werden.

1.4 Epidemiologie

Die Endometriumalignome stehen in den westlichen Industrienationen nach Kolon-, Mamma- und Lungenkarzinomen an vierter Stelle in der Tumorverteilung bei Frauen und haben sich als die Häufigsten im weiblichen Genitaltrakt vor Cervixkarzinomen behauptet. Der Rückgang der Letzten läßt sich auf die effektive Tumorstufe, Früherkennung und Therapie der Dysplasien durch Konisation zurückführen. Die kontinuierliche Zunahme der Endometriumkarzinome in den letzten Jahren hängt wahrscheinlich mit der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung zusammen. Die Manifestation der Erkrankung liegt überwiegend im postmenopausalen Alter und ist durch das Wiederauftreten der genitalen Blutung, beziehungsweise die Irregularität derselben in den jüngeren Jahren charakterisiert.

Die Tumorzinzidenz beträgt in Deutschland etwa 24/100 000 Frauen im Jahr, was eine Gesamtzahl von etwa 20 400 Fällen pro Jahr ausmacht. Weltweit sind es 150 000 Neuerkrankungen pro Jahr. In der Bundesrepublik versterben etwa 1 300 Patientinnen im Jahr an Endometriumkarzinomen.

Die Endometriumkarzinome kommen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle sporadisch vor. Der Anteil der hereditären Karzinomen wird in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben, von 1% bei Hagen et al. bis zu 5-10% in anderen Publikationen. Im Rahmen des HNPCC-Syndroms kommen die Endometriumkarzinome bei etwa 10% aller Betroffenen vor und treten bei weiblichen Patienten in 20-30% der Fälle auf, was sie nach kolorektalen Karzinomen zur zweithäufigsten Tumorentität bei diesem familiären Leiden werden läßt. In der Studie von Wijnen et al. an einem großen Kollektiv von 214 Familien mit familiären kolorektalen Karzinomen ohne Mutationsnachweis im hMLH1- und hMSH2-Screening konnte bei 10 Familien eine hMSH6-Keimbahnmutation festgestellt werden. In diesen Familien erkrankten sogar 73% der Anlageträgerinnen an einem Endometriumkarzinom.

1.5 Ätiologie

Die sporadischen Endometriumkarzinome lassen bei ihrer Entstehung eine schrittweise maligne Transformation erkennen. Die adenomatösen Hyperplasien sind insbesondere unter übermäßiger und/oder dauerhafter Östrogenstimulation bei verhältnismäßigem Mangel an Gestagenen zu beobachten. Beide Hormone werden hauptsächlich in den Ovarien (Graaf-Follikel, Corpus luteum) produziert und unterliegen einem Feed-Back-Mechanismus über das luteinisierende und das follikelstimulierende Hormon des Hypophysenvorderlappens, die ihrerseits durch das LH-FSH-Releasinghormon des Hypothalamus reguliert werden. Östrogene führen zur Proliferation des Endometriums, die Gestagene unterdrücken die Zellteilung und bewirken den Übergang der Uterusschleimhaut aus der Proliferations- in die Sekretionsphase. Das Fortschreiten der adenomatösen Hyperplasie von Grad I bis III ist durch Zunahme der Mitoserate, des Proliferationsgrades und der atypischen Zellen gekennzeichnet. Bei weiterer Stimulation ist das Entstehen eines Carcinoma in situ und daraus die Entwicklung eines invasiven Endometriumkarzinoms möglich. In diesem Zusammenhang sind einige Erkrankungen beziehungsweise Faktoren zu erwähnen, die mit erhöhtem Karzinomrisiko einhergehen. Dazu gehören zum Beispiel östrogenproduzierende Tumoren, das Stein-Leventhal-Syndrom, Störungen des Menstruationszyklus, Adipositas (bei Adipositas wird im Fettgewebe vermehrt aus Androstendion Östron synthetisiert), reine Östrogenkontrazeptiva und Mangel an dem sexualhormonbindenden Globulin. In mehreren Studien ist gezeigt worden, daß bei reiner Östrogensubstitutionstherapie der postmenopausalen Beschwerden und der Osteoporose das Karzinomrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung um das Drei- bis Vierfache gesteigert ist. Diese erschreckende Zahlen lassen sich durch die Gabe eines Kombinationspräparates fast auf das Normalniveau reduzieren. Weitere Risikofaktoren stellen eine späte Menopause sowie Nulliparität dar, während eine späte Menarche, Einnahme oraler Kontrazeptiva und Multiparität protektiv wirken.

Ein weiterer Entstehungsmechanismus beruht, ähnlich wie bei dem kolorektalen Karzinom, auf der Anlage eines defekten Mismatch-Reparatur-Systems.

1.6 Management

Zur Therapie der Tumoren bei HNPCC stehen die etablierten Verfahren, zum Beispiel Operation, adjuvante und neoadjuvante Chemotherapie, Radiatio und weiteres mehr zur Verfügung.

Viel interessanter sind die Möglichkeiten der Vorsorge und der Früherkennung im Rahmen des Syndroms, sowie die seit neuestem diskutierte Aspirin/Sulindac Therapie in Verbindung mit diätetischen Maßnahmen. So besteht einerseits die Option der präventiven Kolektomie, wie sie bei der Familiären Adenomatösen Polyposis seit einigen Jahren etabliert ist, andererseits die regelmäßige, zweijährige Koloskopie mit Abtragung der Polypen und Biopsien aus verdächtigen Läsionen. Zu diesem Thema existieren unterschiedliche Meinungen, während Lynch (Lynch HT. Is there a role for prophylactic subtotal colectomie among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carrier? Dis Colon Rectum 1996; 39;109-110) und Church (Church JM. Prophylactic colectomie in patient with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Ann Med 1996; 28; 479-82) die Kolektomie empfehlen, lehnen Andere (Vasen HFA, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrom). Lancet 1995; 345; 183-4.) diese Option ab.

Bei der um den 25-ten Lebensjahr durchgeführten prophylaktischen Kolektomie steigt die Lebenserwartung um 15.6 Jahren im Vergleich zu den nicht behandelten Patienten.

Die Vorteile dieser Methode lassen mit zunehmendem Alter der Patienten nach und sind minimal, wenn der Eingriff bereits bei der Tumorversorgung erfolgt. Erwähnenswert sind die Komplikationen der Kolektomie, und vor allem die Stuhlunregelmäßigkeiten, die jahrelang andauern können. Bei der subtotaler Resektion bleibt das Risiko der rektaler Karzinome natürlich bestehen und bedarf angemessener Nachsorge, wobei die Belastung durch die Rektoskopie bei weitem nicht so schwer ist, wie die durch die Koloskopie.

Entscheidet man sich gegen die Kolektomie, so muß der Patient in die regelmäßigen koloskopischen Vorsorgeuntersuchungen eingebunden werden. Die Kontrolle wird bei unauffälligem Befund nach zwei Jahren, bei Polypen in einem Jahr und bei verdächtigen aber histologisch tumornegativen Läsionen in drei bis sechs Monaten empfohlen. Der Benefit dieser Strategie beträgt 13.5 Jahren im Vergleich zu den nicht überwachten Patienten.

Die Aspirin/Sulindac Behandlung zeigte dramatische Reduktion der Mikrosatelliteninstabilität in den Zellen der kolorektaler Karzinome, war jedoch bei den Endometriumkarzinomen ohne jeglichen Effekt. Weitere Studien sollen die klinische Relevanz und Anwendungsbereich dieser medikamentösen Prophylaxe zeigen.

Im Tierversuch wurde an Apc1638 Mäusen eine Reduktion der Läsionen unter einer Diät mit hohem Calcium- und niedrigem Fettanteil beobachtet. Ob es nur auf lokale Wirkung zurückzuführen ist, oder über systemische Einflüsse auch die extrakolische Tumore beeinflusst, muß noch untersucht werden.

1.7 Klinische Relevanz

Die Bedeutung des Syndroms im klinischen Alltag leitet sich aus der Heredität der Erkrankung mit der Möglichkeit der Prävention der Betroffenen und der hohen Penetranz des Syndroms bei den Genträgern. Wegen des hohen Risikos ein Karzinom oder Zweitumor zu entwickeln, müssen die Patienten gut aufgeklärt und in die Vor- beziehungsweise Nachuntersuchungen eingebunden werden.

Diese Arbeit soll die Beziehung zwischen den immunhistochemisch negativen Tumoren und Alter, Familienanamnese, synchronen und metachronen Zweitmalignomen, Histologie und mehreren weiteren statistischen Daten beim Endometriumkarzinom analysieren. Das Ziel der Studie ist es, die Immunhistochemie an einem Kollektiv unselektionierten Uterusmalignomen auf die klinische Anwendbarkeit im Rahmen des HNPCC-Syndroms zu prüfen, beziehungsweise zu etablieren.

2.0 Material

2.1 Patienten

Die Tumorblöcke aus Paraffin stammen aus dem Archiv der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und umfassen 132 Patientinnen mit unselektionierten Uterusmalignomen, die im Zeitraum von 1980 bis 1994 in der Klinik operiert worden sind. Das Gewebe wurde gleich nach der Entnahme im 4% Formaldehyd fixiert, zugeschnitten und im Paraffin eingebettet. In diesem Kollektiv fanden sich 113 Adenokarzinome, 3 Leiomyosarkome, 2 Plattenepithelkarzinome und 2 Chorionzellkarzinome. In 12 Fällen stand leider kein Tumorgewebe mehr zur Verfügung.

2.2 Erfolgte Therapie

Aus den uns zur Verfügung stehenden Daten geht hervor, daß eine Patientin nach fraktionierter Abrasio nicht operiert wurde und bei allen anderen Patientinnen eine abdominelle Hysterektomie mit bilateraler Adnexektomie erfolgte. In über der Hälfte der Fälle wurden iliakale, paraaortale und/oder inguinale Lymphknoten exstirpiert.

3.0 Methodik

3.1 Die Immunhistochemie

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung basiert auf einer hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion mit darauf folgender enzymgesteuerter Farbreaktion, die letztlich die zu untersuchenden Strukturen sichtbar und damit beurteilbar macht.

Bei der ABC-Methode nutzt man die intensive Bindungsreaktion zwischen dem Glykoprotein Avidin und dem Coenzym Biotin aus. Der Primärantikörper, in unserem Fall Antikörper gegen die Expressionsprodukte der Gene hMLH1, hMSH2 und hMSH6, bindet an die den Untersucher interessierenden Proteindomänen und stellt seinerseits Antigenstrukturen für einen mit Biotin konjugierten Brückenantikörper, auch Sekundärantikörper genannt, dar. Diese Antikörper sind gegen die speziesspezifischen Antigene (in unserem Fall Maus) gerichtet und bieten nun dem ABC-Komplex Halt an dem Primärantikörper und somit an den zu untersuchenden Strukturen. Die Peroxidase, das an den ABC-Komplex gebundene aktive Enzym, wird dann als das Werkzeug zum Sichtbarmachen verwendet. Das lösliche farblose DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) wird dabei von der Peroxidase in sein unlösliches braunfarbendes Produkt überführt und stellt so hochselektiv die den Untersucher interessierende Antigene dar. Schließlich erfolgt die Gegenfärbung mit Hämalaun zur Beurteilung der übrigen Gewebe- und Zellstrukturen.

Mögliche Fehlerquellen stellen zum Beispiel Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen, die Aktivität der endogenen Peroxidase und die Bindung des ABC-Komplexes an das endogene Biotin dar.

Diesen begegnet man mit der Behandlung der Schnitte mit Normalserum zum Blocken der unspezifischen Antigene, mit der H₂O₂-Inkubation zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase sowie der A- und B-Biotinblockade.

3.2 Protokoll der Färbung

Das eingebettete Gewebe wurde in den Paraffinblöcken mit dem Mikrotom auf eine Stärke von 3-5 µm geschnitten und auf „Super Frost plus“ Objektträger aufgezogen. Nach dem Fixieren der Schnitte auf dem Glas durch die zwölfstündliche Behandlung bei 37 Grad, wurde das Gewebe immunhistochemisch wie folgt aufgearbeitet.

1. Entparaffinieren in Xylol für 10 Minuten.
2. Absteigende Alkoholreihe
3. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid 10 Minuten
5. Spülen mit Leitungswasser 5 Minuten
6. Kochen der Schnitte im Citratpuffer 20 Minuten in einem Mikrowellenherd bei maximaler Leistung zur Antigendemaskierung
7. Abkühlen bei Raumtemperatur 1 Stunde lang
8. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
9. Eindecken mit TBS+Triton
10. Blockieren der unspezifischen Bindungen mit Normal Horse Serum 10 Minuten
11. Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (hMLH1 oder hMSH2) über Nacht bei 4°C
12. Erwärmen der Schnitte bei Raumtemperatur 90 Minuten lang
13. Spülen mit TBS+Triton
14. Inkubation mit Brückenantikörper IgG Mouse 25 Minuten
15. Spülen mit TBS+Triton
16. Inkubation mit ABC-Komplex 40 Minuten
17. Spülen mit TBS+Triton
18. Aktivieren des DAB mit 30% Wasserstoffperoxid
19. Inkubation mit aktiviertem DAB 10 Minuten
20. Spülen mit Leitungswasser
21. Gegenfärbung mit Hämalaun 5 Minuten
22. Spülen mit Leitungswasser
23. Aufsteigende Alkoholreihe
24. Xylol für 1-2 Minuten

25. Eindecken mit dem Automaten

Das Protokoll der Streptavidinfärbung:

1. Entparaffinieren in Xylol für 10 Minuten.
2. Absteigende Alkoholreihe
3. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid 10 Minuten
5. Spülen mit Leitungswasser 5 Minuten
6. Kochen mit Überdruck 5 Minuten lang in einem Mikrowellenherd zwecks Antigendemaskierung
7. Abkühlen der Schnitte bei Raumtemperatur
8. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
9. Biotinblockade A 15 Minuten
10. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
11. Biotinblockade B 15 Minuten
12. Spülen mit Leitungswasser 1-2 Minuten
13. Eindecken mit Aqua destillata
14. Inkubation mit Primärantikörper 1 Stunde
15. Spülen mit Aqua destillata
16. Inkubation mit Polivalentantikörper 30 Minuten
17. Spülen mit Aqua destillata
18. Inkubation mit biotinuliertem Sekundärantikörper 30 Minuten
19. Spülen mit Aqua destillata
20. Aktivieren des DAB mit 30% Wasserstoffperoxid
21. Inkubation mit aktiviertem DAB 10 Minuten
22. Spülen mit Leitungswasser
23. Gegenfärbung mit Hämalaun 5 Minuten
24. Spülen mit Leitungswasser
25. Aufsteigende Alkoholreihe
26. Xylol für 1-2 Minuten
27. Eindecken mit dem Automaten

4.0 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Färbungen

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Proteinexpression der Mismatch-Repair-Gene hMLH1, hMSH2 und hMSH6 waren insgesamt 27 Endometriumkarzinome mit Expressionsstörungen aufgefallen, 14 davon waren hMLH1 negativ, 14 zeigten hMSH6-Störung und nur in 3 Fällen waren die Tumoren hMSH2-defizitär. Auffällig ist, daß alle drei hMSH2-negative Karzinome gleichzeitig auch hMSH6-negativ waren, so daß in unserer Serie von sporadischen Endometriumkarzinomen keine einzige isolierte hMSH2-Expressionsstörung vorliegt. Ein weiterer Tumor wies eine simultane hMSH6- und hMLH1-Negativität auf.

4.2 Streptavidinfärbung

Die Msh6-Färbung wurde an Schnitten mit den durch Sequenzieren gesicherten Mutationen optimiert und für die Studie übernommen. Da die „Versagerquote“ bei dieser Färbung viel geringer als erwartet ausgefallen ist, haben wir mit der Methode als Qualitätsvergleich einige Färbungen mit den hMSH2- und hMLH1-Antikörper wiederholt. Bei den in der ABC-Methode positiven Schnitten gab es keine gravierende Unterschiede, die Ansprechbarkeit der nicht auswertbaren Präparaten lag jedoch zwischen 60 und 70%. Da die Streptavidinmethode sich als um mehrere Potenzen spezifischer sowie zuverlässiger und als zeitlich vorteilhafter erwiesen hat, wurden die mit der ABC-Methode nicht auswertbaren Schnitte mit erstaunlich guter Ausbeute nachgefärbt.

4.3 Fixierungsprobleme

Vier Patientinnen schieden wegen Fixierungsprobleme des Gewebes für alle drei getesteten Antikörper aus der Studie aus. Im weiteren traten auch isolierte Mängel bei der Fixation der einzelnen Proteine auf , die eine Auswertung unmöglich machten und sich wie folgt verteilten:

hMLH1-Expressionsprodukte in 18 Fällen

hMSH2-Expressionsprodukte in 6 Fällen

hMSH6-Expressionsprodukte in 7 Fällen

Diese Problematik ist bei der hMLH1-Färbung seit längerem bekannt und läßt sich nur schwer beeinflussen.

4.4 Auswertungskriterien

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte nach einem vor dem Studienbeginn festgelegten Schema. So wurden die Schnitte in sechs Gruppen eingeteilt.

Gruppe 1: 0% positiver Zellkerne

Gruppe 2: unter 5% positiver Zellkerne

Gruppe 3: 5% bis 25% positiver Zellkerne

Gruppe 4: 25% bis 50% positiver Zellkerne

Gruppe 5: 50% bis 75% positiver Zellkerne

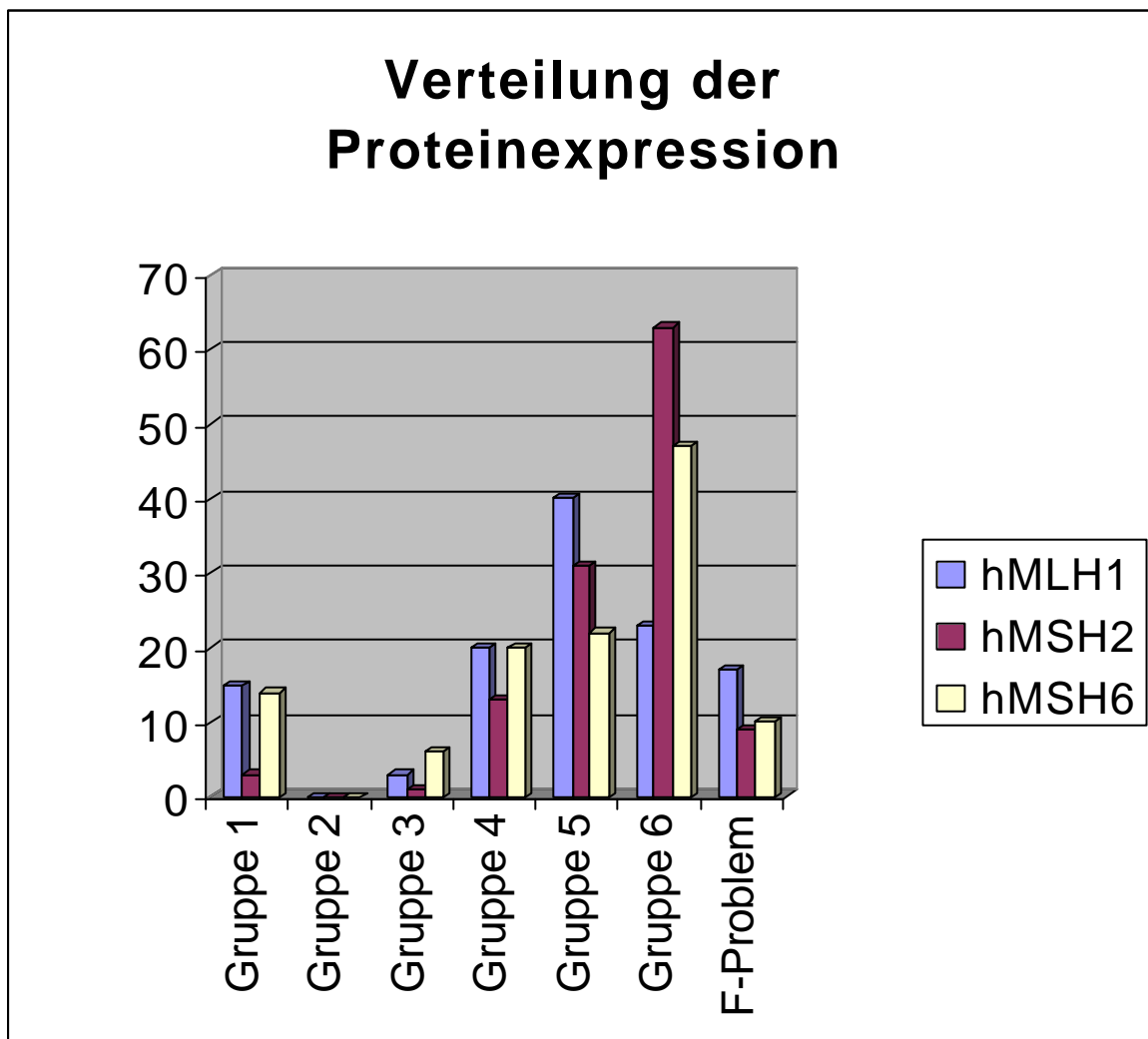
Gruppe 6: 75% bis 100% positiver Zellkerne

4.5 Verteilung in den Färbegruppen

Es ergab sich folgende Gruppenverteilung in den einzelnen Färbungen.

F-Problem = fixationsbedingte Auswertungsprobleme

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	F-Problem
hMLH1	15	0	3	20	40	23	19
hMSH2	3	0	1	13	31	63	9
hMSH6	14	0	6	20	22	48	10



Da der Gruppe 2 keine einzige Zuordnung erfolgte, bildet sie eine die Aussagekraft der Färbung unterstützende Trennzone zwischen den negativen und den positiven Tumoren.

4.6 Altersverteilung in den Färbegruppen

Die Gegenüberstellung des Färbeverhaltens und der Färbeintensität in bezug auf das Alters der Patientinnen bei der Diagnosestellung bzw. Operation zeigte nur in der Gruppe 3 (5 bis 25% positive Zellkerne) eine abweichende Tendenz. Während die geringere Anfärbbarkeit für MSH2- und MSH6- Antikörper eher bei jüngeren Frauen auftrat, wiesen in der MLH1- Färbung die älteren Patientinnen die geringere Intensität auf.

Antikörper\Färbung	Gruppe1	Gruppe2	Gruppe3	Gruppe4	Gruppe5	Gruppe6	Fixierungsprobleme
MLH1	65.27	0.0	70.33	63.53	63.39	66.26	65.44
MSH2	58.00	0.0	59.00	63.77	66.38	64.31	65.22
MSH6	60.57	0.0	61.33	63.95	65.52	66.67	62.5

4.7 Altersverteilung

Das mittlere Patientenalter bei der Diagnosestellung in unserem Gesamtkollektiv war 64,1 Jahre mit einer Streuung von 36 bis 90 Jahre. Die Patientinnen mit hMLH1 defizitären Tumoren waren mit 65,3 Jahren durchschnittlich sogar älter. Die hMSH2- und hMSH6- negativen Karzinome wiesen ein mittleres Alter von jeweils 58 und 58,8 Jahren auf. Zwölf Patientinnen in dem von uns untersuchten Kollektiv waren bei der Diagnosestellung unter 50 Jahre alt. Da die sich im jüngeren Alter manifestierenden Karzinome in ihrer Tumorgenese auf hereditäre Faktoren verdächtig sind, haben wir dieser Gruppe besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Die Tumorverteilung in diesem Kollektiv lies 2 (16,7%) Leiomyosarkome, 1 (8,3%) Chorionzellkarzinom und 9 (75%) Endometriumkarzinome erkennen.

Von diesen 9 Tumoren waren 4 (44,4%) immunhistochemisch negativ. Es fanden sich zwei hMSH6-, eine hMLH1- und eine kombinierte hMSH2/hMSH6- Expressionsstörungen.

Eine weitere Patientin (11,1%) wies familiäre Tumorbelastung auf, wobei sie in der Vorgeschichte ein Ovarialkarzinom hatte, was ein weiteres Indiz für eine abnorme Tumorgenese darstellt. In diesem Fall könnte aber auch ein durch exzessive Hormonproduktion des Ovarialkarzinoms induziertes Endometriumkarzinom diskutiert oder dies zumindest als begünstigender Faktor angesehen werden. Zusammengefaßt waren in diesem Kollektiv 55,6% der Patientinnen entweder durch das immunhistochemische Färbeverhalten, die Familienanamnese und Vormalignome auffällig.

4.8 MLH1

Die hMLH1-negativen Endometriumkarzinome wiesen in nur zwei (14,3%) von 14 Fällen eine tumorbelastete Familienanamnese und jeweils in einem Fall ein Vormalignom, einen Zweittumor und ein Rezidiv auf.

4.9 MSH2/MSH6

Die mit hMSH2/hMSH6-defizitären Tumoren aufgefallenen Patientinnen zeigten in zwei von drei Fällen ein Rezidiv, von denen eins ein zweites mal rezidierte.

Die dritte Patientin mit einem MSH2-MSH6 negativen Karzinom wurde mit vaginalen Blutungen auffällig und ist an einem Uteruspolyp operiert worden. Bei der histologischen Beurteilung fand sich ein Endometriumkarzinom im Stadium pT1a N0 M0. Ob Sie bei der Diagnose in einem fortgeschrittenerem Stadium ein Rezidiv entwickelt hätte, wäre natürlich vom großen wissenschaftlichen Interesse.

Die Familienanamnesen waren unauffällig, es gab in der eigenen Krankheitsgeschichte keine Vormalignome oder Zweittumore.

4.10 MSH6

Die in den Karzinomen hMSH6-Expressionsstörung aufweisenden Patientinnen waren in jeweils einem Fall mit einem Vormalignom und einer familiären Tumoranamnese belastet.

Von den vier immunhistochemisch negativen Tumoren in der Gruppe der unter fünfzig Jahre alten Patientinnen waren zwei hMSH6-defizitär und ein weiteres hMSH2 / hMSH6 negatives Karzinom. Dieser großer Anteil unterstreicht die besondere Bedeutung des hMSH6-Gens bei den hereditären Endometriumkarzinomen.

4.11 Rezidive

Betrachtet man die Rezidive in den Mismatch-Repair-suffizienten Endometriumkarzinomen, so kommt man auf 17,2% (15 Fälle), im Vergleich dazu waren es in den immunhistochemisch negativen Karzinomen 12% (3 Fälle, 2 davon hMSH2/hMSH6).

4.12 Familienanamnese

Die positive familiäre Tumoranamnese lies sich in 12% der MMR- und in 14,9% der MMR+ Tumoren nachweisen. Mit Vormalignomen waren 8% der MMR- und 16,1% der MMR+ Karzinompatientinnen belastet, wobei sie überwiegend Mamma- und Ovarialkarzinome entwickelten. Bei den Zweitumoren zeigten die beiden Gruppen praktisch keine Unterschiede mit 4% bei den RER- und 3,5% bei den RER+.

4.13 Andere Malignome

In unserem Kollektiv kamen außer den Endometriumkarzinomen jeweils zwei Plattenepithel- und Chorionzellkarzinome sowie drei Leiomyosarkome vor. Zwei der drei Leiomyosarkome rezidierten, was für diese Tumorentität charakteristisch ist, eins davon zweimal. Eine der zwei Patientinnen, die Plattenepithelkarzinome entwickelt haben, zeigte eine familiäre Tumorbelastrung und eine Patientin mit Chorionzellkarzinom war mit positiver Familientumoranamnese und einem Rezidiv aufgefallen. Die Chorionzellkarzinome sowie die Plattenepithelkarzinome zeigten eine regelrechte Expression der untersuchten Mismatch-Repair-Enzyme. Erwähnenswert ist ein hMLH1-negatives Leiomyosarkom, das bei einer familienanamnestisch unauffälligen Patientin im 55-sten Lebensjahr aufgetreten und im weiteren Verlauf mit einem Rezidiv behaftet war.

4.14 X²-Test zur Rezidivhäufigkeit bei MSH2- negativen Tumoren

	<i>MSH2 negativ</i>		MSH2 positiv		Summe
Tumor mit Rezidiv	2	0,48	16	17,52	18
	1,52	4,81	-1,52	0,13	
Tumor ohne Rezidiv	1	2,52	94	92,48	95
	1,52	0,92	1,52	0,02	
Summe	3		110		113

Beobachteter Wert	Erwarteter Wert
Differenz	X ² -Wert

$$X^2_{\text{gesamt}} = 4,81 + 0,13 + 0,92 + 0,02 = 5,88$$

Der kritische X²_{0,05;FG.1}-Grenzwert beträgt 3,84.

Damit überschreitet der Prüfwert den Grenzwert und bestätigt die Annahme, daß die MSH2- negative Tumoren statistisch signifikant häufiger als die MSH2-positiven zu Rezidiven neigen.

Ob es nur an der MSH2-Expressionsstörung liegt, oder das zusätzliche MSH6-Defizit diese Störung bedingt, kann man anhand unseres Materials nur zum Teil beantworten. Es liegt kein einziges Rezidiv bei einer isolierten MSH6-Störung und auch der MSH6/MLH1-negative Tumor ist unauffällig.

Aus der Literatur läßt sich eindeutig eine bessere Prognose bei den HNPCC-Tumoren feststellen. Über eine Neigung zu Lokalrezidiven wurde nicht berichtet.

5.0 Diskussion

5.1 Viele Tumore ohne Proteinexpression in unselektionierten Endometriumkarzinomen

Die hohe Anzahl der immunhistochemisch negativen Tumoren in unserem Kollektiv ist in erster Linie auf die hMLH1- und hMSH6-defiziente Karzinome zurückzuführen. Die Ursachen für eine Expressionsstörung können in zwei Gruppen eingeteilt werden, zum einen sind es Mutationen, als genetischer Grund eines Enzymausfalls, zum anderen Genregulationsstörungen, als epigenetische Mechanismen. Das erste Modell stellt das klassische HNPCC-Syndrom dar, wobei bei dem hMSH6- und hMSH2 Gen sich die Verhältnisse wegen der Dimerbildung etwas komplizierter gestalten und sich in unterschiedlichen Phänotypen manifestieren. Das zweite wird durch die Theorie der Hypermethylierung vertreten und ist nicht nur auf das HNPCC-Syndrom begrenzt. Da die Immunhistochemie die Ursachen der Expressionsstörung nicht zu differenzieren Vermag, kann der hohe Anteil an hMLH1-negativen Tumoren im unselektionierten Kollektiv dadurch erklärt werden. Dies setzt aber voraus, dass dieser Mechanismus in der Tumorgenese der nicht familiären Endometriumkarzinome eine wichtige Rolle spielt.

Die vielen hMSH6-Expressionsstörungen deuten auf eine unterschätzte Häufigkeit der Mutationen in der Bevölkerung hin. Der von dem klassischen HNPCC-Syndrom abweichende Phänotyp erklärt, warum diese Patientinnen beim Screening auf familiär bedingte Karzinome nicht erfasst werden.

5.2 Die Bedeutung des hMSH6-Gens bei Endometriumkarzinomen

Während die Rolle des hMSH2-Gens bereits seit längerer Zeit intensiv untersucht wird, wurde das hMSH6 eher stiefmütterlich behandelt. Die aktuellen Publikationen brachten die Erkenntnis, daß die Patientinnen mit MSH6-Mutationen eine Reihe Besonderheiten aufweisen. So ist die Manifestation der Tumore im Gegensatz zu den klassischen HNPCC Fällen eher im fortgeschrittenen Alter, die niedrige Penetranz und die geringe (weniger als 30% der untersuchten Loci) Mikrosatelliteninstabilität für mononukleotide Sequenzen sind weitere Charakteristika dieser Mutationen (Wu et al, Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Related Tumors Displaying Low Mikrosatellite Instability with MSH6 Germline Mutations, American Journal of Human Genetics, Vol. 65, 1999, 1291-98) .

Weiterhin kommen diese Karzinome häufiger in den sogenannten HNPCC-like Familien als in denen mit erfüllten Amsterdam-Kriterien vor. Dies ist die unmittelbare Folge aus dem oben Aufgeführten, denn die niedrige Penetranz kann sowohl die Generationsfolge wie auch das Auftreten der Erkrankung bei Verwandten ersten Grades negativ beeinflussen. An dem verhältnismäßig hohen Alter dieser Patienten bei der Diagnosestellung scheitert die zweite Voraussetzung für die Amsterdamer Kriterien. In der Studie von Wijnen et al. an einem großen Kollektiv von 214 Familien mit familiären kolorektalen Karzinomen ohne Mutationsnachweis im hMLH1- und hMSH2-Screening konnte bei 10 Familien eine hMSH6-Keimbahnmutation festgestellt werden. In diesen Familien erkrankten 73% der Anlageträgerinnen an einem Endometriumkarzinom. Im Vergleich dazu lag die Erkrankungsrate in vergleichbarer Serie mit hMSH2- und hMLH1-Mutationen bei 29 bzw. 31%.

Das relativ hohe mittlere Alter bei Patienten mit hMSH6-Mutationen bei Diagnosestellung konnte experimentell bestätigt werden. Man hat hMSH2-defiziente Mäuse im Tumorspektrum und dem Manifestationsalter mit hMSH3^{-/-} hMSH6^{-/-} Knockout- und hMSH6-negativen Mäusen verglichen. Erwartungsgemäß lies sich bei den Mäusen in den hMSH3^{-/-} hMSH6^{-/-} und hMSH2^{-/-} Knockout Gruppen eine frühzeitige Tumorentwicklung feststellen, da es sich in den beiden Gruppen um einen kompletten Ausfall der hMSH2/hMSH3 und hMSH2/hMSH6 Dimere handelte. Die Tumore bei den hMSH6^{-/-} Tieren manifestierten erst im höherem Lebensalter, was offensichtlich an dem intakten hMSH2/hMSH3-Komplex liegt (de Wind et al, HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of MSH3 and MSH6 mismatch-repair proteon functions, Nature Genetics, Vol. 23, November

1999, 359-363, und Edelman et al, The DNA Mismatch Repair Genes MSH3 and MSH6 Cooperate in Intestinal Tumor Suppression, Cancer Research, Vol 60, February 15, 2000, 803-07).

Der Anteil der Mutationen in unserem Kollektiv der unter fünfzig Jahre alten Patientinnen unterstreicht die Bedeutung des hMSH6-Gens im Rahmen der HNPCC-bedingten Endometriumkarzinomen. So war ein Drittel (3 von 9) der Tumoren immunhistochemisch hMSH6-negativ.

5.3 hMLH1 und das Hypermethylierungsmodell

Es wurde über hohe Korrelation der Expressionsstörung des hMLH1-Gens mit Mikrosatelliteninstabilität, insbesondere wenn sie in zwei oder mehr Regionen nachweisbar war, und Hypermethylierung des Genpromotors berichtet. Die Studie bezog sich auf die im Rahmen einer chronischen entzündlichen Erkrankung entstandenen Kolonkarzinome. (Fleisher et al. Mikrosatellite Instability in Inflammatory Bowel Disease-associated Neoplastic Lesions Is Associated with Hypermethylation and Diminished Expression of the DNA Mismatch Repair Gene, hMLH1, Cancer Research 60, 4864-4868, September 1, 2000) Die Pathogenese unterscheidet sich zweifelsohne von der des HNPCC-Syndroms, der Zusammenhang zwischen Abnahme der Expressionsprodukte des MLH1-Gens, der Mikrosatelliteninstabilität und Hypermethylierung im Bereich der Promotorregion ist als Modell jedoch sehr interessant.

Die neueren Studien haben Expressionsstörungen der Mismatch-Repair-Gene bei Methylierung der Cytosinmoleküle in der C-5 Position gezeigt. Da sich die methylierten Basen meistens in den an CpG – Sequenzen reichen Palindromsequenzen und diese ihrerseits in den meisten Genen überwiegend in den Promotorregionen liegen, kommt es zu Andockstörungen von Transkriptionsfaktoren (RNA-Polymerase) und somit zum Ausfall des Allels. Veränderungen im Methylierungsstatus ist einer der Genregulationsmechanismen zur Aktivierung bzw. Deaktivierung der einzelnen Gene im Laufe der normalen Entwicklung. Es wurde über Expressionsstörungen durch die Methylierung in der Promotorregion des hMLH1-Gens bei sporadischen kolorektalen Karzinomen, die Mikrosatelliteninstabilität zeigten, berichtet. In diesem Kollektiv konnte bei 85% der Karzinome diese Störung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fand sich keine Korrelation zum hMSH2-Gen.

Vorstellbar ist jetzt auch ein Ausfall des zweiten Allels bei einer angeborenen Störung des ersten nicht nur durch eine weitere Mutation, sondern auch durch die Promotormethylierung. Das Hypermethylierungsmodell der Promotorregionen von Mismatch-Repair-Genen scheint sowohl theoretischen als auch experimentellen Anforderungen standzuhalten. Es läßt aber auch viele Fragen offen beziehungsweise stellt uns vor einige neue Probleme. Als erster epigenetischer Faktor auf diesem Gebiet stellt sich die Frage der Vererbbarkeit allgemein, aber auch das Weiterreichen dieser Eigenschaft von der einen Zelle auf ihre Tochterzellen auf einem anderen Weg scheint mit einigen Problemen einherzugehen. So muß man sich fragen, ob der Methylierungszustand einen Einfluß nicht nur auf die Transkription der Gene hat, sondern auch die DNA-Duplikation negativ beeinflußt. Das scheint nicht der Fall zu sein, sonst wäre keine Zellteilung und somit kein Tumorstadium bei dieser Genese möglich. Wenn die Hypermethylierung aber kein Hindernis zum Andocken, Ablesen und Replizieren darstellt und die Zellteilung stattfindet, wie wird dieses Merkmal auf die Tochterzellen weitergegeben? Man könnte sich vorstellen, daß der Methylierungszustand der Matrix über die Mitose beibehalten wird. Wie erklärt man sich dann den Funktionsausfall der neusynthetisierten Genen. Es gäbe da zwei Möglichkeiten. Einerseits könnten die neusynthetisierten Gene noch vor der Teilung methyliert werden. Es würde dann aber heißen, daß die Enzyme bereits in diesem Stadium der Entwicklung ausfallen würden, was im Gegensatz zu dem späten Manifestationsalter steht. Andererseits ist auch die Methylierung der Promotorregionen in der Tochterzelle selbst denkbar. In beiden Fällen ist vor einer gestörten Demethylierung in der Zelle auszugehen, die dann ihrerseits genetisch (und nicht wie die Hypermethylierung epigenetisch) bedingt und damit wiederum vererbbar ist. Der Mechanismus der Hypermethylierung ist aber auch bei der normalen Zellteilung und Differenzierung als physiologischer Regulationsmechanismus bekannt. Wie das selektive Genab- und anschalten funktioniert ist weitgehend unbekannt.

Die Richtigkeit der Methylierungstheorie konnte experimentell an Zellkulturen durch die Wirksamkeit von 5-aza-C (5-aza-2'-deoxycytidin, ein Inhibitor der DNA-Methyltransferase), der zur Demethylierung der Promotorregion und zur regelrechten Expression der Mismatch-Repair-Gene führte, bewiesen werden.

Man hat dieselbe Idee auch im Tierversuch verwirklicht und die Substanz den für die DNA-Methyltransferase heterozygoten Mäusen appliziert. Daraufhin konnte ein deutlicher Rückgang der Polypenanzahl im Dickdarm festgestellt werden.

Es ist aber natürlich so, daß bei diesem Versuchsaufbau eine völlig unselektive Demethylierung des ganzen genetischen Materials stattfindet, so daß dieses Ergebnis auch auf die Demethylierung der andere Gene zurückgeführt werden könnte.

Das hohe mittlere Alter der Patientinnen in unserer Studie mit den in der hMLH1 immunhistochemischen Färbung negativen Tumoren könnte als ein weiteres Indiz für eine epigenetische Störung sein.

Leider gibt es keine Berichte über das Verhalten des hMSH6-Gens in diesem Kontext.

5.4 hMSH2 und das Dimermodell

Das hervorstechendste Merkmal dieser Gruppe ist in unserem Material natürlich die Rezidivneigung. Die zwei hMSH2-/hMSH6- Patientinnen entwickelten im postoperativen Verlauf Rezidive. Die dritte Patientin mit einem MSH2-MSH6 negativen Tumor wurde mit vaginalen Blutungen auffällig und ist an einem Gebärmutterpolyp operiert worden. Bei der histologischen Beurteilung fand sich ein Endometriumkarzinom im Stadium pT1a N0 M0. Ob sie bei der Diagnose in einem fortgeschrittenerem Stadium ein Rezidiv entwickelt hätte, wäre natürlich vom großen wissenschaftlichen Interesse.

Ob es nur an der MSH2-Expressionsstörung liegt, oder ob das zusätzliche MSH6-Defizit diese Störung bedingt, kann man anhand unseres Materials nur zum Teil beantworten.

Seitdem die MSH2-MSH6 und MSH2-MSH3 Heterodimere beschrieben und Modelle zu ihrer Funktion in der Mismatch-Repair-Kaskade ausgearbeitet wurden, interessieren sich immer mehr Forscher für die Bedeutung der einzelnen Gene, die Ausfälle und ihre klinischen Folgen. Die Expressionsprodukte der MSH2 und MSH6 Gene bilden entsprechend dem bakteriellen MutSalpha einen Komplex, der eine große Rolle in der Erkennung der DNA-Mismatches und der Initialisierung der Reparaturprozesse spielt (Jirichny J. EMBO 1998; 17;6427-36 und Nat Genet 2000; 24; 6-9). Besonders sensitiv reagiert dieses System auf Basenfehlpaarungen, Deletionen und Insertionen. Außerdem kommt es zur Bildung eines Heterodimers zwischen MSH2 und MSH3, der als Homolog zum bakteriellen MutSbeta zu verstehen ist und überwiegend die Reparatur von Frameshift-Mutationen einleitet.

Ein Ausfall des MSH2-Gens ist viel schwerwiegender als der isolierte MSH6 oder MSH3 Defizit, weil dann beide Komplexe wirkungslos sind und die Zelle Frameshift- und Missense-Mutationen in einer hohen Anzahl akkumuliert .

Die Funktion des MSH2-MSH6-Komplexes insbesondere im Bereich der Reparatur von Insertionen und Deletionen kann bei einer Störung vom MSH2-MSH3-Dimer zum Teil übernommen werden. Die dabei nicht abgedeckten Missense-Mutationen reichern sich aber weiterhin an. Diese Mechanismen haben eine unmittelbare Auswirkung auf das Mikrosatelliteninstabilitätsverhalten der beiden Genotypen. Während die hMSH2-Mutationen meistens zu einer ausgeprägten Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high) führen, verursacht ein hMSH6-Defizit oft eine geringe MSI (MSI-low) in den langen Mononukleotidsequenzen, die sich häufig nur mittels PCR-Amplifikation der Mononukleotidrepeatmarker erfassen läßt.

Auch das Dimermodell erklärt das Phänomen der Rezidivneigung in unserer Studie in keiner Weise, weil beim Ausfall der hMSH2-Komponente das Heterodimer bereits inaktiv ist und eine weitere Funktionsbeeinträchtigung nicht denkbar wäre, es sei denn der hMSH6-Protein hat weitere vom Heterodimer unabhängige Aufgaben.

Es liegt kein einziges Rezidiv bei isolierter MSH6-Störung in unseren Daten vor und auch der MSH6- und MLH1-negative Tumor ist unauffällig.

Aus der Literatur läßt sich eindeutig eine bessere Prognose bei den HNPCC-Tumoren feststellen. Dies könnte die begleitende lymphozytäre Infiltration zum Teil erklären. Erstens ist eine rein physische Wirkung denkbar: die Größenzunahme durch die entzündliche Komponente und somit von vornherein überschätzte Tumorgröße mit der daraus folgenden aggressiveren Operationsplanung und Resektion. Zweitens könnten die vielen Lymphozyten Zeichen einer durch den Tumor induzierten Immunreaktion sein. Wobei auch die lokale Begrenzung des Tumors durch eine Metastasenhemmung in diesem Zusammenhang denkbar wäre. Über eine Neigung zu Lokalrezidiven wurde nicht berichtet.

Über die in unserem Material aufgetretene ausgeprägte Rezidivneigung bei kombinierter hMSH2/hMSH6-Störung konnten leider keine Berichte in der Literatur gefunden werden.

5.5 Die Immunhistochemie als Screeningmethode

Aus mehreren Studien, die mit dem gleichen Material die immunhistochemische Färbung und die Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse durchgeführt haben, geht hervor, daß alle Tumore mit einer Expressionsstörung eines der Mismatch-Repair-Enzyme auch Mikrosatelliteninstabilität zeigten. Daraus läßt sich ableiten, daß die Korrelation der Immunhistochemie mit MSI-Analyse eine sehr gute Spezifität zeigt. Die Sensitivität hängt dagegen von der Anzahl der getesteten Antikörper ab und beträgt bei Endometriumkarzinomen etwa 70 %, wenn die Expression der hMLH1 und hMSH2 Enzyme untersucht worden ist. Durch das Hinzufügen der aus vorangegangenen Ausführungen zweifellos wichtigen hMSH6-Analyse kann man diese Zahl sicherlich anheben und dann diese Dreierkombination als klinisches Screeningverfahren anwenden.

In der Studie von Park et al. wurden 62 Endometriumtumore untersucht, bei 21 Karzinomen konnte Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. Von diesen 21 waren in der Immunhistochemie 12 hMLH1 negativ und weitere 4 zeigten hMSH2-Defizit, das machte zusammen 76,2% aus. Fünf restliche Tumore wiesen regelrechte Expression der beiden MMR-Enzyme auf. Leider wurde keine hMSH6-Färbung durchgeführt. Kein einziges mikrosatellitenstabiles Karzinom war immunhistochemisch negativ.

Es gibt interessante Berichte über das relative Risiko bei einer hMSH2 beziehungsweise hMLH1 Mutation eine bestimmte Tumorart zu entwickeln. So lag zum Beispiel das Risiko für ein Endometriumkarzinom bei einer hMSH2 Mutation bei 62% im Gegensatz zu 42% bei hMLH1 (Vasen et al, Cancer Risk in Families with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Diagnosed by Mutation Analysis, Gastroenterology, Vol. 110, 1996, 1020-27). Unsere Daten stehen auf den ersten Blick im absoluten Widerspruch dazu. Wenn man jedoch die Hypermethylierungstheorie berücksichtigt, dann kann dieser Widerspruch auf die „Blindheit“ der Immunhistochemie in Bezug auf die Ursache der Expressionsstörung zurückgeführt werden.

5.6 Managementbesonderheiten bei den HNPCC-Patientinnen

Im Gegensatz zu Colon und Magen ist die Gebärmutter den endoskopischen Untersuchungsverfahren nicht zugänglich, was die Frage nach einer effektiven Screeningmethode aufwirft, die sich für Prävention, Diagnostik und zugleich für die Nachuntersuchungen eignet. Der transabdominale und intravaginale Ultraschall erlaubt zwar die Beurteilung der Morphologie der Organe und Lymphknoten in Beckenbereich, verfügt aber nicht über die Möglichkeit der Endoskopie, die Strukturen visuell zu beurteilen und die suspekten Stellen gezielt zu biopsieren. Um Gewebeproben zu entnehmen, bedarf es einer fraktionierten Abrasio. Da diese Methode invasiv und nicht unbegrenzt oft durchführbar ist, bleibt sie eher der diagnostischen Abklärung vorbehalten. Wegen dem hohen Risiko einer Mutationsträgerin im Laufe ihres Lebens ein Endometriumkarzinom zu entwickeln, sollte bei einem bereits aufgetretenen Kolonkarzinom im gleichen Eingriff die Hysterektomie und die bilaterale Salpingo-Oophorektomie vorgenommen werden (Lynch H.T., Smyrk T., Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, Cancer, Sept 15, 1996 , Vol 78 , Num 6, 1149-64). Die prophylaktische Hysterektomie konnte sich noch nicht etablieren, es fehlen noch die Langzeitergebnisse, um den therapeutischen Benefit dieser Methode abzuschätzen. Da es sich um ein Reproduktionsorgan handelt, bedarf es einer besonderen Feinfühligkeit bei der Patientenaufklärung und gegebenenfalls Festlegung des Zeitpunktes des operativen Eingriffs in bezug auf den Kinderwunsch. Nach Abschluß der Familienplanung kann dann die elektive Hysterektomie und die bilaterale Salpingo-Oophorektomie erfolgen mit anschließender sorgfältigen histologischen Beurteilung des Präparates.

Um den in unserer Zeit üblichen Kleinfamilien und der hohen Mobilität der Bevölkerung mit dem daraus folgenden Scheitern an den Amsterdamer Kriterien Rechnung zu tragen, wurde der Begriff der HNPCC-like Familien geprägt. Führt man in diesem Patientengut eine Mutationssuche durch, so läßt sich nur in 8% bis 30% der Fälle eine Störung nachweisen. Da eine tumorpositive Familienanamnese sich in nur 12% aller in den Färbungen negativen Tumoren nachweisen lies und eine Neumutation im Gegensatz zu FAP ein seltenes Ereignis darstellt, liegt die Vermutung nahe, es handele sich entweder um die Methylierung in der Promotorregion oder um weitere uns noch unbekannte Gene.

5.7 Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse zeigen etwa den gleichen Anteil an den Expressionsstörungen für hMLH1 und hMSH6 bei den sporadischen Endometriumkarzinomen mit jeweils 11,7% und 10%, während die hMSH2-defizitären Tumoren nur 2,5% des Gesamtkollektivs ausmachten. Außerdem wiesen alle hMSH2-negative Karzinome gleichzeitig auch hMSH6-Störungen auf. Ob es sich um echte Mutationen oder um die Methylierung in der Promoterregion handelt, muß mittels Gensequenzierung noch untersucht werden. An dieser Stelle ist ein Hinweis angebracht.

Auch bei klinisch eindeutigen HNPCC- Familien bleibt die Mutationssuche häufig erfolglos. Den unterschiedlichen Studien nach sind Mutationen bei den die Amsterdamer Kriterien erfüllenden Familien in 45% bis 86% der Fälle nachweisbar. Meistens wurden die Patienten nur für hMLH1 und hMSH2 getestet, beim Zufügen des PMS1- und PMS2-Screenings erreicht man jedoch bei etwa 70% der Betroffenen einen Mutationsnachweis. Durch hMSH6-Screening, insbesondere bei weiblichen Familienmitgliedern, ist dieser Anteil sicherlich noch zu steigern.

Diese Ergebnisse unterstreichen noch mal die hohe Aussagekraft der Immunhistochemie als Screeningmethode beim Verdacht auf HNPCC-induzierte Endometriumkarzinome.

Da in unserer Gruppe der unter fünfzigjährigen Patientinnen 44,4% der Tumoren immunhistochemisch negativ waren, ist aus unserer Sicht eine systematische routinemäßige Expressionsanalyse in diesem Hochrisikokollektiv neben ausführlicher Familienanamnese auf jeden Fall empfehlenswert.

6.0 Auswertungsschlüssel

1. Patho-Nr.

2. Name

3. Vorname

4. Geburtsdatum

5. Datum der stationären Aufnahme

6. Menopausenstatus:

1. keine Information

2. prämenopausal

3. postmenopausal

7. Familiäre Belastung:

1. keine Information

2. keine familiäre Belastung

3. Mamma-Ca

4. Endometrium-Ca

5. Zervix-Ca

6. Ovarial-Ca

7 .anderes Ca

8. Hyperplasien:

1. keine Information

2. keine Hyperplasie

3. adenomatöse Hyperplasie I

4. adenomatöse Hyperplasie II

5. adenomatöse Hyperplasie III

6. gland.-zystische Hyperplasie

9. Vormalignome:

1. keine Information
2. keine Vormalignome
3. Mamma-Ca
4. Zervix-Ca
5. Ovarial-Ca
6. anderes Ca

10. Hormontherapie:

1. keine Information
2. keine Hormontherapie
3. Ovulationshemmer
4. Gestagene
5. Oestrogensubstitution
6. Tamoxifen
7. Aromatasehemmer
8. GnRH-Analoga
9. andere Hormontherapie

11. OP I:

1. keine Information
2. keine OP
3. fraktionierte Abrasio/HSK
4. TAH/BSO
5. THO/BSO/iliak. LK
6. THO/BSO/paraaort. LK
7. TAH/BSO/iliak. und paraaort. LK
8. nur iliak. LK
9. nur paraaort.LK

12. Patho-Nr.

13. OP-Datum

14. Histotyp:

1. keine Information
2. Normalgewebe
3. endometriales Ca
4. adenom. Hyperplasie I
5. adenom. Hyperplasie II
6. adenom. Hyperplasie III
7. glanduläres Adeno-Ca
8. glandulär-papiläres Adeno-Ca
9. sekretor. Adeno-Ca
10. solides Adeno-Ca
11. Adeno-Ca mit Plattenepithel-Metaplasie
12. Adenokankroid
13. Adenosquamöses Ca
14. klarzelliges Adeno-Ca
15. serös-pap. Adeno-Ca
16. Plattenepithel-Ca
17. Sarkom
18. Chorion-Ca

15. OP II:

1. keine Information
2. keine OP
3. fraktionierte Abrasio/HSK
4. TAH/BSO
5. THO/BSO/iliak. LK
6. THO/BSO/paraaort. LK
7. TAH/BSO/iliak. und paraaort. LK
8. nur iliak. LK
9. nur paraaort.LK

16. Patho-Nr.

17. OP-Datum

18. Histotyp:

1. keine Information
2. Normalgewebe
3. endometriales Ca
4. adenom. Hyperplasie I
5. adenom. Hyperplasie II
6. adenom. Hyperplasie III
7. glanduläres Adeno-Ca
8. glandulär-papiläres Adeno-Ca
9. sekretor. Adeno-Ca
10. solides Adeno-Ca
11. Adeno-Ca mit Plattenepithel-Metaplasie
12. Adenokankroid
13. Adenosquamöses Ca
14. klarzelliges Adeno-Ca
15. serös-pap. Adeno-Ca
16. Plattenepithel-Ca
17. Sarkom
18. Chorion-Ca

19. Lymphknotenstatus:

1. keine Information
2. kein Befall
3. iliakaler LK-Befall
4. paraaortaler LK-Befall
5. iliakaler und paraaortaler LK-Befall

20. FIGO

1. keine Information
2. I A
3. I B
4. I C
5. II A
6. II B
7. III A
8. III B
9. III C
10. IV A
11. IV B

21. Grading:

1. keine Information
2. Grad 1
3. Grad 2
4. Grad 3

22. pT:

1. keine Information
2. pT 1
3. pT 2
4. pT 3
5. pT 4

23. pN:

1. keine Information
2. pN0
3. pN1
4. pN2
5. nicht operiert

24. pM:

1. keine Information
2. pM0
3. pM1

25. Fernmetastasen:

1. keine Information
2. keine Metastasen
3. Hautmetastasen
4. Skelettmastasen
5. Lungen-/Pleurametastasen
6. Mammametastasen
7. ZNS-Metastasen
8. Ovar-Metastasen
9. Peritonealmetastasen
10. Magen-Darm-Metastasen
11. Sonstige Metastasen

28. Adjuvante Therapie:

1. keine Information
2. keine adjuvante Therapie
3. Radiatio
4. Hormontherapie
5. Chemotherapie

32. Rezidiv-Lokalisation:

1. keine Information
2. kein Rezidiv
3. Becken/Uterus
4. ing./paraaort. LK
5. Skelett
6. ZNS
7. Ovar
8. Peritoneum

9. Leber
10. GIT
11. Lokal: Vagina
12. Sonstiges

33. Rezidiv-Therapie:

1. keine Information
2. keine Therapie
3. OP
4. Radiatio
5. Chemotherapie
6. OP und Radiatio
7. OP und Chemotherapie
8. Radiatio und Chemotherapie
9. andere Therapien

37. Endstatus:

1. keine Information
2. Lost to follow-up
3. Vollremission
4. Rezidiv
5. verstorben an diesem Ca
6. verstorben an anderer Ursache
7. verstorben an anderem Ca
8. Zweittumor entwickelt, lebend

38. Follow-up in Monaten

39. Rezeptorstatus für ER/PR:

1. negativ
2. positiv < 20%+
3. positiv > 20%++
4. keine Information, da Gewebe abgeschwommen

40. hMLH1

0. negativ
1. 0-5 % positiver Zellen

2. 5-25% positiver Zellen
3. 25-50% positiver Zellen
4. 50-75% positiver Zellen
5. 75-100% positiver Zellen

41. hMSH2

0. negativ
1. 0-5 % positiver Zellen
2. 5-25% positiver Zellen
3. 25-50% positiver Zellen
4. 50-75% positiver Zellen
5. 75-100% positiver Zellen

42. hMSH6

0. negativ
1. 0-5 % positiver Zellen
2. 5-25% positiver Zellen
3. 25-50% positiver Zellen
4. 50-75% positiver Zellen
5. 75-100% positiver Zellen

7.0 Literaturquellenkatalog

1. Aaltonen Lauri A., Reijo Salovaara, Paula Kristo, Federico Canzian, Akseli Hemminki, Päivi Peltomäki, Robert B.Chadwick, Helena Kääriäinen, Matti Eskelinen, Heikki Järvinen, Jukk-Pekka Mecklin, and Albert de la Chapelle, Incidence of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and the Feasibility of Molecular Screening for the Disease, *The New England Journal of Medicine*, Vol.338, May 21, 1998, 1481-87
2. Aarnio Markku, Jukka-Pekka Mecklin, Lauri A. Aaltonen, Minna Nyström-Lahti, and Heikki J. Järvinen, Life-Time Risk of Different Cancers in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome, *International Journal of Cancer*, Vol. 64, 1995, 430-433
3. Alberts David S., Martin Lipkin, and Bernard Lewin, Genetic Screening for Colorectal Cancer and Intervention, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 62-63
4. Anwar S., C. Hall, J. White, M. Deakin, W. Farell and J. B. Elder, Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: An Update Review, *European Journal of Surgical Oncology*, Vol. 26, 2000, 635-45
5. Arzimanoglou Iordanis I., Tom Lallas, Michael Osborne, Hugh Barber and Fred Gilbert, Microsatellite Instability Differences Between Familial and Sporadic Ovarian Cancers, *Carcinogenesis*, Vol.17, 1996, 1799-1804
6. Boland C. Richard, Roles of the DANN Mismatch Repair Genes in Colorectal Tumorigenesis, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 47-49
7. Brown Martin L. and Larry G. Kessler, Use of Gene Tests to Detect Hereditary Predisposition to Cancer: What Do We KNOW About Cost Effectiveness?, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 55-57

8. Bubb Vivien J., Lucy J Curtis, Christopher Cunningham, Malcolm G. Dunlop, Andrew D. Caothers, Robert G. Morris, Susan White, Colin C. Bird, and Andrew H. Wyllie, Microsatellite Instability and the Role of hMSH2 in Sporadic Colorectal Cancer, *Oncogene*, Vol. 12, 1996,2641-49
9. Burks R. Tucker, Theodore D. Kesis, Kathleen R. Cho and Lora Hedrick, Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma, *Oncogene*, Vol. 9, 1994, 1163-66
10. Burt Randall W., Familial Risk and Colon Cancer, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 44-46
11. Caduff Rosmarie F., Suzette M. Svoboda-Newman, Rene E. Bartos, Amy W. Ferguson, and Thomas S. Frank, Comparative Analysis of Histologic Homologues of Endometrial and Ovarian Carcinoma, *The American Journal of Surgical Pathology*, Vol. 22(3), 1998, 319-26
12. de Wind Niels, Marleen Dekker, Nanna Claij, Leon Jansen, Yvonne van Klink, Miroslav Radman, Greg Riggins, Martin van der Valk, Karin van't Wout and Hein te Riele, HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of MSH3 and MSH6 mismatch-repair proteon functions, *Nature Genetics*, Vol. 23, November 1999, 359-363
13. Duckett Derek R., Bronstein S. Maynard, Yoichi Taya, and Paul Modrich, hMutSa- and HmutLa-dependent Phosphorylation of P53 in Response to DNA Methylator Damage, *PNAS*, Vol 96, October 26, 1999, 12384-88
14. Edelman Winfried, Asad Umar, Kann Yang, Joerg Heyer, Melanie Kucherlapati, Marie Lia, Burkhard Kneitz, Elena Avdievich, Kunhua Fan, Edmund Wong, Gray Crouse, Thomas Kunkel, Martin Lipkin, Richard D. Kolodner, and Raju Kucherpalati, The DNA Mismatch Repair Genes MSH3 and MSH6 Cooperate in Intestinal Tumor Supression, *Cancer Research*, Vol 60, February 15, 2000, 803-07

15. Evans-Metcalf Elaine R., Sandra Brooks, Frank R. Reale, and Stephen P. Baker, Profile of Women 45 Years of Age and Younger With Endometrial Cancer, *Obstetrics & Gynecology*, Vol. 91, March 1998, 349-54
16. Fleisher A. Steven, Esteller Manel, Noam Harpaz, Anatoly Leytin, Asma Rashid, Yan Xu, Jing Liarig, O. Colin Stine, ing Yin, Tong-Tong Zou, John M. Abraham, Dehe Kong, Keith T. Wilson, Stephen P. James, James G. Herman, and Stephen J. Meltzer
Mikrosatellite Instability in Inflammatory Bowel Disease-associated Neoplastik Lesions Is Associated with Hypermethylation and Diminished Expression of the DNA Mismatch Repair Gene, hMLH1, *Cancer Research* 60, 4864-4868, September 1, 2000
17. Gitsch Gerald, Hanzal Engelbert, Debra Jensen, and Neville F. Hacker, Endometrial Cancer in Premenopausal Women 45 Years and Younger, *Obstetrics & Gynecology*, Vol. 85, April 1995, 504-08
18. Glaab Warren E., John I. Risinger, Asad Umar, J. Carl Barrett, Thomas A. Kunkel and Kenneth R. Tindall, Resistance to 6-thioguanine in Mismatch Repair-deficient Human Cancer Cell Lines Correlates with an Increase in Induced Mutations at the HPRT Locus,
19. Gleeson Catherine M., James M. Sloan, James A. McGuigan, Andrew J. Ritchie, James L. Weber, and Hilary Russel, Widespread Microsatellite Instability Occurs Infrequently in Adenocarcinoma of the Gastric Cardia, *Oncogene*, Vol. 12, 1996, 1653-62
20. Gurin Cheryl C., Mark G. Federici, Lan Kang, and Jeff Boyd, Causes and Consequences of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma, *Cancer Research*, Vol. 59, January 15, 1999, 462-66
21. Hakala T., J.-P. Mecklin, M. Forss, H. Järvinen, and P. Lehtovirta, Endometrial Carcinoma in the Cancer Family Syndrome, *Cancer*, Vol. 68, October 1, 1991, 1656-59

22. Hellnad Aslaug, Anne-Liese Borresen-Dale, Päivi Peltomäki, Merete Hektoen, Gunnar B. Kristensen, Jahn M. Nesland, Albert de la Chapelle and Ragnhild A. Lothe, Microsatellite Instability in Cervical and Endometrial Carcinomas, *International Journal of Cancer*, Vol.70, 1997, 499-501
23. Kolodner Richard D., Jessica D. Tytell, James L. Schmeits, Michael F. Kane, Ruchira Das Gupta, John Weger, Siobhan Wahlberg, Edward A. Fox, David Peel, Judi E. Garber, Sapna Syngal, Hoda Anton-Culver, and Frederick P. Li, Germline MSH6 Mutations in Colorectal Cancer Families, *Cancer Research*, Vol. 59 October 15, 1999, 5068-74
24. Lagarde Alain E. and Hartley S. Stern, Genetic Pre-Disposition to Colorectal Cancer: Initiation of a Prospective Study in Eastern Ontario, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 68-70
25. Lehrman Caryn, John Marshall, Janet Audrain, and Andres Gomez-Caminero, Genetic Testing for Colon Cancer Susceptibility: Anticipated Reactions of Patients and Challenges to Providers, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 58-61
26. Lim Peter C., David Tester, William Cliby, Steven C. Ziesmer, Patrick C. Roche, Evnn Hartmann, Steven N. Thibodeau, Karl C. Podratz, and Robert B. Jenkins, Absence of Mutations in DNA Mismatch Repair Genes in Sporadic Endometrial Tumors with Microsatellite Instability, *Clinical Cancer Research*, Vol. 2, November 1996, 1907-11
27. Lipkin Martin, Strategies for Intervention with Chemopreventive Agents, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 64-67
28. Luce Michael C., Cameron G. Binnie, Matthew C. Cayouette, and Lauren N.W. Kam-Morgan, Identification of DNA Mismatch Repair Gene Mutations in Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Patients, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 50-52
29. Lynch H.T., Smyrk T., Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Cancer*, Sept 15, 1996, Vol 78, Num 6, 1149-64

30. Lynch H.T., Smyrk T., Jane F. Lynch, Overview of Natural History, Pathology, Molecular Genetics and Management of HNPCC (Lynch Syndrome), *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 38-43
31. Lynch H.T., Smyrk T., Jane F. Lynch, Molecular Genetics and Clinical-Pathology Features of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma (Lynch Syndrome), *Oncology*, Vol. 55, 1998, 103-108
32. Mecklin J.P., Heikki Järvinen, Tumor Spectrum in Cancer Family Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), *Cancer*, Vol. 68, September 1, 1991, 1109-12
33. Petersen Gloria M., Genetic Counseling and Predictive Testing for Colorectal Cancer Risk, *International Journal of Cancer*, Vol. 69, 1996, 53-54
34. Piero Benatti, Romano Sassatelli, Luca Roncucci, Monica Pedroni, Rosella Fante, Carmela Di Grerorio, Lorena Losi, Roberta Gelmini and Maurizio Ponz de Leon, Tumor Spectrum in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) and in Families with „Suspected HNPCC“. A Population-Based Study in Northern Italy, *International Journal of Cancer*, Vol. 54, 1993, 371-77
35. Ponz de Leon Maurizio, Piero Benatti, Monica Pedroni, Romano Sassatelli and Luca Roncucci, Risk of Cancer Revealed by Follow-up of Families with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: A Population-Based Study, *International Journal of Cancer*, Vol. 55, 1993, 202-207
36. Raedle Jochen, Angela Brieger, Jörg Trojan, Günter Herrmann, Stefan Zeuzem, Rapid Microsatellite Analysis of Paraffin Embedded Tumor Specimens from Patients with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 51, 1998, 621-22
37. Risiner John I., Andrew Berchuck, Matthew F. Kohler, Patrice Watson, Henry T. Lynch, and Jeff Boyd, Genetic Instability of Microsatellites in Endometrial Carcinoma, *Cancer Research*, Vol.53, 1993, 5100-03

38. Rüschoff Josef, Sabine Wallinger, Wolfgang Dietmaier, Tina Bocker, Gero Brockhoff, Ferdinand Hofstädter, and Richard Fashel, Aspirin Suppresses The Mutator Phenotype Associated with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer by Genetic Selection, *Genetics*, Vol. 95, September 1998, 11301-06
39. Sandles Lisa G., Lee P. Shulman, Sherman Elias, Guy J Photopoulos, Linda M. Smiley, William M. Posten, and Joe Leigh Simpson, Endometrial Adenocarcinoma: Genetic Analysis Suggesting Heritable Site-Specific Uterine Cancer, *Gynecologic Oncology*, Vol. 47, 1992, 167-71
40. Sirchia Sylvia Maria, Sara Pariani, Franca Rosella, Isabella Garagiola, Chiara De Andreis, Gaetano Bulfamante, Elena Zannoni, Umberto Radaelli, and Giuseppe Simoni, Cytogenetic Abnormalities and Microsatellite Instability in Endometrial Adenocarcinoma, *Cancer Genetic Cytogenetic*, Vol. 94, 1997, 113-19
41. Suomi Raila, Tiina Hakala-Ala-Pietilä, Arto Leminen, Jukka-Pekka Mecklin, and Pentti Lehtovirta, Hereditary Aspects of Endometrial Adenocarcinoma, *International Journal of Cancer*, Vol. 62, 1995, 132-37
42. Vasen Hans F.A., G. Johan, A. Offerhaus, Frieda C.A. den Hartog Jager, Fred H. Menko, Fokko M. Nagengast, Gerrit Griffioen, Ruud B. van Hogezaand and A. Peter M. Heintz, Tumor Spectrum in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: A Study of 24 Kindreds in the Netherlands, *International Journal of Cancer*, Vol. 46, 1990, 31-34
43. Vasen Hans F.A, Juul Th. Wijnen, Fred H. Menko, Jan H. Kleibeuker, Babs G. Taal, Gerrit Griffioen, Fokko M. Nagengast, E. Hanne Meijers-Heijboer, Lucio Bertario, L. Varesco, Marie-Loise Bisgaard, Jan Mohr, Ricardo Fodde, and P. Meera Khan, Cancer Risk in Families with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Diagnosed by Mutation Analysis, *Gastroenterology*, Vol. 110, 1996, 1020-27

44. Verma Loveena, Michael F. Kane, Cecilia Brassett, James Schmeits, D. Gareth R. Evans, Richard D. Kolodner, Eamonn R. Maher, Mononukleotide Mikrosatellite Instability and Germline MSH6 Mutation Analysis in Early Onset Colorectal Cancer, *Journal of Medical Genetics*, Vol. 36, 1999, 678-82
45. Watson Patrice, and Henry T. Lynch, Extracolonic Cancer in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *Cancer*, Vol. 71, February 1, 1993, 677-85
46. Watson Patrice, Hans F.A. Vasen, J.P. Mecklin, Heikki Järvinen, Henry T. Lynch, The Risk of Endometrial Cancer in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, *The American Journal of Medicine*, Vol. 96, 1994, 516-20
47. Whitehouse Adrian, Graham R. Taylor, Jayne Deeble, Simon E.V. Philips, David M. Meredith, and Alexander F. Markham, A Carboxy Terminal Domain of the hMSH-2 Gene Product Is Sufficient for Binding Specific Mismatched Oligonucleotides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 225, 1996, 289-95
48. Wijnen Juul, Wiljo de Leeuw, Hans Vasen, Heleen van der Klift, Pal Moller, Astrid Stormorken, Hanne Meijers-Heijboer, Sandra Vossen, Gabriela Möslein, Carli Tops, Annette Bröcker-Vriends, Ying Wu, Robert Hofstra, Rolf Sijmons, Cees Cornelisse, Hans Morreau and Riccardo Fodde, Familial Endometrial Cancer in Female Carriers of MSH6 Germline Mutations, *Nature Genetics*, Vol 23, October 1999, 142-144
49. Wu Ying, Maran J. W. Berends, Rob G. J. Mensink, Claudia Kempinga, Rolf H. Sijmons, Ate G. J. van der Zee, Harry Hollema, Jan H. Kleibeuker, Charles H. C. M. Buys, and Robert M. W. Hofstra, Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-Related Tumors Displaying Low Mikrosatellite Instability with MSH6 Germline Mutations, *American Journal of Human Genetics*, Vol. 65, 1999, 1291-98
50. Shenson David L., Holly H. Gallion, Deborah E. Powell, and Maura Pieretti, Loss of Heterozygosity and Genomic Instability in Synchronous Endometrioid Tumors of the Ovary and Endometrium, *Cancer*, Vol. 76, August 15, 1995, 650-57

51. Sheu B.-C., H.-H. Lin, C.-K. Chen, K.-H. Chao, C.-T. Shun, S.-C. Huang, Synchronous Primary Carcinomas of the Endometrium and Ovary, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, Vol. 51, 1995, 141-46

Die Expressionsanalyse der Mismatch-Repair-Enzyme **hMLH1**, **hMSH2** und **hMSH6** in unselektionierten Endometriumkarzinomen

Abstract

HNPCC (Hereditäres Nicht-Polypöses Kolorektales Syndrom): Das Syndrom der defekten Mismatch-Reparatur-Gene hMLH1, hMSH2 und hMSH6.

Die Erstbeschreibung des Syndroms geht auf Aldred Warthin zurück, der im Jahr 1895 die Familie G* mit auffallender Häufung an Magen-, Colon- und Endometriumkarzinomen beschrieb. Im Rahmen des HNPCC-Syndroms kommen die Endometriumkarzinome bei etwa 10% aller Betroffenen vor und treten bei weiblichen Patienten in 20-30% der Fälle auf, was sie nach kolorektalen Karzinomen zur zweithäufigsten Tumorentität bei diesem familiären Leiden werden läßt. Bei nachgewiesener hMSH6-Mutation entwickeln 70% der Patientinnen ein Endometriumkarzinom.

Unsere Ergebnisse zeigen etwa den gleichen Anteil an den Expressionsstörungen für hMLH1 und hMSH6 bei den sporadischen Endometriumkarzinomen mit jeweils 11,7% und 10%, während die hMSH2-defizitären Tumoren nur 2,5% des Gesamtkollektivs ausmachten.

Außerdem wiesen alle hMSH2-negative Karzinome gleichzeitig auch hMSH6-Störungen auf.

Den unterschiedlichen Studien nach sind Mutationen bei den die Amsterdamer Kriterien erfüllenden Familien in 45% bis 86% der Fälle nachweisbar. Meistens wurden die Patienten nur für hMLH1 und hMSH2 getestet, beim Zufügen des PMS1- und PMS2-

Screenings erreicht man jedoch bei etwa 70% der Betroffenen einen Mutationsnachweis.

Durch hMSH6-Screening ist dieser Anteil sicherlich noch zu steigern.

Diese Ergebnisse unterstreichen noch mal die hohe Aussagekraft der Immunhistochemie als Screeningmethode beim Verdacht auf HNPCC-induzierte Endometriumkarzinome.

Da in unserer Gruppe der unter fünfzigjährigen Patientinnen 44,4% der Tumoren immunhistochemisch negativ waren und Screening für Uterusmalignome noch nicht ausgereift sind, ist aus unserer Sicht eine systematische routinemäßige Expressionsanalyse in diesem Hochrisikokollektiv neben ausführlicher Familienanamnese auf jeden Fall empfehlenswert.

Lebenslauf

Personalien

Vorname: Andreas
Name: Röhrig
Geburtsdatum: 16.05.1972
Geburtsort: Celinograd / Kasachstan
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet seit 25.02.1997
Kinder: 1 Kind geb. 08.09.1997
Religion: evangelisch

Schulbildung:

1979-1987 Allgemeine Mittelschule in Atbasar
Abschluß: Zeugnis

Ausbildung:

1987-1991 Krankenpflegerschule in Atbasar mit simultanem Erwerb der Hochschulreife
Abschluß: Diplom mit Auszeichnung (Note 1.0)

1991 Auswanderung nach Deutschland als Spätaussiedler

1992 Sprachkurs bei Otto-Benecke-Stiftung in Anrath (Note 1.0)

1992-1994 Eichendorff-Studienkolleg in Geilenkirchen
Abschluß: Abitur (Note 1.3)

1994 –2000 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2000-2001 AiP in der neurochirurgischen Klinik
Duisburg-Wedau

2002 Assistenzarzt in der neurochirurgischen
Klinik HHU Düsseldorf

Hobbies: Sport (Schach, Konditions -
training, Schießen), Lesen, Werken

