

Aus der Klinik
für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Wolfram Knoefel

**Der Stellenwert der Immunhistochemie und
Mikrosatellitenanalyse als Prescreeningverfahren zur
Identifikation von Mutationen bei Hereditary Nonpolyposis
Colorectal Cancer (HNPCC)**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sandra Vossen-Holzenkamp

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez: Prof. Dr. Nürnberg
Dekan
Referent: Prof. Dr. Möslein
Korreferent: Prof. Dr. Poremba

Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei all denjenigen bedanken, die die vorliegende Promotionsarbeit ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. G. Möslein, die mir das Thema überlassen hat. Sie hat die Erstellung der Arbeit durch ihre immerwährende Unterstützung und gute Betreuung erst ermöglicht.

Die Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit verschiedenen Instituten. Zu besonderem Dank bin den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie unter der Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H. E. Gabbert, Dr. T. O. Goecke aus dem Institut für Humangenetik und den Mitarbeitern des humangenetischen Institutes der Universität Leiden unter der Leitung von Professor Dr. R. Fodde verpflichtet.

Der Stellenwert der Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse als Prescreeningverfahren zur Identifikation von Mutationen bei Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

1	Einleitung	3
1.1	Das Krankheitsbild und die Bedeutung der Mutationssuche für den Patienten.....	3
1.2	Angewendete Untersuchungsverfahren	7
1.2.1	Prescreening-Methoden.....	7
1.2.2	Southern Blot	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patienten.....	13
2.2	Mikrosatelliteninstabilität	13
2.3	Immunhistochemie.....	15
2.4	DGGE.....	16
2.5	Southern Blot	17
2.6	Sequenzierung.....	18
2.7	Einschätzung der Pathogenität der Mutation	18
3	Ergebnisse	20
3.1	Mikrosatelliteninstabilität	20
3.1.1	Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC) und der Sequenzanalyse für MSS Tumore	20
3.1.2	Ergebnisse der Immunhistochemie und der Sequenzanalyse für MSI-H Tumore	21
3.1.3	Positiv prädiktiver Wert und Sensitivität der Mikrosatellitenanalyse	22

3.2	Immunhistochemie.....	22
3.2.1	Ergebnisse der Immunhistochemie und der Mikrosatellitenanalyse..	24
3.2.2	Ergebnisse der Immunhistochemie und der Sequenzanalyse.....	24
3.2.3	Positiv prädiktiver Wert und Sensitivität der Immunhistochemie	25
3.3	DGGE.....	26
3.4	Southern Blot	26
3.5	Sequenzierung	28
3.5.1	Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Mikrosatellitenanalyse	28
3.5.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Immunhistochemie	29
4	Diskussion	33
4.1	Mutationsrate.....	33
4.2	Mutationen im Southern Blot.....	35
4.3	Mikrosatellitenanalyse	36
4.3.1	Technische Probleme der Mikrosatellitenanalyse.....	37
4.3.2	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse im Vergleich zur Literatur....	37
4.4	Immunhistochemie.....	38
4.4.1	Technische Probleme der Immunhistochemie	38
4.4.2	Verteilung der verminderten Proteinexpression auf die verschiedenen Genprodukte	39
4.4.3	Ergebnisse der Immunhistochemie im Vergleich zur Literatur	40
4.5	Mikrosatellitenanalyse und Immunhistochemie	41
4.6	Sequenzanalyse	42
4.7	Bewertung der Prescreeningverfahren und Vorschlag für einen Diagnosealgorithmus.....	42
5	Referenzen	46

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild und die Bedeutung der Mutationssuche für den Patienten

HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) ist das häufigste, heute bekannte Karzinomprädispositionssyndrom (1). Betroffene Patienten entwickeln vermehrt kolorektale Karzinome aber auch Endometriumkarzinome, Ovarialkarzinome, Dünndarmkarzinome und Urothelkarzinome u. a. Das Erkrankungsalter liegt ca. 20 Jahre niedriger als das für die organspezifischen sporadischen Karzinome. Kennzeichnend für das Syndrom ist die Multiplizität der Karzinome (2, 3). Die Allelfrequenz wird zwischen 1:200 und 1:2000 geschätzt. Die Vererbung folgt einem autosomal dominanten Vererbungsmuster. Man geht von einer Penetranz von ca. 70% bei Mutationsträgern aus (4).

Um die molekulare Grundlage von HNPCC identifizieren zu können, waren die klinisch-basierten sogenannten „Amsterdamer-Kriterien, die erstmals 1991 vorgeschlagen wurden (Amsterdam-Kriterien I) sehr hilfreich. Diese von der ICG-HNPCC (International Collaborative Group for HNPCC) formulierten Einschlusskriterien definieren, dass drei Familienmitglieder mit einem kolorektalen Karzinom betroffen sein müssen, einer dieser drei muss mit den beiden anderen erstgradig verwandt sein, sie müssen aus mindestens zwei Generationen stammen und einer der drei muss bei Diagnosestellung jünger als 50 Jahre alt sein. Außerdem sollte eine familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ausgeschlossen sein (5). Eine klinisch sinnvolle Erweiterung der Kriterien erfolgte, als auch neben den kolorektalen Karzinomen Endometriumkarzinome, Dünndarmkarzinome und Urothelkarzinome in die Definition mit eingeschlossen wurden (6, 7).

1997/ 2002 wurden in Ergänzung zu den Amsterdamer-Kriterien die sogenannten Bethesda-Kriterien formuliert (8). Sie definierten Patienten, die ein erhöhtes Risiko haben, an einem Karzinom auf dem Boden eines Mismatch Reparatur Defektes zu leiden, ohne zwangsläufig aus einer „Amsterdamer“-Familie zu stammen. Somit stellen die Bethesda-Kriterien die Basis dar für ein Erkennen der Tumore, die entsprechend auf eine Mikrosatelliteninstabilität untersucht werden sollten: 1. Kolorektale Karzinome von Patienten, die bei Diagnosestellung jünger als 50 Jahre sind. 2. Bei Vorkommen von synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinome

oder anderen HNPCC assoziierten Karzinomen unabhängig vom Lebensalter des Patienten. 3. Kolorektale Karzinome mit histologischen Merkmalen (Präsenz von tumor-infiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnliche Lymphozytenreaktion, muzinöse/ Siegelring-differenzierung, medulläres Wachstumsmuster), die für mikrosatelliteninstabile Tumore typisch sind, und der Patient jünger als 60 Jahre ist. 4. Kolorektale Karzinome bei Patienten, wenn sie einen oder mehrere erstgradig Verwandte haben, die auch einem kolorektalen Karzinom oder einem anderen HNPCC assoziierten Karzinom erkrankt sind und einer der Betroffenen jünger als 50 Jahre ist. 5. Kolorektale Karzinome bei Patienten, wenn sie einen oder mehrere erstgradig Verwandte haben, die auch einem kolorektalen Karzinom oder einem anderen HNPCC assoziierten Karzinom erkrankt sind, unabhängig vom Alter.

Seit einigen Jahren weiß man, dass zumindest bei einem Großteil der HNPCC-Familien ein Defekt im Mismatch Reparatur System für die Karzinomhäufung ursächlich verantwortlich ist. Während bei den Hefen 11 Proteine bekannt sind, die in diesem komplizierten System zusammenspielen, kennt man beim Menschen heute 6 Gene, die bei pathogenen genetischen Alterationen zu HNPCC führen: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, hMLH3. Bislang wurden die meisten Mutationen in den Genen hMSH2 und hMLH1 identifiziert. In ca. 50% aller Familien, die den Amsterdamer Kriterien genügen, hat man Mutationen im hMSH2- und hMLH1-Gen gefunden (9-12). In der jüngeren Vergangenheit hat man zunehmend krankheitsrelevante Mutationen in hMSH6, PMS und hMSH3 identifiziert (13). Offensichtlich unterscheidet sich der Phänotyp dieser Familien, so dass nicht so sehr die klinischen Merkmale, sondern vor allem die Durchführung der Immunhistochemie als Prescreening-Verfahren maßgeblich dazu beitragen konnte, diese Familien durch den entsprechenden Proteinverlust zu identifizieren (14, 15, 16, 17).

Seit der Entdeckung der am Mismatch-Reparatur-Systems beteiligten Gene können krankheitsverursachende genetische Alterationen identifiziert werden. Der Nachweis einer krankheitsverursachenden Mutation spielt für diese Indexperson einer Familie für die Risikoeinschätzung für weitere Karzinome keine so entscheidende Rolle, denn auch ohne Nachweis einer Mutation würde man stringente Vorsorgeempfehlungen formulieren im Sinne einer Vorsorge und Früherkennung. Allerdings spielt die Tatsache eines Mutationsnachweises für die genetisch

verwandten Personen eine entscheidende Rolle. Während die auf den Stammbaum basierende Risikoanalyse für Verwandte ersten Grades ein 50%-iges Risiko bedeutet, die Veranlagung geerbt zu haben, kann bei Kenntnis der genauen Mutation der Familie für jeden Verwandten sicher vorhergesagt werden, ob dieses Risiko 100% oder 0 beträgt. Es ist also eine sichere prädiktive molekulargenetische Untersuchung mit den weitreichenden Konsequenzen für die einzelne Person möglich. Beim Nachweis der krankheitsverursachenden Mutation wird für die Risikoperson das vermutete erhöhte Erkrankungsrisiko zur Gewissheit und die Motivation zur Wahrnehmung der Vorsorgeuntersuchungen kann (hoffentlich) erhöht werden. Falls die Mutation bei der Risikoperson nicht nachgewiesen wird, unterliegt diese Risikoperson nur dem durchschnittlichen Risiko der Normalbevölkerung, an einem kolorektalen oder anderem HNPCC-assoziierten Karzinom zu erkranken (18, 19).

Viele Aspekte von HNPCC sind bis heute ungeklärt. Es bleibt weiter herauszufinden, ob es eine Genotyp-/Phänotyp-Korrelation zwischen den unterschiedlichen Mutationen, den unterschiedlichen Genorten und den unterschiedlichen Phänotypen der Erkrankung gibt. Diese Frage ist sicherlich nur durch die Analyse einer großen Patientenzahl zu klären.

Die Mutationsanalyse ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Goldstandard der Mutationsanalyse ist die Sequenzierung von gDNA, da nur sie die Basenabfolge der verschiedenen Gene sichtbar macht. Es müssen die Exone der Gene einzeln oder manche Exone sogar in mehreren Teilabschnitten amplifiziert (16 Exone für hMSH2 und 19 Exone für hMLH1 und 10 Exone für hMSH6) und sequenziert werden.

Klinische Kriterien wie zum Beispiel die Amsterdamer Kriterien treffen eine Vorauswahl und selektionieren die Patienten, für die eine Mutationsanalyse empfohlen wird. Weitere Prescreening-Verfahren wären wünschenswert, vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass basierend auf den Amsterdam-Kriterien eine Mutationsdetektionsrate von nur ca. 50% erreicht wird. Unter den heute verwendeten Prescreening-Verfahren unterscheidet man zwischen denjenigen, die zu einer Reduzierung der insgesamt zu sequenzierenden Proben führen (Mikrosatelliteninstabilität) und denjenigen, durch die ein Genort identifiziert wird, in dem sich mit großer Wahrscheinlichkeit eine genetische Alteration durch Sequenzierung finden lassen wird (Immunhistochemie).

Ziel dieser Arbeit war es, die Prescreening-Verfahren in Korrelation zu setzen mit den Mutationsergebnissen, um einen Algorithmus zu entwickeln, durch die eine Ressourcenersparnis bei der Mutationsdetektion in HNPCC-Familien erreicht werden kann.

1.2 Angewendete Untersuchungsverfahren

1.2.1 Prescreening-Methoden

1.2.1.1 unspezifisch: Mikrosatelliteninstabilität

Im menschlichen Genom kommen repetitive Sequenzen von Nucleotiden (Mononucleotide, Dinucleotide etc.), sogenannte Mikrosatelliten, ubiquitär vor. Mikrosatelliten sind interindividuell unterschiedlich und werden in konstanter Länge von Zellgeneration zu Zellgeneration repliziert. So können sie auch beim Vaterschaftsnachweis oder in der Kriminalistik Anwendung finden.

Als Folge eines Mismatch Reparatur Defektes treten in den Tumoren Abweichungen im Vergleich zum Normalgewebe in diesen repetitiven Sequenzen auf. Meist sind es kurze Deletionen oder Insertionen. Sie sind Folge eines Frameshift-Fehlers und des mangelnden Vermögens des Mismatch Reparatur (MMR) Systems diesen Fehler zu korrigieren. Diese Replikationsfehler können durch die Analyse spezifischer PCR (Polymerase Chain Reaction)-Produkte nachgewiesen werden.

Tumore mit diesem Phänomen werden als mikrosatelliteninstabil bezeichnet (20). Die Mikrosatelliteninstabilität im Tumor wird durch einen entweder nur im Gewebe erworbenen Fehler des MMR-Systems (sporadische Tumore) oder durch Ausschaltung des gesunden Allels bei Patienten mit einer Keimbahnmutation im MMR-System (HNPCC-assoziierte Tumore) erklärt (21). HNPCC-Patienten, bei denen eine krankheitsrelevante Mutation im Mismatch Reparatur System nachgewiesen wurde, kann zu praktisch 100% eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumor nachgewiesen werden.

In der Literatur wird berichtet, dass 85-90 % der Tumore aus HNPCC-Familien nach Amsterdamer Kriterien mikrosatelliteninstabil sind (9, 22). So lässt sich der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität als Prescreeningverfahren nutzen, indem diese Untersuchung der Mutationsanalyse vorgeschaltet wird. Allerdings wird bei Mutationen in hMSH6 überraschenderweise in aller Regel nicht eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) nachgewiesen, sondern meist eine niedrige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L). Da hMSH6 funktionelle Übereinstimmungen mit

hMSH3 hat (23, 24), kann möglicherweise der Defekt im Mismatch Repair (MMR)-System im Tumor teilweise ausgeglichen werden. Als Indiz dafür entwickeln MSH6 knockout Mäuse Mikrosatelliten stabile Tumore (25).

Das Verfahren der Mikrosatellitenuntersuchung ist weltweit durch das sog. Bethesda-Panel standardisiert. Das Bethesda-Panels besteht aus fünf Markern, die zur Mikrosatellitenuntersuchung evaluiert und von der ICG-HNPCC empfohlen werden. (26). Es wird zwischen hoch instabilen (MSI-H: zwei und mehr Marker von 5 instabil), niedrig instabilen (MSI-L: nur in einem Marker instabil) und stabilen Tumoren (MSS: kein Marker instabil) unterschieden. Obwohl sich niedrig instabile Tumore in manchen Aspekten von stabilen Tumoren unterscheiden (höhere Rate an K-ras Mutationen und verminderte Expression von BCL-2 (27-29)), spielen hMLH1 und hMSH2 keine eindeutige Rolle für niedrig instabile Tumore (30, 31, 32).

Die Mikrosatellitenanalyse ist ein anerkanntes Prescreening Verfahren, das in einem Ringversuch validiert worden ist (32). Sie ist im Vergleich zu anderen Prescreeningverfahren relativ aufwendig und stößt besonders bei der Nutzung von Tumormaterial, das in Formalin fixiert und in Parafin eingebettet wurde, an methodische Grenzen. MSI ist nicht spezifisch für ein Gen, sondern zeigt den Defekt des gesamten MMR Systems an.

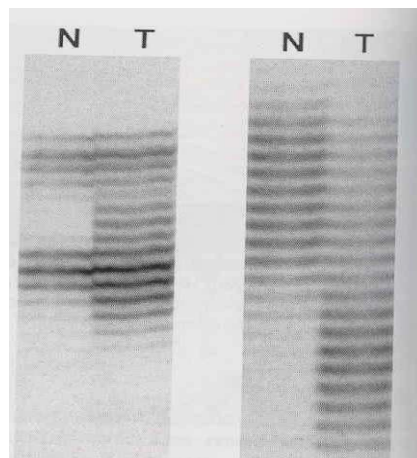
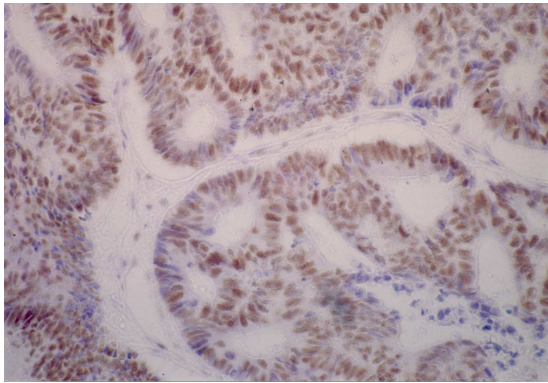


Abbildung 1: Beispiel Mikrosatelliteninstabilität,
N: Normalgewebe, T: Tumorgewebe
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Poremba,
Institut für Pathologie)

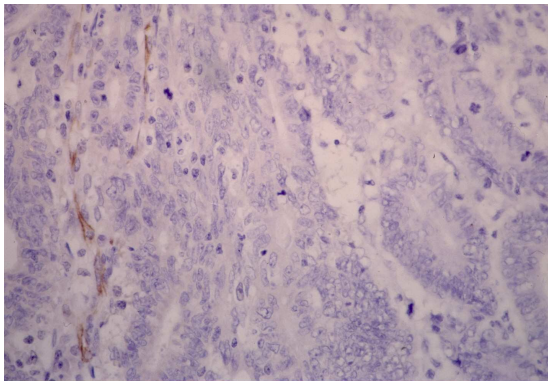
1.2.1.2 genspezifisch: Immunhistochemie

Ein genspezifisches Prescreeningverfahren ist der Nachweis der Veränderung der Proteinexpression im Tumor. Durch immunhistochemische Färbung können die Genprodukte der verschiedenen Gene des Mismatch Reparatur Systems nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Hierzu werden die Antikörper der unterschiedlichen Proteine (hMLH1, hMSH2, hMSH6) des Mismatch Reparatur Systems durch Färbung sichtbar gemacht. Der Verlust oder die Abschwächung der Färbung eines Proteins im Zellkern zeigt eine verminderte Expression dieses Proteins an und gibt damit Hinweis nicht nur auf einen Fehler im MMR-System sondern auch auf das von einer Mutation betroffene Gen. (33, 30, 34, 35). Eine schwedische Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass dieser Expressionsverlust bereits in Adenomen von Patienten aus HNPCC-Familien vorliegt (36).

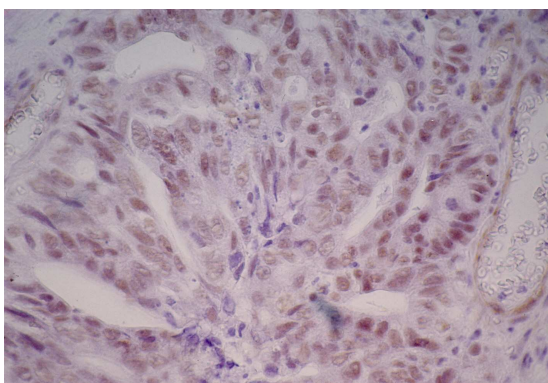
Die Proteine werden normalerweise in den Zellkernen der Zellen exprimiert, die ihre DNA reparieren. Das betrifft vor allem diejenigen Zellen, die aktiv proliferieren. In der Darmmucosa sind das besonders die basalen Epithelien der Darmkrypten (37). Es wird eine vergleichende Färbung von Tumorgewebe und von normalem Kolongewebe des gleichen Patienten vorgenommen. Reproduzierbarkeit der Labortechnik und der Interpretation des Färbeergebnisses sind in einem internationalen Ringversuch getestet. Die Studie konnte optimierte Versuchsbedingungen identifizieren und unter diesen eine hohe interinstitutionelle Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer hohen Spezifität und Sensitivität nachweisen (38). Der Aufwand einer immunhistochemischen Färbung ist im Vergleich zu den anderen in der vorliegenden Arbeit beschriebenen molekulargenetischen Prescreening-Verfahren deutlich niedriger. Die Immunhistochemie ist eine in der täglichen Routine der Pathologen fest verankerte Technik.



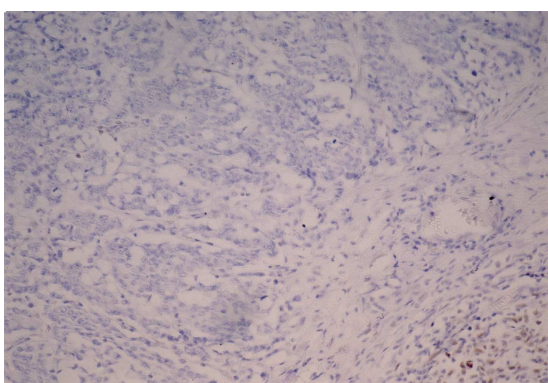
hMSH2: erhaltene Proteinexpression



hMSH2: verminderte Proteinexpression



hMLH1: erhaltene Proteinexpression



hMLH1: verminderte Proteinexpression

Abbildung 2: Beispiele von immunohistochemischen Färbungen
(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Katzer)

1.2.1.3 Genabschnittsspezifisch: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

In der DGGE werden PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese mit einem Gel, in dem das denaturierende Agens in einem Gradienten vorliegt, aufgetrennt. Wurden die DNA-Fragmente zuvor mit einem GC-Clamp versehen, werden sie auf dem Gradienten-Gel so aufgetrennt, dass der Unterschied in nur einem Basenpaar ein unterschiedliches Migrationsverhalten zur Folge hat (39).

Es werden die Exone der MMR-Gene mittels PCR multipliziert und mit einem GC-Clamp versehen und mit der DGGE aufgetrennt. So lassen sich Varianten zum Wildtyp einfach identifizieren (40, 41). Diese Varianten werden dann in der Sanger-Technik sequenziert und die genaue Basenveränderung der DNA festgestellt, um im Vergleich mit der Wildtyp-Sequenz Polymorphismen von krankheitsverursachenden Mutationen unterscheiden zu können.

Mit dieser Methode lassen sich also Genabschnitte identifizieren, die möglicherweise eine Mutation tragen. So muß eine direkte Sequenzierung nur von diesen Genabschnitten und nicht von den gesamten Genen erfolgen. Der Aufwand der direkten Sequenzierung wird verringert.

Die Methode der DGGE ist etabliert und hinreichend im Vergleich zur direkten Sequenzierung untersucht, so dass in der vorliegenden Arbeit die Mutationssuche für alle Patienten auf der Basis von DGGE erfolgt (40).

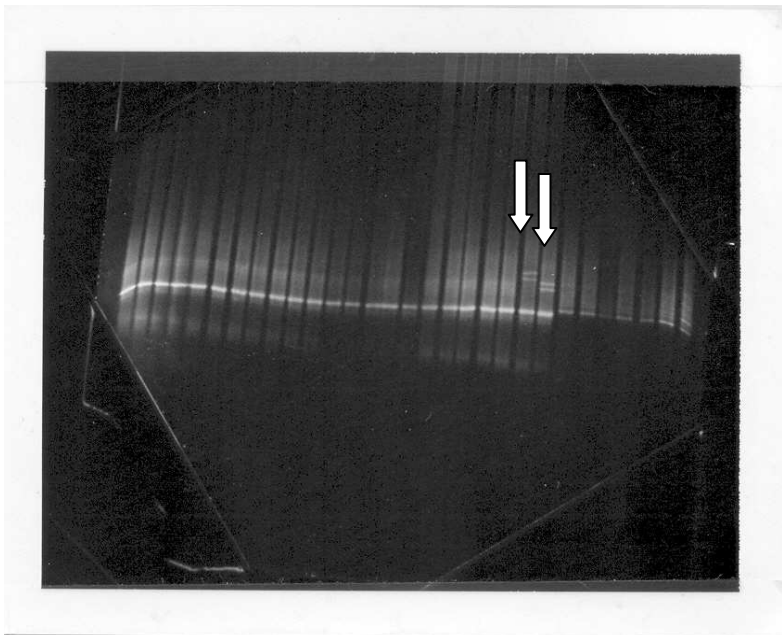


Abbildung 3: Beispiel für eine DGGE-Analyse: Pfeile markieren zwei Sequenzvarianten

1.2.2 Southern Blot

Der Southern Blot bietet eine Ergänzung der Mutationsanalyse. Für Patienten, die in der Untersuchung mit DGGE und Sequenzierung keine pathogenen Veränderungen aufwiesen, wurde zusätzliche eine Southern Blot Untersuchung durchgeführt.

Im Southern Blot wird genomische DNA, die zuvor einem enzymatischen Verdau unterzogen und auf ein Filter gebracht wurde, mit spezifischen Sonden hybridisiert, so dass genomische Deletionen nachgewiesen werden können. Dem Nachweis unterliegen größere DNA-Abschnitte, auf denen gesamte Exone oder sogar mehrere Exone liegen. Die in dieser Technik nachweisbaren Exonverluste, können häufig in der DGGE-Methode oder auch mit der direkten Sequenzierung auf gDNA-Basis methodenbedingt übersehen werden. Das unveränderte Allel maskiert den Verlust gesamter Exone bei Sequenzierung oder DGGE.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden DNA-Proben von 69 Indexpatienten auf das Vorliegen einer Keimbahnmutation im Mismatch Repair System untersucht. Als Indexpatient wurde derjenige Patient bezeichnet, durch den die familiäre Häufung von Karzinompatienten auffällt und der selbst an einem HNPCC-Karzinom erkrankt war.

59 Patienten stammten aus Familien, die den Amsterdam-I-Kriterien (Ams1) genügen und 10 der untersuchten Indexpersonen stammten aus „Amsterdam II-Familien“ (Ams2). Alle Patienten gaben nach entsprechender ausführlicher Beratung ihr schriftliches Einverständnis für die Durchführung der Mutationssuche und zur molekulargenetischen Untersuchung ihres Tumorgewebes.

Das Tumorgewebe stammte zum Teil aus den Operationen in den Universitätskliniken Düsseldorf oder – in der Mehrzahl der Fälle – wurde es nach schriftlichem Einverständnis der Patienten von den pathologischen Instituten der jeweils behandelnden Klinik angefordert. Zur weiteren Analyse stand Gewebe von insgesamt 51 Patienten zur Verfügung.

2.2 Mikrosatelliteninstabilität

Die Analyse der Mikrosatellitenstabilität wird in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie (Direktor: Professor Gabbert) durchgeführt.

Als Grundlage der Untersuchung dienten mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorschnitte (n=42). Es stand uns nicht von allen 51 Patienten genug Tumormaterial zur Verfügung, um eine immunhistochemische Färbung und eine Mikrosatellitenuntersuchung durchführen zu können.

Zunächst wurde der erste 5µm Schnitt mit HE gefärbt und eine Bestätigung der histologischen Diagnose unter einem Lichtmikroskop von einem Pathologen vorgenommen. Der Pathologe identifizierte Normalgewebe und Tumorgewebe. Von

jedem Patienten wurde DNA von Normalgewebe und Tumorgewebe isoliert, um im Vergleich die Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität vorzunehmen.

Für die DNA Isolierung wurden von der zu dem ersten Schnitt benachbarten Region 3 bis 5 10µm Schnitte angefertigt. Dafür wurde das Gewebe in Xylol deparafinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu deionisiertem Wasser rehydriert. Die DNA konnte dann durch das QIAamp® DNA Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) dem Herstellerprotokoll folgend isoliert werden. Die DNA Konzentration und der Reinheitsgrad wurden spektrophotometrisch kontrolliert. Alle DNA Proben hatten einen A260/A280- Quotienten von > 1,8. Die Längen der isolierten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel dargestellt. Die allermeisten Fragmente hatten eine Länge > 500 bp.

Die Primersequenzen und Eigenschaften wurden in unten stehender Tabelle dargestellt. Vorwärtsprimer wurden fluoreszenzmarkiert mit Phosphoramidites 6-FAM (6-carboxy-fluorescein), HEX (4,7,2', 4', 5',7'-hexachloro-6-carboxy-fluorescein) und TET (4,7,2',7'-tetrachloro-6-carboxy-fluorescein).

Micro-satellite Marker	Primersequenz	Gen-locus	Tm (°C)
BAT-25	F (FAM) : 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3' R : 5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'	4q11-12	57,1 54,5
BAT-26	F (TET) : 5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3' R: 5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'	2p16	54,4 56,8
D2S123	F(FAM): 5'-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3' R: 5'-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'	2p16	56,3 52,2
D17S250	F(TET): 5'-GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT-3' R: 5'-GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC-3'	17q11.2-12	52,0 51,7
D5S346	F(HEX): 5'-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG-3' R: 5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T-3'	5q21-22	52,8 55,8

Tabelle 1: Primersequenzen

In dem PCR-Volumen von 25µl waren enthalten: 1xPCR Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 0,6 U Taq DNA Polymerase (beide von HotStar Taq™ DNA Polymerase kit, Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,2 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und Primer Sets (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Die Primer

Sets mit Puffer und dNTPs wurden in Aliquots bei 20° C eingefroren. Zu jedem PCR-Volumen wurden 25 µg DNA in einem Volumen von 2µl hinzugefügt.

Für die Negativkontrollen wurde anstelle der DNA Wasser hinzugefügt. Als die Positivkontrolle diente DNA aus gesunder Kolonmukosa, die aus einem schockgefrorenen Operationspräparat gewonnen wurde. Die PCR wurde im Thermocycler PTC-200™ (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Deutschland) durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung und Analyse wurde durch den ABI Prism® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) vorgenommen. Für die Proben wurden 2 µl des PCR-Produktes mit 13µl deionisiertem Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland), das vermischt war mit 0,7 µl TAMRA (N,N,N', N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin)-labeled GS350 size standard (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Die Proben wurden bei 90°C für 2 min denaturiert und auf Eis gestellt. Für die Separierung der Mikrosatellitenfragmente wurde GS POP6 Polymer benutzt. Die Proben wurden für 2 bis 10 Sekunden bei 15kV injiziert und für 35 min bei 15 kV und 60°C separiert. Die Rohdaten wurden mit dem GeneScan® 2.0.2 Software (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und dem Matrix C virtual Filter untersucht.

2.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung für hMSH2, hMSH6 und hMLH1 wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie (Direktor: Professor Gabbert) etabliert.

Die 2-4 µm dicken Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 60° C inkubiert und dann mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert und rehydriert. Dann wurden die Objektträger für 15 min in Zitratpuffer gekocht. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit 3%igem Wasserstoffperoxid wurden die Präparate zunächst 15 min mit Avidin und 15 min mit Biotin inkubiert. Für 30 min wurden die Schnitte dann mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert: hMLH1 (clone G 168-728, BD PharMingen, San Diego, CA, USA; 1:60), hMSH2

(clone FE11, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA; 1:80) und hMSH6 (clone 44, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; 1:600).

Der Klon FE11(hMSH2) war gegen das Carboxy-terminale Ende des Proteins gerichtet. Klon 44 (hMSH6) erkannte die Aminosäuren 225-333 des Proteins. Clon 168-728 (hMLH1) erkannte das gesamte Protein.

Nach kurzem Waschen mit Aqua dest. wurden die Präparate mit dem zweiten und dritten Brückenantikörper (Ultra-Tek HRP Scytek ABN/ABL 999) für je 15 min bei Raumtemperatur überschichtet. Es folgte eine Inkubation für 10 min mit DAB und für 5 min mit Hämalaun. Die Schnitte mussten dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert werden.

Die Auswertung der Schnitte wurde gemeinsam mit einem erfahrenen Facharzt für Pathologie des Instituts vorgenommen. Sobald 10 % der Zellen eine verminderte Proteinexpression im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe der Patienten zeigten, wurde von einer verminderten Proteinexpression gesprochen.

2.4 DGGE

Die Untersuchungen werden in enger Zusammenarbeit mit dem humangenetischen Institut der Universität Leiden (NL) unter Leitung von Professor Fodde durchgeführt.

Mittels Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) wurden zunächst die bei HNPCC am häufigsten von einer Mutation betroffenen Gene hMSH2 und hMLH1 untersucht. Patienten, bei denen keine Keimbahnmutation in diesen beiden Genorten gefunden wurden, schlossen wir eine DGGE Untersuchung auf das Vorliegen einer Mutation in hMSH6 an.

Zunächst wurde DNA nach einem Standardprotokoll aus Vollblut isoliert. Danach wurden die einzelnen Exone der Genorte amplifiziert. Jeweils einer der Primer eines Primerpaars fügte an das PCR-Produkt ein GC-Clamp von 40 bp an. Die Primerpaare orientierten sich in ihrer Lage an den Exon-Intron Grenzen. Für hMSH2 wurden sie von Kolodner veröffentlicht (42), für hMLH1 von Kolodner und Liu (43, 44). Die Exone 3, 7, 12 von hMSH2 und für die Exone 2, 12, 18 von hMLH1 wurden in mehreren Fragmenten amplifiziert und mit DGGE untersucht. Die Amplifizierung

und Gelelektrophorese wurden durchgeführt entsprechend den Empfehlungen von von Fodde (45), Wijnen (41, 46) und Wu (47).

Für die Polymerase Chain Reaction befanden sich in 50µl PCR-Volumen 10mM Tris HCL pH 8,9; 50mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 200mg/ml BSA; 0,01 % Gelatine, 0,2 mM von jedem dNTP; 10% Glycerol; 10 pmol von jedem Primer und 1 U Taq Polymerase. Es wurden 35 PCR Zyklen durchgeführt: 60sec bei 94° C, 90sec bei 55°C oder 58°C und 120sec bei 72°C.

Die genauen Primersequenzen wurden von Wijnen publiziert (hMSH2 (46); hMLH1 (41)).

Für die DGGE wurde ein 6 oder 8 %iges Polyacrylamid Gel gegossen, das einen linearen ansteigenden Gradienten einer denaturierenden Lösung enthielt. 100 % denaturierender Lösung entsprachen dabei 7 M Harnstoff mit 40 % Formamid. Die verwendeten Gradienten lagen zwischen 20 und 70 %. Die genauen Daten für die Gradienten, die für die jeweiligen PCR-Produkte benutzt wurden, sind von Fodde et al (45) veröffentlicht. Die Gelelektrophorese wurde bei 60°C und in einem TAE Puffer bei pH 8 durchgeführt.

2.5 Southern Blot

Die Untersuchungen werden in enger Zusammenarbeit mit dem humangenetischen Institut der Universität Leiden (NL) unter Leitung von Professor Fodde durchgeführt.

Der Southern Blot wurde für diejenigen Patienten angewendet, bei denen in der DGGE-Analyse für hMSH2 und hMLH1, hMSH6 keine Mutation nachgewiesen wurde. Im Southern Blot wurde genomische DNA, die zuvor einem enzymatischen Verdau unterzogen und auf ein Filter gebracht wurde, mit spezifischen Sonden hybridisiert, so daß genomische Deletionen nachgewiesen werden konnten. Die Protokolle entsprachen der Empfehlung von Wijnen(48). Dem Nachweis unterlagen größere DNA-Abschnitte, auf denen gesamte Exone oder sogar mehrere Exone liegen.

Zum enzymatischen Verdau der DNA wurden zunächst Apa I und Xba I benutzt. Nachdem die DNA-Fragmente auf einen Filter gebracht worden waren, wurden die mit Apa I erzeugten Fragmente mit einer cDNA-Probe, die den Exonen 1-12 von hMLH1 entsprachen, und die mit Xba I erzeugten Fragmente mit einer cDNA-Probe,

die die Exone 1-7 von hMSH2 umfassten, hybridisiert. Die auf diese Weise erkannten aberranten Restriktionsfragmente mussten weiter charakterisiert werden. Das bedeutete, es wurden sowohl weitere Restriktionsenzyme als auch andere cDNA-Proben angewandt. Für Familie #113 sind dies zusätzlich die Enzyme Msi I, BamH I, BglII und die cDNA-Proben für das Exon1, das Exon2, das Exon3 und das Exon4. Für die Familien #106 und #118 die Enzyme Hind III und Asi I. Für die Familie #118 benützen wir noch eine cDNA-Probe, die die Exone 1 und 2 von hMSH2 umfasst. Für die Familie #106 sind cDNA-Proben notwendig, die jeweils die Exone 1 und 2 und 7 und 8 beinhalten.

2.6 Sequenzierung

Sobald eine Veränderung im DGGE-Muster gefunden wurde, wurde eine Sequenzierung angeschlossen, die die genaue Sequenzvariation nachwies und so eine Unterscheidung zwischen Polymorphismen und krankheitsverursachenden Mutationen erlaubte.

Die Sequenzierung der gDNA wurde mittels der Sanger-Methode durchgeführt (49). Die durch das Cycle Sequencing mit ddNTP generierten, unterschiedlich langen PCR-Produkte wurden mit Dye-Terminatoren markiert und auf dem ABI 377-Gerät elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Sequenzierung der Proben wurde nach entsprechendem Prescreening aus Ressourcenmangel kommerziell durchgeführt. Die Ergebnisse, da sie zur Validierung der Prescreeningverfahren notwendig waren, wurden in dieser Arbeit angeführt.

2.7 Einschätzung der Pathogenität der Mutation

Die Einschätzung der Pathogenität der Mutationen wird in Zusammenarbeit mit Dr. Goecke aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Düsseldorf vorgenommen.

Genomische Deletionen, Frameshift Mutationen und Missense Mutationen, die zu einem Stopcodon führten, und Mutationen, die zu einem Splice Defect führten, wurden als sicher pathogen gewertet.

Missense Mutationen, die nicht zu einem Stopcodon oder einem Splice Defect führten, führten zu einem Austausch von Aminosäuren, deren Krankheitsrelevanz nicht eindeutig war. Diese Mutationen wurden je nach Position und veränderter Aminosäure als nicht krankheitsrelevant oder unklar krankheitsrelevant klassifiziert. Mutationen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führten, waren Polymorphismen.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrosatelliteninstabilität

Von den 69 Patienten, die entweder den Amsterdamer Kriterien I (n=59) oder II (n=10) genügten, konnten wir von 42 Patienten Tumormaterial auf das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität analysieren.

Das Material von zwei Tumoren (5%) konnte nicht ausgewertet werden, weil zu wenig Material vorhanden war.

28/40 (70 %) Tumor-DNA-Proben waren hoch mikrosatelliteninstabil (MSI-H) und 12/40 (30 %) waren mikrosatellitenstabil (MSS). Kein Tumor zeigte eine niedrige Instabilität (MSI-L) in dem untersuchten Panel, d.h. kein Tumor war nur für einen Marker instabil.

Tumore auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht (n=42)			
MSI-H	MSS	MSI-L	Nicht auswertbar
28	12	0	2

Tabelle 2: Mikrosatellitenstatus

3.1.1 Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC) und der Sequenzanalyse für MSS Tumore

Für alle mikrosatellitenstabilen Tumore (n=12) konnte eine immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression für hMLH1, hMSH2 und hMSH6 durchgeführt werden. Es wurde für keinen dieser Tumore eine veränderte Proteinexpression nachgewiesen.

Ebenso wie in dieser Patientengruppe die Sequenzanalyse keine krankheitsrelevante Mutation nach. Für Patient #26 wurde eine Sequenzvariante von hMSH2 im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Die pathogenetische Signifikanz dieser Veränderung entsprach einem Polymorphismus (50). Bei keinem anderen Patienten mit einem MSS-Status wurde eine Sequenzveränderung nachgewiesen.

MSS (n=12)			
IHC- Veränderung	Keine IHC- Veränderung		
0	12		
	Pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation
	0	1	11

Tabelle 3: Immunhistochemische Veränderungen und Mutationen bei MSS

3.1.2 Ergebnisse der Immunhistochemie und der Sequenzanalyse für MSI-H Tumore

Alle MSI-H- Tumore (n=28) konnten immunhistochemisch für die drei Proteine hMLH1, hMSH2 und hMSH6 untersucht werden. Für 23 von den 28 mikrosatelliteninstabilen Tumoren (82%) konnte eine veränderte Proteinexpression gezeigt werden.

In zwei Fällen wies die immunhistochemische Untersuchung eine normale Proteinexpression für die drei untersuchten Gene nach. In dem einem Fall (Patient #28) ließ sich zwar bei der Indexperson trotz hoch instabilem Mikrosatellitenstatus und nachgewiesener Mutation in hMSH2 keine veränderte Proteinexpression zeigen, allerdings gelang der Nachweis der veränderten Proteinexpression in hMSH2 und hMSH6 beim Tumor eines erstgradig Verwandten, der die gleiche Mutation trug wie die Indexperson. In dem zweiten Fall (Patient #17) konnte ebenfalls keine Mutation nachgewiesen werden.

In drei Fällen waren die immunhistochemischen Färbungen für einzelne Proteine nicht auswertbar. In einem dieser Fälle (Patient #25) konnten Proteinveränderungen mit der Immunhistochemie für mehrere erstgradig verwandte Patienten, die die gleiche Mutation trugen wie die Patientin, allerdings nachgewiesen werden. Für einen zweiten Fall (Patient #37), bei dem die Färbung für hMLH1 normal und für hMSH2 und hMSH6 nicht auswertbar waren (Färbung in altem Archivmaterial funktionierte nicht), ließ sich eine krankheitsrelevante Mutation in hMSH2 nachweisen.

In der Sequenzanalyse der MSI-H-Tumore ließ sich in 24/28 Fällen (86 %) eine Mutation in einem der drei untersuchten Mismatch Reparatur Genen nachweisen.

15/24 Mutationen wurden als sicher krankheitsrelevant eingestuft. 7/24 Mutationen waren möglicherweise pathogen und 3 Mutationen wurden als Polymorphismen klassifiziert. Von den 28 Tumoren waren für 15 (54 %) eine sicher pathogene Mutation und für 21 (75 %) Tumore eine sicher oder möglich pathogene Mutation identifiziert worden. Insgesamt konnten in 5/28 (18 %) der Fälle trotz MSI-H keine Mutationen nachgewiesen werden.

MSI-H (n=28)											
IHC- Veränderung				Keine IHC- Veränderung				IHC nicht auswertbar			
23				2				3			
Pathogene Mutation	Unklar pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation	Pathogene Mutation	Unklar pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation	Pathogene Mutation	Unklar pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation
13	5	3	2	1	0	0	1	1	1	0	1

Tabelle 4: Immunhistochemische Veränderungen und Mutationen bei MSI-H

3.1.3 Positiv prädiktiver Wert und Sensitivität der Mikrosatellitenanalyse

Die Mikrosatellitenanalyse konnte in der vorliegenden Untersuchung an 40 Tumoren erfolgreich durchgeführt werden. Von den 28 MSI-H-Tumoren war für 21 (75 %) Tumore eine sicher oder möglich pathogene Mutation identifiziert worden. Die Mikrosatellitenanalyse hatte im Rahmen der hier vorliegenden Analyse in Bezug auf das Erkennen einer Mutation einen positiv prädiktiven Wert von 75 %.

In allen Fällen, in denen eine pathogene Mutation oder unklar pathogene Mutation gefunden wurde und Tumorgewebe zur Mikrosatellitenanalyse vorlag, wurde ein hochinstabiler Mikrosatellitenstatus nachgewiesen. Die Sensitivität lag in der vorliegenden Arbeit bei 100 %.

Für keinen der mikrosatellitenstabilen Tumore konnte eine pathogene Mutation gefunden werden. Der negativ prädiktive Wert lag bei 100 %.

3.2 Immunhistochemie

Insgesamt standen aus dem untersuchten HNPCC-Kollektiv von 50 Patienten Tumormaterial für die Untersuchung der Proteinexpression zur Verfügung. Alle 50 Tumorproben wurden auf die Proteinexpression von hMLH1 und hMSH2 untersucht, 47 Tumorschnitte konnten zusätzlich noch für hMSH6 untersucht werden. Insgesamt

zeigten 25/50 (50 %) Tumore zumindest für ein Gen eine veränderte Proteinexpression. 9 Tumore zeigten einen Verlust oder eine Reduktion der Proteinexpression für hMLH1, 14 Tumore für hMSH2 und 14 für hMSH6. Zwei dieser verminderten immunhistochemischen Färbungen für hMSH6 kamen isoliert vor. In 12 Tumoren lag eine verminderte Expression für hMSH2 und hMSH6 vor. In einem Tumor war die verminderte Expression für hMSH6 mit einer verminderten Expression für hMLH1 kombiniert.

Verminderte Proteinexpression (n=25)				
hMLH1	hMLH1 hMSH6	hMSH2	hMSH2 hMSH6	hMSH6
8	1	2	12	2

Tabelle 5: Verteilung der Genorte bei verminderter Proteinexpression

3.2.1 Ergebnisse der Immunhistochemie und der Mikrosatellitenanalyse

Alle Tumore, die eine veränderte Proteinexpression aufwiesen und auch für Mikrosatelliteninstabilität untersucht werden konnten, waren MSI-H (24/24).

In zwei Fällen konnte bei nicht veränderter Proteinexpression ein MSI-H Status gefunden werden. In 12 Tumoren war sowohl die Proteinexpression der untersuchten Mismatch Reparatur Gene für alle drei Gene erhalten als auch der Mikrosatellitenstatus MSS.

IHC-Veränderung		Keine IHC-Veränderung	
MSI-H	MSS	MSI-H	MSS
24	0	2	12

Tabelle 6: Mikrosatellitenstatus im Vergleich immunhistochemischen Veränderung

3.2.2 Ergebnisse der Immunhistochemie und der Sequenzanalyse

9 Tumore wiesen eine veränderte Proteinexpression für MHL1 auf. Für 6 dieser Tumore ließ sich bei der Sequenzanalyse eine Mutation im hMLH1 Gen zeigen. Von diesen waren zwei als sicher krankheitsverursachend anzusehen. Vier Mutationen waren Missense Mutationen, deren Pathogenität als möglich eingestuft wurde. Ein Patient hatte eine Sequenzveränderung in hMSH2, obwohl die Proteinexpression für hMLH1 verändert war (Patient #6). Jedoch musste man bei der Sequenzveränderung davon ausgehen, dass es sich um einen Polymorphismus handelte. hMLH1 hatte bei unserer Analyse mit DGGE keine Sequenzveränderung. Ein weiterer Patient zeigte einen Polymorphismus in hMSH6.

14 Tumore hatten eine verminderte Proteinexpression für hMSH2. Für 12/14 Patienten konnte eine Sequenzveränderung in hMSH2 gezeigt werden. 9 Mutationen waren krankheitsrelevant, zwei Mutationen wurden als möglicherweise pathogen angesehen und eine Mutation war ein Polymorphismus.

Auffällig war, dass für 12 Tumore, die eine verminderte Proteinexpression für hMSH2 hatten, auch eine verminderte Proteinexpression für hMSH6 vorlag. In 8 von diesen gelang es, eine Mutation in hMSH2 zu finden.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen 11 Tumoren mit einer veränderten Proteinexpression für hMSH6 gab es zwei Tumore, die eine Veränderung in hMSH6 bei erhaltener Proteinexpression für hMSH2 zeigten. Zwei Patienten (Patient #18 und Patient #42) wiesen Sequenzveränderungen für andere Gene als hMSH6 auf. Patient #18 trug einen Polymorphismus auf hMLH1 und Patient #42 eine Missense Mutation für hMSH2 auf, deren Pathogenität unklar war.

Auffällig war eine Familie (Patient #25), die eine veränderte Proteinexpression für hMLH1 und hMSH6 bei Mutation in hMLH1 aufwies. Die ungewöhnliche Änderung der Proteinexpression ließ sich bei mehreren Familienmitgliedern reproduzieren. Die Mutation war eine Missense Mutation, deren Pathogenität unklar war.

Für keinen Indexpatienten, dessen Tumormaterial immunhistochemisch gefärbt wurde, war es möglich, eine Sequenzveränderung für hMSH6 zu finden.

Verminderte Proteinexpression (n=25)								
hMLH1				hMSH2				hMSH6
9				14				15
Pathogene Mutation	Unklar pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation	Pathogene Mutation	Unklar pathogene Mutation	Polymorphismus	Keine Mutation	Keine Sequenzveränderung in hMSH6
2	4	2	1	9	2	1	2	

Tabelle 7: Verteilung der Genorte und Mutationen bei verminderter Proteinexpression

3.2.3 Positiv prädiktiver Wert und Sensitivität der Immunhistochemie

In 16/25 (64 %) Fällen entsprachen die pathogenen Mutationen dem Färbeergebnis in der Immunhistochemie. Zusammen mit den unklaren Mutationen, die in 5 Fällen auf dem passenden Gen lagen, waren es 21/25 oder 84 %.

Der positive prädiktive Wert der Immunhistochemie zum Erkennen einer pathogenen Mutation lag in dem untersuchten Patientenkollektiv bei 64 % und zum Erkennen einer möglicherweise pathogenen Mutation bei 84 %.

Umgekehrt stand für die 17 Patienten mit sicher pathogenen Sequenzveränderungen oder Deletionen im Southern Blot Tumorgewebe zur immunhistochemischen Färbung zur Verfügung. 16/17 immunhistochemische Färbungen ließen sich auswerten.

Bei den fünf Deletionen stimmten vier Färbeergebnisse überein. Bei dem fünften Patienten zeigte zwar der Indexpatient ein normales Färbeverhalten der drei Proteine, aber ein ebenfalls von der Mutation betroffener erstgradig Verwandter hatte eine verminderte Proteinexpression für hMSH2 und hMSH6 bei Deletion von Exon 1 von hMSH2.

Alle Patienten mit einer pathogenen Sequenzveränderung in der Sequenzierung hatten eine veränderte Proteinexpression und diese stimmten mit dem Genort überein.

Die Sensitivität der Immunhistochemie zur Erkennung einer pathogenen Mutation betrug somit 15/16 oder 93,8 %.

3.3 DGGE

Alle 69 Patienten wurden für die Gene hMLH1 und hMSH2 komplett untersucht. hMSH6 wurde dann untersucht, wenn für die beiden anderen Gene keine pathogene Sequenzveränderung gefunden wurde. Die gefundenen Sequenzveränderungen wurden zur direkten Sequenzierung des betreffenden Genabschnittes geschickt. Die entsprechenden Veränderungen sind unter den Sequenzierungsergebnissen aufgeführt worden.

3.4 Southern Blot

Für diese Analyse wurden insgesamt 48 Proben des Kollektivs untersucht. Wurden sicher pathogene Mutationen bereits nach DGGE-Analyse und Sequenzierung identifiziert, wurde auf die Durchführung des Southern Blots verzichtet.

Von den 48 gDNA-Proben wurden 40 für die Gene hMLH1, hMSH2 und hMSH6 analysiert. Für 6 Patienten wurden nur hMLH1 und hMSH2 und für 2 Patienten nur hMSH6 untersucht, zum Teil weil eine Veränderung im Southern Blot bereits in einem Gen gefunden wurde, z. T. weil die Menge an gDNA nicht für die komplette Analyse ausreichte.

Es wurden insgesamt 5 genomische Deletionen entdeckt. Zwei betrafen hMLH1 und drei betreffen hMSH2. In 4 von 5 Fällen wurde in der Immunhistochemie eine verminderte Proteinexpression des entsprechenden Genes nachgewiesen. In dem verbleibenden Fall (Patient #28) konnte zwar die Verminderung der Proteinexpression bei der Indexpatientin nicht nachgewiesen werden. Allerdings gelingt dieser Nachweis in dem Tumor eines erstgradig Verwandten, der bereits an einem Karzinom erkrankte und bei dem die identische Mutation nachgewiesen wurde.

Alle (5/5) Tumore mit genomischen Deletionen waren in der Mikrosatellitenanalyse hochinstabil.

Genomische Deletionen (n = 5)				
MSI-H				MSS
5				0
hMLH1		hMSH2		
2		3		
IHC- Veränderung	keine IHC- Veränderung	IHC- Veränderung	keine IHC- Veränderung	
2	0	3*	0	

Tabelle 8: Mikrosatellitenstatus, Verteilung der Genorte und immunhistochemische Veränderung bei nachgewiesenen genomischen Deletionen

* Immunhistochemie des betroffenen Verwandten angeführt (siehe Text)

Genomische Deletionen		
Patient #	Gen	Deletion
5	hMSH2	Exon 8
12	hMLH1	Exon 2-3
28	hMSH2	Exon 1
45	hMSH2	Exon 1-6
46	hMLH1	Exon 1

Tabelle 9: genomische Deletionen

3.5 Sequenzierung

Es wurden alle Proben sequenziert, bei denen eine Veränderung in der DGGE nachgewiesen wurde. In 35/69 (51 %) DNA-Proben wurden insgesamt 41 Sequenzveränderungen gefunden. 13 Veränderungen betrafen hMLH1, 25 hMSH2 und 3 hMSH6. Insgesamt wurden 20 dieser Alterationen als pathogen klassifiziert. Kein Patient hatte mehr als eine pathogene Mutation. Diese verteilten sich folgendermaßen: 5 hMLH1, 14 hMSH2, 1 hMSH6. Bei 8 Mutationen war die Pathogenität unklar (5 hMLH1, 3 hMSH2). 13 Mutationen waren sichere Polymorphismen.

hMLH1			hMSH2			hMSH6		
13			25			3		
Pathogen	Unklar	Polymorphismus	Pathogen	Unklar	Polymorphismus	Pathogen	Unklar	Polymorphismus
5	5	3	14	3	8	1	0	2

Tabelle 10: Verteilung der Mutationen (ohne genomische Deletionen)

3.5.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Mikrosatellitenanalyse

Für 22/35 Patienten mit einer Veränderung in der Sequenzanalyse waren Untersuchungen zur Mikrosatelliteninstabilität durchgeführt worden. 21/22 Tumore waren hoch instabil. Bei dem Patienten mit einem MSS-Tumor (Patient #26) erfolgte der Nachweis eines Polymorphismus in hMSH2.

Die Mutationen der 21 hochinstabilen Tumore waren in 12 Fällen sicher pathogen, in 6 Fällen von unklarer Pathogenität und 3 Mal lag ein Polymorphismus vor.

Erwähnenswert ist, dass ein Fall (Patient #12) nicht nur einen Polymorphismus in hMSH6 aufwies, sondern auch eine genomische Deletion. So war die Mikrosatelliteninstabilität gut zu erklären.

MSI-H			MSS		
21			1		
Pathogen	Unklar	Polymorphismus	Pathogen	Unklar	Polymorphismus
12	6	3	0	0	1

Tabelle 11: Mikrosatellitenstatus bei Patienten mit nachgewiesenen Mutationen (ohne genomische Deletionen)

3.5.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse und der Immunhistochemie

Für 26/35 Patienten mit einer Veränderung in der Sequenzanalyse war eine Untersuchung zur Proteinexpression mittels Immunhistochemie durchgeführt worden.

Unterteilt man die Mutationen gemäß ihrer krankheitsverursachenden Relevanz ergab sich, dass alle krankheitsrelevanten Mutationen eine Proteinveränderung in dem entsprechenden Gen verursachten (11/11). Bei Patienten mit einer möglicherweise pathogenen Mutation entsprachen sich Immunhistochemie und Sequenzanalyse in 6/7 Fällen. In einem Fall (Patient #42) betraf die immunhistochemische Veränderung hMSH6 und die Mutation lag auf hMSH2. Bei den Polymorphismen stimmten Immunhistochemie und Sequenzanalyse nur in einem Fall (1/7) überein. In den anderen Fällen war die Proteinexpression anderer Gene vermindert oder es wurde keine Veränderung der Proteinexpression nachgewiesen.

Pathogene Mutation			Unklare Mutation			Polymorphismus		
11			7			7		
Entsprechende IHC-Veränderung	Nicht entsprechende IHC-Veränderung	Keine IHC-Veränderung	Entsprechende IHC-Veränderung	Nicht entsprechende IHC-Veränderung	Keine IHC-Veränderung	Entsprechende IHC-Veränderung	Nicht entsprechende IHC-Veränderung	Keine IHC-Veränderung
11	0	0	6*	1	0	1	3	3

Tabelle 12: Immunhistochemische Veränderungen bei Patienten mit nachgewiesenen Mutationen

*In einem Fall bei nicht auswertbarer Immunhistochemie des Indexpatienten die Immunhistochemie der ebenfalls betroffenen Verwandten angeführt.

Unterteilt man die Sequenzveränderungen gemäß der klinischen Unterschiede der Patienten so lagen bei 32/59 (54 %) Patienten aus Ams1-Familien und bei 3/10 (30 %) Patienten aus Ams2-Familien eine Mutation vor. Sicher pathogene Mutationen betrafen 18/59 (31 %) Ams1-Patienten und 2/10 (20 %) Ams2-Patienten. Berücksichtigte man sicher pathogen und unklar pathogene Mutationen, lagen bei 26/59 (44 %) der Ams1-Patienten und bei 2/10 (20%) der Ams2-Patienten krankheitsrelevante Mutationen vor. Auffällig war außerdem, dass die einzige pathogene Mutation in hMSH6 einen Patienten aus einer Ams2-Familie betraf.

Amsterdam-1 (n=59)			Amsterdam-2 (n=10)		
32			3		
Pathogen Mutation	Unklare Mutation	Polymorphismus	Pathogen Mutation	Unklare Mutation	Polymorphismus
18	8	6	2		1

Tabelle 13: Verteilung der Mutationen auf Ams1- und Ams2-Familien

Die Ergebnisse der Sequenzierung ergaben eine Rate von 20/69 (29 %) sicher pathogener Mutationen. Zusammen mit den Mutationen unklarer Pathogenität fand sich eine Rate von 28/69 (41 %).

Unter Berücksichtigung der pathogenen Veränderungen, die sich aus den Southern Blot Untersuchungen und der Sequenzanalyse zusammen ergaben, haben 25/69 (36%) Patienten eine pathogene Veränderung. Fügt man noch die unklaren Mutationen dazu, kam man auf eine Rate 33/69 (48 %).

#	Gen	Exon	Mutation	Konsequenz	Pathogenität
1	hMSH2	6	c.998 G>A C333Y	Missense	unklar
2	hMLH1	6	c.545+1 G>A	Splice defect out of frame	ja
5	hMSH2	7	c.1077 T>A	unklar	nein
5	hMSH2	3	c.1077 T>C	missense	unklar
6	hMSH2	6	c.965 G>A, G322D	missense	nein
8	hMLH1	16	c.1852-1853 AA>GC, K618A	missense	unklar
10	hMSH6	6	c.3514-35-3515 insA, R1172Kfs R1176X R1172-K1172 ins fs R1176X	Nonsense Frameshift Stop nach 4 Codons	ja
11	hMLH1	2	c.150-151 insT, V51fsX52	Nonsense Frameshift Stop nach 1 Codon	ja
12	hMSH6	2	c.297 G>T, K99N	Missense	nein
14	hMSH2	7	c.1276+1 G>A	splice defect	ja
15	hMSH2	1	c.4G>A, A2T	Missense	nein
16	hMLH1	17	c.1917_1918insT,	nonsense, frameshift stop nach 4 codons	ja
16	hMSH2	6	c. A>G	keine Veränderung	nein
18	hMLH1	13	c.1558+14 G>A	Unklar	nein
22	hMSH6	4	c.2633 T>C, V878A	Missense	nein
23	hMSH2	3	c.508 C>T, Q170X	Nonsense	ja
25	hMLH1	17	c.1961 C>T	missense	unklar
26	hMSH2	7	c.1077-10 T>C	unklar	nein
30	hMSH2	13	c.2038 C>T, R680X	nonsense	ja
30	hMSH2	10	c.1511 IVS10-9 T>A	missense	nein
30	hMSH2	10	c.1661IVS 10+6T>C	missense	nein
34	hMSH2	4	c.696-697delTT, F232fs254X	nonsense, frameshift stop nach 22 codons	ja
36	hMSH2	4	c.788-789delAT, N263fsX282	nonsense, frameshift stop nach 19 codons	ja
37	hMSH2	4	c.711-714delTTAT, I237faX244	nonsense, frameshift stop nach 7 codons	ja
39	hMSH2	11	c.1705-1706delGA, E569fsX570	nonsense, frameshift nach 1 codon	ja
40	hMSH2	4	c.704-705 delAA, K235fsX254	nonsense, frameshift nach	ja

				20 codons	
42	hMSH2	2	c.274 C>G, L92V	missense	unklar
	hMSH2				
	hMLH1				
47	hMLH1	13	c.1558+14 G>A	unklar	nein
48	hMLH1	17	c.1989+1 G>A	splice defect	ja
49	hMSH2	7	c.1226-1227 del AG, Q409fsX415	nonsense, frameshift stop nach 6 codons	ja
53	hMSH2	8	c.1386+1 G>A	splice defect	ja
54	hMLH1	18	c.2067-2073del GTACATA Q689fsX782	missense, frameshift, stop nach 93 codons	ja
55	hMSH2	3	c.638-639 delTG, L213fsX230	nonsense, frameshift, stop nach 17 codons	ja
56	hMSH2	8	c.1373 T>G, L458X	nonsense	ja
58	hMLH1	8	c.677+3A>G	unklar	unklar
59	hMLH1	18	c.2027 T>C, L676P	missense	unklar
60	hMSH2	7	c.1216 C>T, R406X	nonsense	ja
62	hMLH1	3	c.230 G>A, C77Y	missense	unklar
65	hMSH2	2	c. 268-289 dup	nonsense, frameshift, stop nach 10 codons	ja
65	hMSH2	6	c.965 G>A G322D	missense	nein

Tabelle 14: Mutationen

4 Diskussion

Basierend auf der Literatur muss man davon ausgehen, dass zwischen 2 und 5 % aller kolorektalen Karzinome (CRC) aufgrund des HNPCC-Syndroms entstehen. Für die betroffenen Patienten und deren Familien ist das Auffinden der krankheitsverursachenden Mutation von äußerster Wichtigkeit. Da das Syndrom autosomal dominant vererbt wird, werden statistisch gesehen 50% der Familienmitglieder ein normales, bevölkerungsübliches Karzinomrisiko aufweisen. Können diese durch eine Mutationsanalyse identifiziert werden, kann man sie von der Angst vor dem erhöhten Karzinomrisiko befreien.

Bei betroffenen Karzinompatienten gelten gleiche Vorsorgeempfehlungen unabhängig von einem Mutationsnachweis. Aber auch diese Patienten profitieren von einer Mutationsanalyse. Die Motivation, sich konsequent den empfohlenen Vorsorge- und Früherkennungsmaßnahmen zu unterziehen, steigt (18, 19).

So muss es aus medizinischer Sicht Ziel sein, Indexpersonen über die Möglichkeiten und Grenzen einer Mutationsanalyse zu informieren und Sie zu einer Mutationsanalyse zu motivieren, um Risikopersonen eine persönliche Risikoeinschätzung zu ermöglichen,

4.1 Mutationsrate

Ohne die Southern Blot Untersuchungen konnten wir in 20/69 (29 %) der Patienten eine sicher pathogene Mutation nachweisen. Fasste man diese Mutation mit den Mutationen unklarer Pathogenität zusammen fand sich eine Rate von 28/69 oder 41 %.

Zusammen mit den Mutationen aus der Southern Blot Analyse ergab sich eine Rate von 33/69 oder 48 %.

Die Einstufung der Pathogenität wurde in der vorliegenden Arbeit nach sehr konservativen Kriterien vorgenommen. Missense Mutationen wurden nur als sicher pathogen eingeschätzt, wenn sie direkt zu einem Stop Codon führten. Es gibt einzelne Publikationen zu funktionellen Tests, die solche Missense Mutationen

identifizieren, die zu Fehlern in der Interaktion der verschiedenen Mismatch Repair Proteine führen. Einige wenige Arbeitsgruppen haben erfolgreich Mutationen geclont und in defekte Zelllinien transferiert. Mit einem Mismatch Repair Assay konnten dann pathogene Missense Mutationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das defekte MMR-System zu korrigieren, analysiert werden (71, 72). Solange funktionelle Tests nicht breite Anwendung finden, wird die sichere Einschätzung der Pathogenität mancher Missense Mutationen unklar bleiben. Der Vergleich von Mutationsraten war bei unterschiedlicher Einschätzung der Pathogenität schwierig.

In der Literatur wurden bei neueren Untersuchungen von gDNA mittels direkter Sequenzierung Mutationsraten von ca. 50% berichtet (9-12). Auch in Veröffentlichungen, in denen mit DGGE ein vergleichbares Patientenkollektiv untersucht wurde, liegt die Rate bei 45% (51) oder 21% bzw. 24 %, wenn nur eines der beiden Gene untersucht wird (41, 46, 52). Diese Untersuchungen wurden zum Teil in dem Kooperationslabor in Leiden durchgeführt.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Mutationsraten mag in den unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen der jeweiligen Untersuchungen liegen. Moslein et al. stellten bereits eine verschiedene Mutationsrate in den von ihnen untersuchten Patienten fest. Für die Amerikaner wurden in 6/11 Fällen oder in 55% eine krankheitsrelevante Genveränderungen gefunden. Für die deutsche Patientengruppe lag die Rate nur bei 33% (3/9) (9). Wie Friedl et al. auf dem ICG-Meeting in Buffalo berichteten, fanden sie bei der Mutationsanalyse von 53 deutschen Patienten, die sogar alle eine Mikrosatelliteninstabilität aufwiesen, nur in 12 Fällen eine Mutation. Das entsprach einer Rate von 22% (53).

Auch fanden Autoren aus anderen Bevölkerungsgruppen geografische Unterschiede in der Mutationsverteilung: So berichtete Wahlberg (Schweden), bei der Untersuchung von 39 HNPCC-Familien auf Mutationen in hMSH2 nur 2 Keimbahnmutationen gefunden zu haben (54). Weber et al. zeigten eine Mutationsrate von 25% (8/32) in Familien aus den Oststaaten der USA (55). Caldes et al. untersuchten 52 Familien aus Spanien, die gemäß den Amsterdamer bzw. Bethesda-Kriterien ausgesucht wurden. Insgesamt wurden in 13/52 (25 %) Familien pathogenetische Mutationen in hMLH1 und hMSH2 entdeckt. Die Analysen wurden mit DGGE und Sequenzierung vorgenommen (56).

Einschränkend muss man bei allen Untersuchungen zu HNPCC die jeweils geringe Fallzahl berücksichtigen. Im September 2005 wurde eine umfassende Arbeit über Mutationsergebnissen aus Deutschland veröffentlicht. Das Kollektiv betrug 1377 Patienten, für die eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt werden konnte. Bei Patienten betrug die Rate an MSI-H 72%. Die Mutationsrate für die Gene hMLH1 und hMSH2 für die durch die Mikrosatellitenanalyse vorgeselektierten Tumore lag bei 56 %. So muss die Mutationsrate für die nicht vorselektionierten Patienten, die Amsterdamer Kriterien genügen, mit 40,3 % angegeben werden. (57)

Nur weitere Untersuchungen und eine Zusammenführung der Ergebnisse in internationalen Datenbanken können die Fragen der regionalen Unterschiede klären.

4.2 Mutationen im Southern Blot

Die mit dem Southern Blot gefundenen genomischen Deletionen sind Veränderungen, die allen auf gDNA basierenden Sequenzierungsverfahren entgehen. Mutationsraten im Southern Blot sollten deshalb nicht mit denen der direkten Sequenzierungen verglichen werden.

In dem Paper von Wijnen et al. (48) machten die genomischen Deletionen von hMSH2 6.5% der Veränderungen in den HNPCC-Familien aus. Taylor et al. fanden in 12 von 215 (5,6%) britischen HNPCC-Familien Deletion von einem oder mehr Exonen (58). In unserem Untersuchungsgut hatten 5/69 (7,2 %) Patienten genomische Deletionen, zwei betrafen hMLH1 und drei betrafen hMSH2. In Bezug auf alle pathogenen oder möglich pathogenen Veränderungen entsprach das einer Rate von 5/33 oder 15 %. Ein Vergleich dieser Prozentzahlen war sicherlich aufgrund der geringen Fallzahl nur bedingt statistisch relevant.

Die Rate nachgewiesener Mutationen hängt immer von der klinischen Auswahl der untersuchten Patienten, der untersuchten Genorte und den angewandten Nachweismethoden ab.

Zum anderen mag es andere Karzinomprädispositionssyndrome geben, die nicht das Mismatch Repair System betreffen, aber eine klinische Schnittmenge mit HNPCC bilden. Lindor et al. untersuchten Familien, die den Amsterdam I- Kriterien genügten, und verglichen Familien mit MSI-H-Tumoren mit Familien mit MSS-Tumoren. Dabei stellte sich heraus, dass Familien ohne Nachweis eines Mismatch Repair Defektes im Vergleich zur anderen Gruppe nur eine erhöhte Inzidenz von

kolorektalen Karzinomen und nicht von anderen HNPCC-verwandten Tumoren hatten. Außerdem war die erhöhte Inzidenz von Tumoren signifikant niedriger als für die Familien mit einem defekten Mismatch Repair System. Sie hat deshalb eine neue Bezeichnung vorgeschlagen: „familiäre kolorektale Karzinome Typ X“ (85).

4.3 Mikrosatellitenanalyse

Ein defektes Mismatch Reparatur System führt zu einer genetischen Instabilität und zeigt sich in Replikationsfehlern von kleinen repetitiven Sequenzen, den sog. Mikrosatelliten. Ursache für diese Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kann eine Keimbahnmutation in einem der Mismatch Repair Gene sein. Zu Beginn der Ära um HNPCC wurden sie als Charakteristikum der Tumore im Rahmen des HNPCC-Syndroms beschrieben (20, 59). Es wurde beobachtet, dass 85-90 % aller HNPCC-assoziierten Tumore MSI zeigten (9, 22, 59, 60). Unserer Erkenntnis nach ist noch keine pathogene Keimbahnmutation in einem Mismatch Repair Gen beschrieben, die nicht mit MSI einhergeht.

MSI ist aber nicht spezifisch für HNPCC. Auch 15 % der sporadischen CRC haben eine MSI (30, 31, 61). MSI kann sowohl Folge einer Keimbahnmutation als auch Folge einer Mutation im Verlauf der Karzinogenese sein. Eine Hypermethylierung des hMLH1 Promotors führt zum „Silencing“ des Gens und damit auch zur MSI. Dieses Phänomen ist für die meisten sporadischen MSI Tumoren ursächlich verantwortlich und ist vor allem in den Tumoren älterer Patienten vorzufinden. (31, 62, 63, 64).

In den rund 20 % der Tumore, die trotz MSI-H Status keine nachweisbare Mutation aufweisen, kann eine Mutation in Anteilen der bekannten Gene liegen, die durch die angewandten Methoden nicht erfasst werden. Beispielsweise liegt die Mutation weiter im Intron. Shin et al. entdecken in 5 % HNPCC-Patienten Mutationen in der Promotor Region von hMSH2. Die Tumore sind MSI-H (83).

Man kann aber auch spekulativ davon ausgehen, dass andere Gene, die am Mismatch Repair System beteiligt sind, zum momentanen Zeitpunkt für den Menschen noch nicht erfasst und einer Mutationsanalyse nicht zugänglich sind. Bei der Hefe sind 11 Gene am Mismatch Repair System beteiligt.

Die Methode der Mikrosatellitenanalyse wurde im Rahmen eines Ringversuches validiert (32) und durch die Festlegung des sog. Bethesda-Panels standardisiert (26). Methodenbedingt kann die Mikrosatellitenanalyse nur zwischen von Mismatch Repair Defekt betroffenen Tumoren und nicht betroffenen Tumoren unterscheiden. Ein Hinweis auf das betroffene Gen ist nicht möglich. Im Vergleich zur Immunhistochemie, die auf das mutierte Gen hinweist, ist dies ein deutlicher Nachteil.

4.3.1 Technische Probleme der Mikrosatellitenanalyse

Aufgrund von technischen Problemen konnte das Tumormaterial von 4/44 (9 %) der Patienten nicht ausgewertet werden

Technische Probleme wurden in der Literatur berichtet, v. a. wenn die Mikrosatellitenanalyse am paraffinierten Gewebe durchgeführt wurde. Lindor et al. berichteten, dass die technische Machbarkeit am paraffinierten Gewebe für die Mikrosatellitenanalyse etwas schlechter war als für die Immunhistochemie. Sie berichtete von drei vorbestrahlten Rektumkarzinomen, für die bei 3 % Tumorzellen im Resektat die Tumor DNA für die Mikrosatellitenanalyse nicht ausreichte. Eine immunhistochemische Färbung an den Zellinseln gelang jedoch (65). Loukola et al. berichteten über technische Schwierigkeiten bei der Mikrosatellitenanalyse und eine große Anzahl an notwendigen Reamplifikationen. Er verglich die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse mit einem Panel von Markern mit der Mikrosatellitenanalyse von einem einzigen Marker. Es wurde dafür plädiert, dass bei einer Übereinstimmung von 97 % eine MSI-Suche nur mit einem einzigen Marker (BAT26) durchgeführt werden könnte (66).

Ein Übersichtsartikel von Muller et al. beschäftigte sich mit den Schwierigkeiten u. a. bei der Mikrosatellitenanalyse. Er empfiehlt eine Laser Microdissektion bei schwierigen, weil heterogenen Tumorblöcken (67).

4.3.2 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse im Vergleich zur Literatur

Die Rate an mikrosatelliteninstabilen Tumoren in der vorliegenden Arbeit lag ca. 20 % unter der in der Literatur beschriebenen (9, 22, 59, 60). Die Arbeitsgruppe aus Dresden hat bei 69,2 % der Tumore von HNPCC-Patienten eine Mikrosatelliteninstabilität und damit eine ähnliche Rate wie in unserer Arbeit

gefunden. Die Dresdener Arbeitsgruppe wies für keinen der mikrosatellitenstabilen Tumore eine pathogene Mutation nach (35).

Wahlberg et al. beschrieb in seinem untersuchten Patientenkollektiv, dass die Tumore aller Patienten, die eine pathogene Keimbahnmutation trugen, hoch mikrosatelliteninstabil waren (68). Eine Arbeitsgruppe in Dänemark (Christensen et al.) fand nur in einem Fall einen diskrepanten Befund zwischen Mutationsanalyse und Mikrosatellitenanalyse. Allerdings war die Mutation (hMSH2 exon15 c.834 G>A, Ala>Thr) am ehesten als Polymorphismus zu bewerten. In allen anderen von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Fällen lag bei nachgewiesener Mutation ein MSI-H-Status vor. Bei nicht nachgewiesener Mutation konnte in vier Fällen eine Mikrosatelliteninstabilität gezeigt werden (60).

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Technische Probleme der Immunhistochemie

Obwohl die immunhistochemische Untersuchung der Proteine an paraffinierten Gewebe etwas weniger störanfällig war als die Mikrosatellitenanalyse an dem selben Gewebe (65), gab es auch hier einzelne Tumorpräparate, die nicht ausgewertet werden konnten. 4/147 (2,7 %) Färbungen waren in unserer Untersuchung nicht auswertbar. In einem Fall war die immunhistochemische Färbung normal, aber es bestand eine Mikrosatelliteninstabilität im Tumor und eine pathogene Mutation in hMSH2 konnte nachgewiesen werden. Erstgradig Verwandte der Indexperson, die ebenfalls erkrankt waren und die gleiche Mutation trugen, hatten eine verminderte Expression von hMSH2 in der Immunhistochemie. Es gab zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte bei der Indexperson ein falsch negatives Färbeergebnis bestehen. Zum anderen könnte Inkonsistenz zwischen MSI und Immunhistochemie eine Phänokopie vorliegen. Das hieße, dass bei der Indexperson trotz nachgewiesener Keimbahnmutation ein sporadisches Karzinom vorläge, welches nur den Phänotyp von HNPCC kopiere.

Im hier untersuchten Kollektiv waren 5/147 (3,4 %) der Proben nicht durchführbar oder ergaben falsch negative Ergebnisse. Dies lag deutlich niedriger als bei der Mikrosatellitenanalyse. Dort konnten aufgrund technischer Probleme 9% der Proben (4/44) nicht ausgewertet werden. Im Vergleich zu der Literatur waren 97,8 % aussagekräftige Immunhistochemie ein sehr gutes Ergebnis. Christensen et al.

konnten 28/31 oder 90,3 % der immunhistochemisch gefärbten Schnitte auswerten (60). Wahlberg et al. gelang nur für 50 % der zur Verfügung stehenden Tumore eine immunhistochemische Färbung (68).

Methodenbedingt konnten Unteridentifikationen auftreten. Der verwandte Klon für die Färbung von hMLH1 war immunogen für das gesamte Protein. Der Antikörper gegen hMSH2 erkannte das carboxyterminale Ende des Proteins und der Antikörper gegen hMSH6 erkannte die Aminosäuren 225-333 innerhalb des Proteins.

Proteine, die aufgrund einer Mutation funktionsuntüchtig sind, können zum Teil von den Antikörpern erkannt werden. Sei es, dass der Antikörper gegen einen Teil des Proteins gerichtet ist, der durch die Mutation nicht verändert ist, sei es, dass das funktionsuntüchtige Protein so groß ist, dass es trotzdem von dem Antikörper gebunden wird.

4.4.2 Verteilung der verminderten Proteinexpression auf die verschiedenen Genprodukte

8 Veränderungen betreffen hMLH1, 14 hMSH2, 15 hMSH6. 13 der 15 Veränderungen für hMSH6 kommen kombiniert mit einer Veränderung in hMSH2 vor.

Untersuchungen zeigen, dass die Stabilität von hMSH6 von der Heterodimerisation mit hMSH2 abhängt. Auf dem Transcript Level scheint hMSH6 normal (69). Plaschke et al. berichteten, dass in allen ihrer untersuchten Tumorschnitten eine verminderte Proteinexpression von hMSH2 mit einer verminderten Proteinexpression von hMSH6 einhergeht. Sie zeigten sogar in einem Fall, dass ein defektes hMSH6-Gen mit einer Verminderung der Proteinexpression von hMSH2 verbunden ist, obwohl hMSH2 nicht exklusiv eine Heterodimerisation mit hMSH6 sondern auch mit hMSH3 eingeht (35). Bei hMSH6-defizienten Zelllinien erfolgt eine Kompensation über eine Hochregulation von hMSH3 (70). In den hier vorliegenden Untersuchungen gab es zwei Fälle in denen eine isolierte negative Immunhistochemie für hMSH6 vorliegt. Die Expression von hMSH2 war normal. In beiden Fällen lagen Missense Mutationen vor, einmal in hMLH1, die als Polymorphismus gewertet wurde, und einmal in hMSH2, deren Pathogenität unklar war. Die jeweils pathogene Mutation konnte nicht gefunden werden.

Entgegen den Beobachtungen der Dresdener Arbeitsgruppe (35) lag nicht bei allen Patienten mit einer verminderten Expression von hMSH2 gleichzeitig auch eine Verminderung der Expression von hMSH6 vor. Unser Ergebnis widersprach der oben angeführten für hMSH6 exklusiven Heterodimerisation zwischen hMSH2 und hMSH6. In dem einen in unserem Patientenkollektiv gefundenen Fall mit einer isolierten veränderten Proteinexpression in hMSH2 wurden in der Southern Blot Analyse eine Deletion von Exon 1 bis Exon 6 in hMSH2 gefunden. Zwei mögliche Erklärungen sind zu diskutieren. Erstens: Der gegen das carboxyterminale Ende gerichteten Antikörper ist genau gegen das deletierte Ende des Proteins gerichtet. Möglicherweise wird ein Restprotein gebildet, das eine Heterodimerisation mit hMSH6 eingeht. Oder zweitens die Färbung von hMSH6 ist falsch negativ.

4.4.3 Ergebnisse der Immunhistochemie im Vergleich zur Literatur

In der vorliegenden Untersuchung wurde lediglich ein Tumor mit pathogener Mutation mittels Immunhistochemie nicht erkannt. Voraussetzung war, dass nicht nur der Tumor der Indexperson, sondern aller betroffenen Verwandten untersucht wurde.

Wahlberg et al. konnten für fünf Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation keine verminderte Färbung in der Immunhistochemie finden. Einmal betraf es hMSH2 und vier Mal hMLH1. Die Mutation für hMSH2 war eine Deletion eines Codons und mit der Expression eines fast gleich langen, und damit in der Immunhistochemie noch detektierbaren Proteins verbunden. Für zwei Mutationen in hMLH1 lagen die Mutationen in späten Exonen des Gens, so dass auch von langen exprimierten Proteinen ausgegangen werden musste. Die beiden anderen Mutationen waren „Splice Site“ Mutationen von Exon 8.

Unabhängig davon wurden in dem o. g. Paper Schwierigkeiten mit der Immunhistochemie zugegeben „IHC analysis of MSH2 and MLH1 expression was hampered by a lack of tumor material of sufficient quality“ (68).

Christensen et al. untersuchten insgesamt 42 Patienten, von denen nur 11 den Amsterdamer Kriterien genügten, mit Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse und Sequenzierung. Für 13 Tumore wurde eine Mutation nachgewiesen. Mit 11 von diesen 13 Tumoren war es möglich, eine aussagekräftige immunhistochemische

Färbung durchzuführen. In 9/11 Fällen war eine deutlich verminderte Färbung vorhanden (60).

4.5 Mikrosatellitenanalyse und Immunhistochemie

Wichtig zur Bewertung der Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse war der Vergleich beider Methoden. In der vorliegenden Untersuchung zeigten alle mikrosatellitenstabilen Tumore konsistent auch keine veränderte Proteinexpression. Ebenso waren alle Tumore mit einer verminderten Färbung in der Immunhistochemie mikrosatelliteninstabil. Das hieß, der negative prädiktive Wert sowohl der IHC zur Mikrosatellitenanalyse als auch der Mikrosatellitenanalyse zur IHC ist 100 %.

Für 22 von den 27 mikrosatelliteninstabilen Tumoren (81%) der Indexpatienten konnten veränderte Proteinexpressionen gezeigt werden. In zwei Fällen jedoch wurde eine richtungsweisende immunhistochemisch verminderte Proteinexpression in erstgradig Verwandten nachgewiesen. Bei Färbung aller Tumore von HNPCC-Patienten, für die noch keine Mutation nachgewiesen werden konnte, unabhängig davon, ob der Patient Indexpatient war, ist die Übereinstimmung mit 24/27 oder 88,9 % anzugeben.

Dennoch würde uns die Mikrosatellitenanalyse als Prescreeningmethode in drei Fällen weitergehende Auskünfte geben. In einem von diesen drei Fällen wurde tatsächlich eine pathogene Mutation gefunden.

Die Dresdener Arbeitsgruppe hat eine noch höhere Übereinstimmung von Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse gefunden. In 43 von 44 Tumoren (98 %) war eine Mikrosatelliteninstabilität mit einer verminderten Proteinexpression für mindestens einen Genort vergesellschaftet (35). Lindor et al. konnten in 323/350 (92 %) Tumoren, von denen die Familienanamnese nicht genau aufgeführt wird, einen MSI-H Status mit einer verminderten immunhistochemischen Färbung in Übereinstimmung bringen. Alle MSS oder MSI-L Tumore hatten eine normale Immunhistochemie (65). Thibodeau et al. (31) fanden eine fast vollständige und Cawkwell et al. fanden eine vollständige Übereinstimmung von MSI-H und defekter Proteinexpression bei 66 Tumoren (73) Harversson et. al. zeigten an 128 Patienten, dass die Immunhistochemie mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von

100% einen MMR defizienten Tumor erkennt. (74). Auch Caldes et al. bestätigten die guten Ergebnisse der Immunhistochemie. Sie konnten in ihrer Untersuchung von 28 HNPCC-Patienten eine Sensitivität von 100% erreichen (75).

4.6 Sequenzanalyse

In dem unten aufgeführten Schema wurde bewusst die Methode zur Sequenzanalyse offengehalten.

Die Mutationsanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit durch DGGE und Sequenzierung durchgeführt. Die DGGE wurde im Laufe seiner Entwicklung so verfeinert, dass ein Einzelbasenaustausch mit einer Rate bis zu 100% erkannt wird (39). Die DGGE wurde zur Mutationanalyse von anderen genetischen Erkrankungen angewandt, bei denen die Erkrankung durch eine Einzelbasenveränderung hervorgerufen wird (76, 77). Die Methode der DGGE ist etabliert und hinreichend im Vergleich zur direkten Sequenzierung untersucht, so dass in der vorliegenden Arbeit die Mutationssuche für alle Patienten auf der Basis von DGGE erfolgt (40, 41).

Alternativ zur DGGE steht die „denaturing high-performance liquid chromatography“ (dHPLC) zur Verfügung. Diese Methodik basiert auf der Detektion von Heteroduplexes von PCR-Produkten in der Ionenpaaraustausch-Flüssigkeitschromatographie („ion-pair reverse phase high-performance liquid chromatography“). Hitzedenaturisierung in einem Acetonitril Gradienten führt zur Hybridbildung von Wildtyp und Mutant, welche zu einer verkürzten Retentionszeit in der Chromatographie-Säule führt. Nach Identifikation von Sequenzvarianten sollte dann wie in der DGGE eine Sequenzierung erfolgen. Eine deutsche und eine polnische Arbeitsgruppe haben dieses Verfahren zur Mutationsanalyse mit einer großen Patientenzahl überprüft. Holinski-Feder et al. kamen auf eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 100 % (81). Ebenso gute Ergebnisse hatten Kurzawski et al. (82). Das Verfahren besticht durch Schnelligkeit, Automatisierung und Kostenreduktion im Vergleich auch zur DGGE.

4.7 Bewertung der Prescreeningverfahren und Vorschlag für einen Diagnosealgorithmus

Zusammenfassend kann man sagen, dass in unserer Untersuchung mit einer Ausnahme alle pathogenen Mutationen bei vollständiger Untersuchung durch die

Immunhistochemie als Prescreeningmethode identifiziert wurden. Eine Mutation wurde bei nicht auswertbarer Immunhistochemie verpasst.

Alle pathogenen Mutationen waren, wenn sie einer Mikrosatellitenanalyse unterzogen werden konnten, MSI-H. Auch diese Methode als Prescreeningmethode hatte in unserer Untersuchungsreihe auf alle pathologischen Mutationen hingewiesen.

Die Mikrosatellitenanalyse war im Vergleich zur Immunhistochemie aufwendiger und anspruchsvoller durchzuführen. In der hier vorliegenden Untersuchung führten technische Probleme dazu, dass 9 % der Mikrosatellitenanalysen und 2,7 % der immunhistochemischen Untersuchungen nicht auswertbar waren.

Die Immunhistochemie war einfacher und kostengünstiger. Die Kosten machten nur 14 –28 % der Kosten der Mikrosatellitenanalyse laut Debniak et al. (78) aus.

Bei auffällig konkordanten und damit auch redundanten Ergebnissen von Immunhistochemie und Mikrosatellitenuntersuchung musste man überlegen, ob die Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität sinnvoll war. Diese aufwendige und durch schwankende DNA-Qualität - insbesondere bei Isolierung der DNA aus Formalin fixiertem und in Parafin eingebettetem Gewebe - schwierige Methode könnte durch die Immunhistochemie ersetzt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse legten diesen Schluss nahe. Neben der Einfachheit in der Durchführung und der Kosteneffizienz konnte das Ergebnis der Immunhistochemie zusätzlich auf das entsprechend mutierte Gen hinweisen und somit den Sequenzieraufwand verringern.

So können wir nicht dem Vorschlag von Wahlberg et al. folgen, der die MS-Analyse als Hauptprescreeningverfahren vorschlägt. Für ihn gibt es zu viele Tumore mit einer nachgewiesenen Mutation und normalem immunhistochemischen Färbeargebnis. In seinem untersuchten Patientengut waren es 21 % (68). Bei uns gab es nur einen Fall einer nicht interpretierbaren Färbung und gleichzeitig vorliegender pathogener Mutation. Die dänische Arbeitsgruppe, die eine ähnliche Analyse mit deutlich weniger Patienten durchgeführt hat, als hier vorgelegt, teilt unsere Vorgehensweise und empfiehlt die Immunhistochemie (60). Stormorken et al. halten ebenfalls - basierend auf Untersuchungen von 56 Familien - die Immunhistochemie in Kombination mit den Amsterdamer Kriterien für ein probates und kosteneffizientes Mittel, um Patienten zur Mutationsanalyse auszuwählen (80).

Aufgrund der hier vorliegenden Arbeit bestätigt durch die Beobachtungen in der Literatur wird eine Vorgehensweise basierend auf der Immunhistochemie als primäres Prescreeningverfahren gemäß der unten aufgeführten Flow Chart vorgeschlagen.

Wenn möglich sollten alle Tumore von Patienten mit kolorektalen Karzinomen immunhistochemisch untersucht werden.

Bei vermindertem Färbeergebnis ist die Mutationsanalyse für das entsprechende Gen angezeigt.

Ist die immunhistochemische Färbung aller Gene jedoch normal, hängt die weitere Vorgehensweise davon ab, ob die Patienten aus einer Amsterdamer Familie stammen oder den Bethesda Kriterien genügen.

Bei Karzinomen, die sporadisch oder in einer Bethesda Konstellation auftreten, wird auf eine weitere labortechnische Untersuchung verzichtet.

Für Patienten aus Amsterdam I und II-Familien empfehlen wir ähnlich wie Vasen et al. (79) bei normaler immunhistochemischer Färbung eine Mikrosatellitenanalyse anzuschließen.

Liegt eine Mikrosatelliteninstabilität vor, ist die Durchführung der Sequenzanalyse indiziert.

Eine weitere onkologisch klinische Betreuung entsprechend dem persönlichen Risikoprofil ist angeraten.

Ist auch bei Amsterdamer Familien der Tumor MSS und ohne Veränderung in der Immunhistochemie sollte die Familie klinisch betreut und auf das Erfordernis intensiverer Vorsorge- und Früherkennungsmaßnahmen für alle Verwandten der Indexperson hingewiesen werden.

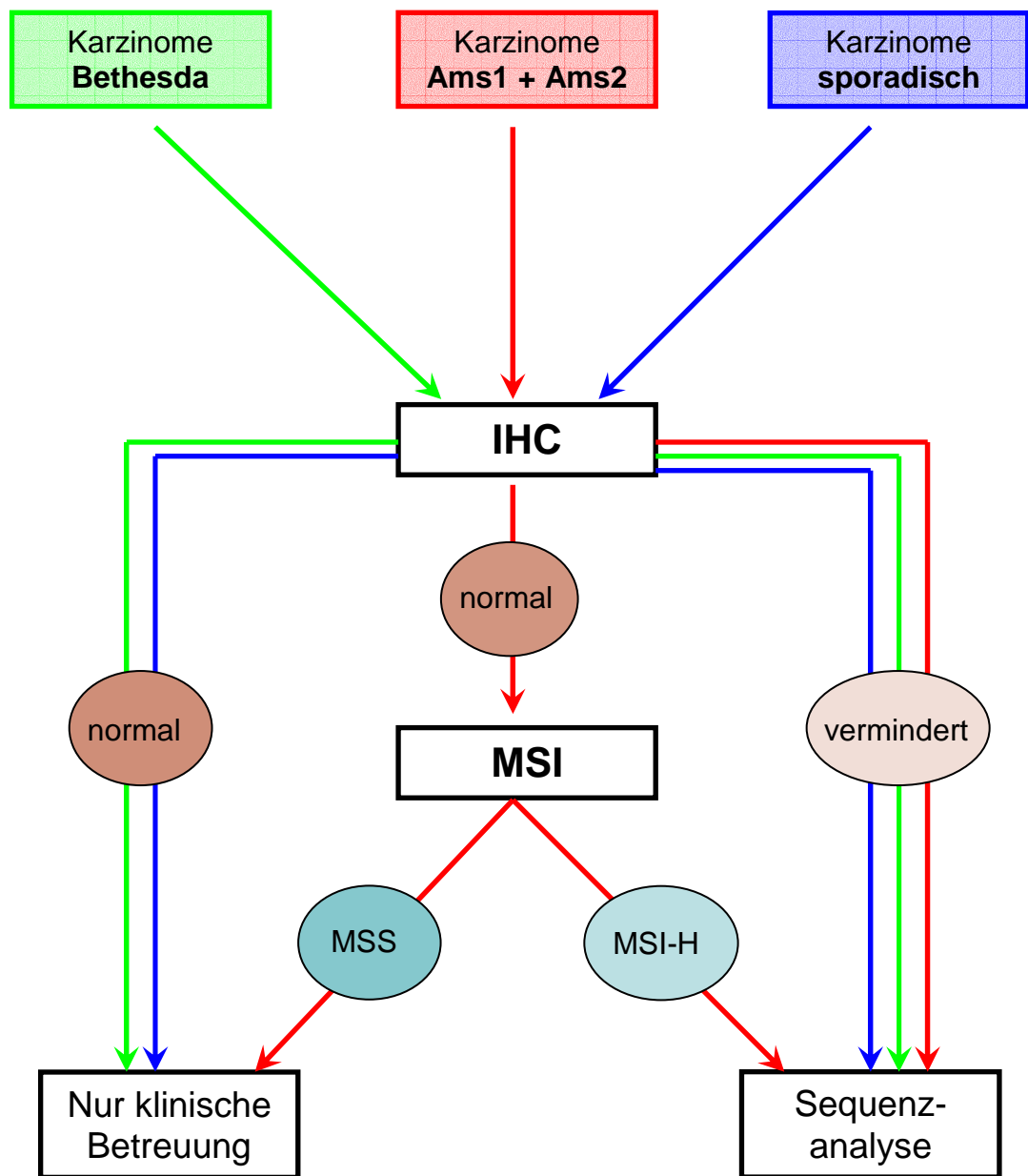


Abbildung1: Flow-Chart zur Anwendung der Prescreening-Verfahren

5 Referenzen

- (1) Abdel-Rahman, W.M., Peltomaki, P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers Ann Med. 36(5): 379-88 (2004)
- (2) Lynch, H.T., de la Chapelle, A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer J Med Genet 36 : 801-818 (1999)
- (3) Rodriguez-Bigas, M.A., Boland, C.R., Hamilton, S.R., Henson, D.E., Jass, J.R., Khan, P.M., Lynch, H.T., Perucho, M., Smyrk, T., Sbin, L., Srivastava, S.A., National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome : meeting highlights and Bethesda Guidelines J Natl Cancer Inst 89 :1758-1762 (1997)
- (4) Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovarra, R., Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes Int J Cancer 81:214-218 (1999)
- (5) Vasen, H.F.A., Mecklin, J.P., Meera Khan, P.M., Lynch, H.T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) Dis Colon Rectum 34:424-5 (1991)
- (6) Vasen, H.F.A., Watson, P., Mecklin, J.P., Lynch H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrom) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC Gastroenterology 116:1454-1456 (1999)
- (7) Bellacosa, A., Genuardi, M., Anti, M., Viel, A., Ponz de Leon, M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: review of clinical, molecular genetics and counselings aspects Am J Med Genet 62: 353-364 (1996)
- (8) Umar, A., Boland, R., Terdiman, J.P. , Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L. J., Hamelin, R., Hamilton, R., Hiatt, R. A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Ramsey, S.D., Rodriguez-Bigas, M.A., Vasen, H.F.A., Hawk, E.T., Barrett, J.C., Freedman, A.N., Srivastava, S. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability J Natl Cancer Inst 96 (4): 261-268 (2004)
- (9) Moslein, G. Tester, D.J., Lindor, N. M. Honchel, R. Cunningham, J. M., French, A. H. Halling, K.C., Schwab, M., Goretzki, P., Thibodeau, S.N. Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in patients with sporadic, familial and hereditary colorectal Cancer Hum Mol Genet 5(9):1245-1252 (1996)
- (10) Miyki, M., Konishi, M., Muraoka, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Iwama, T., Mori, T., Koike, M., Ushio, K., Chiba, M., Nomizu, S., Utsunomiya, J. Germ line mutations of hMSH2 and hMLH1 genes in Japanese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): usefulness of DNA analysis for screening and diagnosis of HNPCC patients J Mol Med 73:515-520 (1995)

- (11) Buerstedde J.M., Alday, P., Torhorst, J., Weber, W., Müller, H., Scott, R. Detection of new mutations in six out of 10 Swiss HNPCC families by genomic sequencing of the hMSH2 and hMLH1 genes J Med Genet 32:909-912 (1995)
- (12) Liu, B., Parson, T. Papadopoulis, N., Nicolaides, N.C., Lynch, H. T., Watson, O. Jass, J.T., Dunlop, M., Wyllie, A., Jessup, J.M., Peltomäki, P. de la Chapelle, A., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients Nature Med 2:169-174 (1996)
- (13) Plaschke, J., Kruger, S., Dietmaier, W., Gebert, J., Sutter, C., Mangold, E., Pagenstecher, C., Holinski-Feder, E., Schulmann, K., Moslein, G., Ruschoff, J., Engel, C., Evans, G., Schackert, H.K., German HNPCC Consortium Eight novel MSH6 germline mutations in patients with familial and nonfamilial colorectal cancer selected by loss of protein expression in tumor tissue. Hum Mutat. 23(3): 285 (2004)
- (14) Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., et al Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer [letter] Nat Genet 17: 271-2 (1997)
- (15) Wijnen, J., de Leeuw, W., Vasen, H., et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations [letter] Nat Genet 23: 142-4 (1999)
- (16) Kolodner, R.D., Tytell, J.D., Schmeits, J.L. et al. Germline MSH6 mutations in colorectal cancer families. Cancer Res 59:5068-74 (2000)
- (17) Plaschke, J., Engel, C., Kruger, S., Holinski-Feder, E., Pagenstecher, C., Mangold, E., Moeslein, G., Schulmann, K., Gebert, J., von Knebel Doeberitz, M., Ruschoff, J., Loeffler, M., Schackert, H.K. Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium J Clin Oncol 22(22) 4486-94 (2004)
- (18) Halbert, C.H., Lynch, H., Lynch, J., Main, D., Kucharski, S., Rustgi, A.K., Lerman, C. Colon cancer screening practices following genetic testing for hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) mutations Arch Intern Med 164 (17): 1991-7 (2004)
- (19) Hadley D.W., Jenkins J.F., Dimond E., de Carvalho, M., Kirsch, I., Palmer, C.G. Colon cancer screening practices after genetic counseling and testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer J Clin Oncol 22(1): 39-44 (2004)
- (20) Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis Nature (Lond.) 363:558-561 (1993)
- (21) Kolodner, R.D., Marsischky, G.T. Eukaryotic DNA mismatch repair Curr Opin Genet Dev 9:89-96 (1999)
- (22) Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Jass, J.R., Green, J. S., Lynch, H. T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M. Sistonen, P., Hamilton, S.R.,

Kinzler, K. W., Vogelstein, B., de la Chapelle, A. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients Cancer Res 54:1645-1648 (1994)

(23) Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S. et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMHS3 und hMSH6 Proc Natl Acad Sci USA 93:13629-34 (1996)

(24) Umar, A. Risinger, J.I., Glaab, W.E., et al. Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6 Genetics 148:1637-46 (1998)

(25) Edelmann, W., Yang, K., Umar, A., et al Mutation in the mismatch repair gene MSH6 causes cancer susceptibility Cell 91: 467-77 (1997)

(26) Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J., Burt, R., Meltzer, S., Rodriguez-Bigas, M., Fodde, R., Ranzani, N., Srivastava, S.A., National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer Cancer Res 58: 5248-5257 (1998)

(27) Jass, J. R., Biden, K. G., Cummings, M.C., Simms, L.A., Walsch, M., Schoch, E., Meltzer, S.J., Wright, C., Searle, J., G., Young, J., and Leggett, B. Characterization of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. J. Clin. Pathol. 52: 455-460 (1999)

(28) Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Muraoka, M., Onda, A., Okumura, Y. Kishi, N., Iwama, T., Mori, T., Koike, M., Ushio, K., Chiba, M., Nomizu, S., Konishi, F., Utsunomiya, J., Miyaki, M. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer, familial polyposis and sporadic colon cancer Gastroenterology, 111: 307-317 (1996)

(29) Biden, K. G., Simms, L. A., Cummings, M. Buttenshaw, R., Schoch, E., Searle, J., Gobe, G., Jass, J. R., Meltzer, S. J. , Leggett, B.A., Young, J. Expression of Bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. Oncogene, 18: 1245-1249 (1999)

(30) Dietmaier, W., Wallinger, S., Bocker, T., Kullmann, F., Fishel, R., Rüschoff, J. Diagnostic Microsatellite Instability: Definition and Correlation Mismatch Repair Protein Expression Canc Res 57: 4749-4756 (1997)

(31) Thibodeau, S.N., French,A.J., Cunningham, J.M., Tester, D., Burgart, L.J., Roche, P.C., McDonnell, S.K., Schaid, D.J., Walsh Vockley, C., Michels, V.V., Farr, G.H., O'Connell, M.J. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principle involvement of hMLH1 Cancer Res 58:1713-1718 (1998)

(32) Bocker, T., Diermann, J., Friedl, W., Gebert, J., Holinski-Feder, E., Karner-Hanusch, J., von Kneber-Doerberitz, M., Koelble, K., Moeslein, G., Schackert, H.K., Wirtz, H.C., Fishel, R., Ruschoff, J. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control Cancer Res 57: 4739-4743 (1997)

- (33) Thibodeau, S.T.N., French, A. J., Roche, P.C., Cunningham, J.M., Tester, D. J., Lindor, N.M., Moslein, G., Baker, S.M., Liskay, R.M., Burgart, L.J., Honchel, R., Halling K.C. *Altered Expression of hMSH2 and hMLH1 in Tumors with Microsatellite Instability and Genetic Alterations in Mismatch Repair Genes* *Canc Res* 56: 4836-4840 (1996)
- (34) Vossen, S., Möslein, G., Katzer, M., Gabbert, H. E., Müller, W., Wirtz, C., Goretzki, P.E., Röher, H. D. *Untersuchung der Proteinexpression von hMSH2 und hMLH1 bei HNPCC: Evaluation einer Prescreening Methode* *Langenbecks Arch Chir Suppl II* 1461-1463 (1998)
- (35) Plaschke, J., Krüger, S., Pistorius, S., Theissig, F., Saeger, H.D., Schackert, H.K. *Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation* *Int J Cancer* 97:643-648 (2002)
- (36) Halvarsson, B., Lindblom, A., Johansson, L., Lagerstedt, K., Nilbert, M. *Loss of mismatch repair protein immunostaining in colorectal adenomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer* *Mod Pathol* 25 (2005) Epub
- (37) Chaves, P., Cruz, C., Lage, P., Claro, I., Cravo, M., Leitao, C.N., Soares, J. *Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful toll for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype* *J Pathol* 191: 355-360 (2000)
- (38) Müller, W., Burgart, L.J., Krause-Paulus, R., Thibodeau, S.N., Almeida, M., Bocker Edmonston, T., Boland, C.R., Sutter, C., Jass, J.R., Lindblom, A. , Lubinski, J., MacDermot, K., Sander, D.S.A., Morreau, H., Müller, A., Oliani, C., Orntoft, T., Ponz De Leon, M., Rosty, C., Rodriguez-Bigas, M., Rüschoff, J., Ruzskiewicz, A., Sabourin, J., Salovaara, R., Möslein, G., ICG-HNPCC *The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)- Results of an international collaborative study* *Familial Cancer* 1: 87-92, (2001)
- (39) Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M. *Attachment of a 40 G+C-rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes* *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 232-236 (1989)
- (40) Fodde, R., Losekoot, M. *Mutation Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)* *Hum Mutat* 3: 83-94 (1994)
- (41) Wijnen, J., Vasen H., Meera Khan, P., Menko, F.H., van der Klift, H., van Leeuwen, C., van den Broek, M., van Leeuwen-Cornelisse, I., Nagengast, F., Meijers-Heijboer, A., Lindhout, D., Griffioen, G., Cats, A., Kleibeuker, J., Varesco, L., Bertario, L., Bisgaard, M.L., Mohr, J., Fodde, R. *Seven New Mutations in hMSH2, an HNPCC Gene, Identified by Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis* *Am J Hum Genet* 56:1060-1066 (1995)
- (42) Kolodner, R.D., Hall, N.R., Lipford, J.K., Kane, M.F., Rao, M.R. Morrison, P., Wirth, L. Finan, P.J., Burn, J., Chapman, P. *Structure of the human MSH2 locus and*

analysis of two Muir-Torre kindreds for MSH2 mutations genomics 24(3): 516-26 (1994)

(43) Kolodner, R.D., Hall, N.R., Lipford, J., Kane M.F., Morrison, P.T., Finan, P.J., Burn, J. et al. Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for MLH1 mutations. Cancer Res 55:242-248 (1995)

(44) Liu, B., Nicolaidis, C., Markowitz, S., Willson, J.K.V., Parson, R.E., Jen, J., Papadopoulos, N. et al. Mismatch repair gene defects in spradic colorectal cancers with microsatellite instability Nat. Genet 9:48-55 (1995)

(45) Fodde, R., van der Luijt, R., Wijnen, J., Tops, C., van der Klift, H., van Leeuwen-Cornelisse, I., Griffioen, G., Vasen, H., Meera Khan, P. Eight novel inactivating Germ Line Mutations at the APC Gene identified by denaturing Gel Electrophoresis Genomics 13, 1162-1168 (1992)

(46) Wijnen, J., Meera Khan, P., Vasen, H. et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16 Am J Hum Genet 58:300-7 (1996)

(47) Wu, Y., Nyströmm-Lahti, M., Osinga, J. Looman M.W.G., Peltomäki, P. Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A., Hofstra, R.M.W., Buys, C.H.C.M. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis Genes-Chromosomes-Cancer 18(4):269-78 (1997)

(48) Wijnen, J., van der Klift, H., Vasen, H., Meera Khan, P., Menko, F., Tops, C., Meijers Heijboer, H., Lindhout, D. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC nat genet 20: 326-328 (1998)

(49) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12): 5463–5467 (1977)

(50) Borresen, A.L., Lothe, R.A., Meling, G.I., Lystad, S., Morrison, P., Lipford, J., Kane, M.F., Rognum, T.O., Kolodner, R.D. Somatic mutations in the hMSH2 gene in microsatellite unstable colorectal carcinomas. Hum Mol Genet. 4(11):2065-72 (1995)

(51) Wijnen, J.T., Vasen, H.F.A., Meera Khan, P., Zwinderman, A.H., van der Klift, H., Mulder, A., Tops, C., Moller, P., Fodde, R. Clinical Findings with Implications for Genetic Testing in Families with Clustering of Colorectal Cancer N Engl J Med 339:511-518 (1998)

(52) Tannergard, P. Lipford, J.R., Kolodner, R. Frödin, J.E., Nordenskjöld, M. Lindblom, A. Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish HNPCC-families Cancer res 55: 6092-6096 (1995)

(53) Friedl, W., Lamberti, C., Caspari, R., Buschhausen, L., Wehner, M., Kruse, R., Bruns, A., Ruelfs, C., Sengteller, M., Propping, P., HNPCC: Examination for

Microsatellite Instability and Germline Mutations ICG-HNPCC Eighth Annual Meeting 1996

(54) Wahlberg, S.S. Few Mutations in the hMSH2 Gene in Swedish HNPCC Families Found by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ICG-HNPCC Eighth Annual Meeting 1996

(55) Weber, T.K., Conlon, W., Petrelli, N.J. et al. Genomic DNA-based hMSH2 and hMLH1 mutation screening in 32 eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees. Cancer Res 57:3798-803 (1997)

(56) Caldes, T., Godino J., de la Hoya M., Garcia Carbonero, I., Perez Segura, P., Eng, C., Benito, M., Diaz-Rubio, E. Prevalence of germline mutations of MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain Int J Cancer 98(5):774-9 (2002)

(57) Mangold, E., Pagenstecher, C., Friedl, W., Mathiak, M., Buettner, R., Engel, C., Loeffler, M., Holinski-Feder, E., Muller-Koch, Y., Keller, G., Schackert, H.K., Kruger, S., Goecke, T., Moeslein, G., Kloor, M., Gebert, J., Kunstmann, E., Schulmann, K., Ruschoff, J., Propping, P. Spectrum und frequencies of mutations in MSH2 und MLH1 identified in 1721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer Int J Cancer 116(5): 692-702 (2005)

(58) Taylor, C.F., Charlton, R.S., Burn, J., Sheridan, E., Taylor, G.R. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA Hum Mutat. 22(6): 428-33 (2003)

(59) Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Leach F., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin J-P., Järvinen, H., Powell, S., Jen, J., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and de la Chapelle, A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science (Wash. DC), 260: 812-816 (1993)

(60) Christensen, M., Katballe, N., Wikman, F., Primdahl, H., Sorensen, F.B., Laurberg, S., Ørntoft, T. Antibody-Based Screening for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Compared with Microsatellite Analysis and Sequencing Cancer 95: 2422-2430 (2002)

(61) Cunningham, J.M., Kim C.Y., Christensen, E.R., Tester, D.J., Parc, Y., Burgart, L.J., Halling, K.C., McDonnell, S.K., Schaid, D.J., Walsh Vockley, C., Kubly, V., Nelson, H., Michels, V.V., Thibodeau, S.N. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas Am J Hum Genet 69:780-790 (2001)

(62) Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M. Kolodner R.D. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines Cancer Res 57:808-811 (1997)

(63) Herman, J. G., Umar, A., Polyak, K., Graff, J. Rr., Ahuja, N., Issa, J. P., Markowitz, S. Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., Kane, M.F., Kolodner,

R.D., Vogelstein, B., Kunkel, T. A., Baylin, S.B. *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma* Proc Natl Acad Sci USA 95:6870-6875 (1998)

(64) McGivern, A., Wynter C.V., Whitehall, V.L., Kambara, T., Spring, K.J., Walsh, M.D., Barker, M.A., Arnold, S., Simms, L.A., Leggett, B.A., Young, J., Jass, J.R. *Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer* Fam Cancer 3(2): 101-7 (2004)

(65) Lindor, N.M., Burgart, L.J., Leontovich, O., Goldberg, R.M. Cunningham, J.M., Sargent, D.J., Walsh Vockley, C., Petersen, G.M., Walsh, M.D., Leggett, B.A., Young, J.P., Barker, M.A., Jass, J.R., Hopper, J., Gallinger, S., Bapat, B., Redston, M., Thibodeau, S.N., *Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors* J Clin Oncol 20:1043-1048 (2002)

(66) Loukoly, A., Eklin, K., Laiho, P., Salovaara, R., Kristo, P., Järvinen, H., Mecklin, J-P., Launonen, V., Aaltoneen L.A. *Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)* Cancer Research 61, 4545-4549 (2001)

(67) Muller, A., Giuffre, G., Edmonston T.B., Mathiak, M., Roggendorf, B., Heinmoller, E., Brodegger, T., Tuccari, G., Mangold, E., Buettner, R., Ruschoff, J; German HNPCC Consortium German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe) *Challenges and pitfalls in HNPCC screening by microsatellite analysis and immunohistochemistry* J Mol Diagn 6(4): 308-15 (2004)

(68) Wahlberg, S.S., Schmeits, J., Thomas, G., Loda, M., Garber, J., Syngal, S., Kolodner, R.D., Fox, E. *Evaluation of mikrosatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germline MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families* Cancer Res 62: 3485-3492 (2002)

(69) Chang, D.K., Ricciardiello, L., Goel, A. et al. *Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system* J Biol Chem 275: 18424-31 (2000)

(70) Genschel, J. Littmann, S.J., Drummond J.T., et al. *Isolation of MutS β from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS β and MutS α* J Biol Chem 273:19895-901 (1998)

(71) Trojan, J., Zeuzem, S., Randolph, A., Hemmerle, C., Brieger, A., Raedle, J., Plotz, G., Jiricny, J., Marra, G. *Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system* Gastroenterology 122(1):211-9 (2002)

(72) Nystrom-Lahti, M., Perrera C., Raschle, M., Panyushkina-Seiler, E., Marra, G., Curci, A., Quaresima, B., Costanzo, F., D'Urso, M., Venuta, S., Jiricny, J. *Functional analysis of MLH1 mutations linked to hereditary nonpolyposis colon cancer* Genes Chromosomes Cancer 33(2):160-7 (2002)

- (73) Cawkwell, L., Gray, S., Murgatroyd, H., et al. *Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair* Gut 45: 409-415 (1999)
- (74) Halvarsson, B., Lindblom, A., Rambech, E., Lagerstedt, K., Nilbert, M. *Microsatellite instability analysis and /or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer?* Virchows Arch. 444(2): 135-41 (2004)
- (75) Caldes, T., Godine, J., Sanchez, A., Corbacho, C., de la Hoya, M., Lopez Asenjo, J., Saez, C., Sanz, J., Benito, M., Ramon, Y., Cajal, S., Diaz-Rubio, E. *Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer* Oncol Rep 12(3): 621-9 (2004)
- (76) Attree, O., Vidaud, D., Vidaud, M., Amselem, S., Lavergne J.M., Goossens, M. *Mutations in the catalytic domain of human coagulation factor IX: rapid characterization by direct genomic sequencing of DNA fragments displaying an altered melting behavior* Genomics 4(3): 266-72 (1989)
- (77) Traystman, M.D., Higuchi, M., Kasper, C.K., Antonarakis, S. E., Kazazian, H.H.Jr. *Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect point mutations in the factor VIII gene* Genomics 6(2): 293-301 (1990)
- (78) Debnia, T., Kurzawki, G., Gorski, B., et al.: *Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer* Eur J Cancer 36: 49-54 (2000)
- (79) Vasen, H.F., Hendriks, Y., de Jong A.E., van Puijenbroek, M., Tops, C. Brocker-Vriends, A.H., Wijnen, J.T., Morreau, H. *Identification of HNPCC by molecular analysis of colorectal and endometrial tumors* Dis Markers 20(4-5): 207-13 (2004)
- (80) Stormorken, A.T., Muller, W., Lemkemeyer, B., Apold, J., Wijnen, J.T., Fodde, R., Moslein, G., Moller, P. *Prediction of the outcome of genetic testing in HNPCC kindreds using the revised Amsterdam criteria and immunohistochemistry* Fam. Cancer 1(3-4): 169-73 (2001)
- (81) Holinki-Feder, E., Müller-Koch, Y., Friedl, W., Moeslein, G., Keller, G., Plaschke, J., Ballhausen, W., Gross, M., Baldwin-Jedele, K., Jungck, M., Mangold, E., Vogelsang, H., Schackert, H.-K., Lohse, P., Murken, J., Meitingner, Th. *DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC) genes hMLH1 and hMSH2* J. Biochem. Biophys. Methods 47: 21-32 (2001)
- (82) Kurzawski, G., Safranow, K., Suchy, J., Chlubek, D., Scott, R.J., Lubinski, J. *Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography* J. Biochem. Biophys. Methods 51: 89-100 (2002)
- (83) Shin, K.H., Shin, J.H., Kim, J.H., Park, J.G. *Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes in hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis*

colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the hMSH2 gene. Cancer Res 62(1):38-42 (2002)

(84) Syngal, S., Fox, E.A., Eng, C., Kolodner, R.D., Garber, J.E. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 und MLH1 J Med Genet 37:641-645 (2000)

(85) Lindor, N.M., Rabe, K., Petersen, G.M., Haile, R., Casey, G., Baron, J., Gallinger, S., Bapat, B., Aronson, M., Hopper, J., Jass, J., LeMarchand, L., Grove, J., Potter, J., Newcomb, P., Terdiman, J.P., Conrad, P., Moslein, G., Goldberg, R., Ziogas, A., Anton-Culver, H., deAndrade, M., Siegmund, K., Thibodeau, S.N., Boardman, L.A., Seminara, D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X JAMA 293(16):2028-30 (2005)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: VOSSEN-HOLZENKAMP
Vorname: Sandra
Adresse: Luegallee 26
40545 Düsseldorf
Tel: 0163/3342122
E-Mail: SandraVossen@web.de
Geburtsdatum: 10. April 1967
Geburtsort: Aachen
Familienstand: verheiratet, ein Kind (1992)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

bis 1984: Staatliches Gymnasium an der Stadtmauer,
Bad Kreuznach
1984 - 1985: Oneida Senior High School, Oneida, USA
(Rotary International Exchange Program)
1985: Graduation mit Regents Diploma des Staates New York
1985 - 1987: Staatliches Gymnasium an der Stadtmauer,
Bad Kreuznach
1987: Abitur

Hochschulstudium

1987 - 1994: Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität in
Düsseldorf
1989: Physikum
1989: Medical College Admission Test (MCAT)
1990: Erstes Medizinisches Staatsexamen
1990 - 1991: Medizinstudium an der Universität Nantes, Frankreich
(Erasmus Stipendium der Europäischen Union)
1993: Zweites Medizinisches Staatsexamen
1994: Drittes Medizinisches Staatsexamen

Praktisches Jahr

1993 - 1994:

- Chirurgie und Innere Medizin
an der Universitätsklinik Düsseldorf
- Wahlfach Neurochirurgie unter Prof. D. Fohano,
Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, Frankreich (Erasmus
Stipendium)

Ärztliche Tätigkeit

- 01.04.1995 – 31.03.1996 Forschungsaufenthalt am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin: Mutationssuche bei Familien mit HNPCC
- 01.01.1995 - 31.12.1996 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Allgemeine und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.-D. Röher
- 01.01.1997 – 31.12.2003 Weiterbildungsassistentin an der Klinik für Allgemeine und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.-D. Röher
- 01.12.1998 – 31.01.1999 Forschungsaufenthalt im Labor der Sektion für Humangenetik der Universität Leiden, NL
Leiter: Prof. Dr. R. Fodde
- 26.10.1999 – 07.07.2000 Gastärztin an der chirurgischen Abteilung I. des Instituto Portugues de Oncologia Francisco Gentil, Lissabon, Portugal
Direktor: Prof. Dr. med. J. Mendes de Almeida
- 27.11.2002 Fachärztin für Chirurgie
- 01.01.2004 – 30.09.2005 Weiterbildung im Bereich Gefäßchirurgie in der Klinik für vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie des Klinikums Krefeld
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. B. Luther
- 01.10.2005 – heute Weiterbildung im Bereich Handchirurgie in der Abteilung für Handchirurgie des St. Josefhospital in Essen-Kupferdreh
Leitender Arzt: Dr. med. K.J. Steffens

Düsseldorf, den 19.06.2006

Sandra Vossen-Holzenkamp

Der Stellenwert der Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse als Prescreeningverfahren zur Identifikation von Mutationen bei Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

Zielsetzung:

HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) ist eines der häufigsten Karzinomprädispositionssyndrome, die einer molekulargenetischen Diagnostik zugänglich sind. Mutationsträger profitieren von der Kenntnis ihres Status, weil durch geeignete Früherkennungsprogramme Vorstufen oder Frühkarzinome erkannt und geheilt werden können. So muss es Ziel sein, bei hinreichendem klinischen Verdacht, eine möglichst kosten- und zeiteffiziente Mutationsdetektion durchzuführen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stellenwert der Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der immunhistochemischen Untersuchungen (IHC) für hMLH1, hMSH2 und hMSH6 als Prescreeningverfahren vor DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) und Sequenzanalyse in der Mutationssuche zu evaluieren.

Material und Methoden:

Die Studie schloss 69 Patienten ein, die den strengen Amsterdam-I-oder II-Kriterien genügten. Es wurde bei allen Patienten eine Sequenzanalyse durchgeführt. Als Prescreeningverfahren dienten die Mikrosatelliteninstabilität am Paraffin-eingebetteten Tumormaterial und die Immunhistochemie. Als Marker fand das „Bethesdapanel“ Verwendung. Immunhistochemisch wurden die Proteinprodukte von hMLH1, hMSH2 und hMSH6 entsprechend dem Protokoll der ICG-HNPCC (International Collaborative Group of HNPCC) untersucht. Unabhängig von MSI und IHC erfolgte die DGGE-Untersuchung für alle drei Genorte. Bei Verdacht einer Mutation in der DGGE folgte die direkte Sequenzanalyse als geforderter Goldstandard. Zusätzlich wurde ein Southern Blot durchgeführt, um Exonverluste nachweisen zu können.

Ergebnisse:

Von den 69 Patienten lag von 51 Patienten Tumormaterial zur Untersuchung von MSI und zur immunhistochemischen Färbung vor.

In der Mikrosatellitenanalyse waren 28/42 (67%) der Tumore hochinstabil. Veränderungen der Proteinexpression waren in 25/50 (50 %) Tumoren nachweisbar. In allen Fällen, in denen eine veränderte Proteinexpression vorlag, lag auch ein hochinstabiler Mikrosatellitenstatus vor. Ebenso gilt, dass für keinen mikrosatellitenstabilen Tumor eine veränderte Proteinexpression gezeigt werden konnte.

In der Sequenzanalyse mit DGGE und direkter Sequenzierung von 69 Patienten wurden in 35 Patienten 41 Sequenzveränderungen gefunden. 20 Mutationen sind als pathogen und 8 als unklar pathogen identifiziert worden. Die Southern Blot Untersuchung wurde an 48 Patienten durchgeführt. Es wurden 5 genomische Deletionen nachgewiesen.

Die Immunhistochemie und die Mikrosatellitenanalyse konnten alle pathogenen Mutationen sicher erfassen, wenn sie konsequent angewandt wurden und auswertbar waren.

Fazit:

Immunhistochemie und Mikrosatellitenanalyse konnten als Prescreeningverfahren an einer großen Anzahl von HNPCC-Patienten (n=69) nach Amsterdamer Kriterien durchgeführt werden. Alle Tumore, die eine veränderte Proteinexpression aufwiesen, waren mikrosatelliteninstabil. Sowohl die Mikrosatellitenanalyse als auch die Immunhistochemie wiesen in dieser Untersuchung sicher auf das Vorliegen einer pathogenen Mutation hin.

Diese Arbeit belegt, dass es zur Effizienzsteigerung gerechtfertigt ist, zunächst die Immunhistochemie als Prescreeningverfahren als einfacheres, billigeres und sicheres Verfahren anzuwenden. Zusätzlich bietet die Immunhistochemie die Möglichkeit, die weitere Mutationsanalyse mittels DGGE und Sequenzanalyse auf einen Genort zu beschränken. Alle Karzinome von Patienten, die eine besondere Risikokonstellation aufweisen wie junges Alter (< 50 Jahre), syn- oder metachrone Karzinome oder eine familiäre Häufung sollten immunhistochemisch untersucht werden. Zusätzlich ist bei Patienten, die aus Familien stammen, die den Amsterdamer Kriterien genügen, und ein normales Färbeergebnis in der Immunhistochemie zeigen, es gerechtfertigt, eine Mikrosatellitenanalyse anzuschließen. Es wurde ein Flow Chart zur Anwendung der Prescreeningmethoden entwickelt.