Institut für Pathologie
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. A. Marx
und Prof. Dr. med. Guido Sauter

Tissue Microarrays zur Evaluation der molekularen Eigenschaften von

Cronkhite-Canada-Polypen
und
nicht adenomatösen Polypen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Pawel Mariusz Bralla
aus Danzig

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg

auf Antrag von Prof. Dr. med. G. Sauter

am: 16.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Izbicki

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2009

Meinen Eltern.

Mariola Bralla, geb. Lizewska
Mariusz Bralla

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 5

2. Material und Methoden 11

2.1 Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom 11

- **2.1.1 Anamnese 11**
- **2.1.2 Pathologischer Befund 12**

2.2 Erstellung von Tissue-Microarrays 14

- **2.2.1 Prinzip 14**
- **2.2.2 Methode und Gerät 15**
  - **2.2.2.1 TMA-Herstellung 15**
  - **2.2.2.2. TMA-Färbung und -Analyse 18**
- **2.2.3. Herstellung eines TMA aus dem Kolon einer Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom 19**
- **2.2.4. Herstellung eines TMA bestehend aus Hyperplastischen Polypen 20**

2.3. Immunhistochemie 21

2.4.Statistik 22

3.Resultate 23

3.1. Technische Aspekte 23

3.2. Immunhistochemie 24

3.3. Beziehung zum Phänotyp der Polypen 30

4. Disskusion 49

5. Zusammenfassung 53

6. Literatur 55

Danksagung 58

Lebenslauf 59

Erklärung 60

1. Einleitung

Das Kolonkarzinom ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Neoplasie und stellt die zweithäufigste Krebstodesursache dar. Die endoskopische Untersuchung des Darms zum Frühnachweis von Karzinomen bzw. ihrer Vorstufen ist deswegen eine der häufigsten Untersuchungen in der Gastroenterologie. Krebsvorstufen werden deswegen häufig im Kolon gefunden und histologisch untersucht. Die klassische Kolonkarzinomvorstufe ist das Kolonschleimhautadenom, wobei low grade und high grade Adenome unterschieden werden (Ikeda, Y. et al. 2002). Das Entartungsrisiko von Adenomen hängt vom Atypiegrad und der Wuchsform (villös vs. tubulär) ab und beträgt ca. 10 % (Shinya, H. et al. 1979). Hyperplastische Kolonschleimhautpolypen stellen einen weiteren häufigen Befund in Kolonbiopsien dar. Lange Zeit wurden Hyperplastische Polypen als banale nicht neoplastische Epithelproliferationen ohne Entartungsrisiko betrachtet (Urbanski et al. 1984). Neue Untersuchungen haben aber gezeigt, dass auch hyperplastische Polypen neoplastische Proliferate darstellen. Hyperlastische Polypen weisen häufig genetische Alterationen wie BRAF-Mutationen (67%) und Methylierung spezifischer DNA-Sequenzen (Jass J.R. et al 2006) auf. Die häufigsten molekularen Veränderungen von hyperplastischen Polypen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Starke Expression von MUC2 und MUC5AC (100% / 100%)	Kim et al. 2005
BRAF-Mutation (69,6%)	Yang et al. 2004
Hypermethylierung der DNA	O´Brien et al 2004
Methylierung von MINT 2 → 49,4%	O´Brien et al 2004
Methylierung von hMLH1 → 46,8%	O´Brien et al 2004
Methylierung von MINT 1 → 34,2%	O´Brien et al 2004
Methylierung von p16 → 29,1%	O´Brien et al 2004
Methylierung von MGMT → 26,6%	O´Brien et al 2004
KRAS-Mutation → 19,0%	O´Brien et al 2004

Tab. 1 Zusammenstellung der häufigsten molekularen Veränderungen von hyperplastischen Polypen

Adenome vom Sägeblatttyp stellen eine zusätzliche, erst kürzlich erkannte Entität dar, welche wahrscheinlich aus hyperplastischen Polypen entstehen und trotz relativ blander Histologie ein erhebliches Entartungsrisiko aufweisen (Longacre TA et al. 1990). Es wird angenommen, dass bis zu 6 % der Kolonkarzinome aus Adenomen vom Sägeblatttyp entstehen (Makinen, M.J. et al. 1996).

Ca. 10% der Kolonkarzinome sind genetisch bedingt. Am häufigsten ist das so genannte hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), welches typischerweise im rechten Kolon gefunden wird. Diese Tumoren werden durch mismatch repair Gendefekte mit konsekutiver Mikrosatelliteninstabilität hervorgerufen (Kinzler KW et al. 1996). Die familiäre adenomätöse Polyposis Coli ist seltener und kommt bei zwischen 1: 17000 (Jarvinen et al. 1984) und 1:7500 Personen vor (Reed et al. 1955). Ein autosomal dominant vererbter Defekt des APC-Gens führt bei diesen Patienten zu einer gesteigerten Proliferation von Darmepithelien mit Ausbildung von Hunderten von Polypen, von denen regelhaft einer im weiteren Erkrankungsverlauf maligne entartet (Nishisho et al. 1991). Familiäre Kolonkarzinome kommen auch beim Peutz-Jeghers-Syndrom und der juvenilen Polyposis vor.

Das Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS) ist eine seltene Erkrankung, die sporadisch auftritt und scheinbar nicht familiär assoziiert ist. 1955 beschrieben Leonardo Wolsey Cronkhite Jr., ein amerikanischer Internist, und Jeanne Canada, eine amerikanische Radiologin, die Symptome und Befunde als ein zusammenhängendes Syndrom. Sie stellten bei 2 Patientinnen eine verstärkte Pigmentierung der Haut, diffuse gastrointestinale Polyposis, Alopezie und Atrophie der Zehen- und Fußnägel fest. (Cronkhite LW et al. 1955). Bis Ende des Jahres 2002 wurden 467 Fälle mit Cronkhite-Canada-Syndrom beobachtet, wobei 354 Fälle von Japanern berichtet wurden (Takakura M. et al. 2004). Da es sich um eine sehr seltene Erkrankung handelt, mangelt es an großen Studien. Somit sind Ätiologie, Pathogenese, klinischer Verlauf, Prognose und adäquate Therapie noch nicht ausreichend untersucht. Es gibt keinerlei Hinweise, dass genetische Einflüsse, Umweltfaktoren oder infektiöse Gründe für die geographische Häufung mit 75% der Fälle in Japan verantwortlich sind

(Word et al. 2002). Für gewöhnlich manifestiert sich das CCS zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr und ist durch eine durchgängige gastrointestinale Polyposis, die den Ösophagus ausspart, charakterisiert (Takeuchi Y. et al 2003). Durch diese abnormale Darmschleimhaut bzw. Mukosa kommt es häufig zu einer Malabsorption und einer Enteropathie, welche durch den Verlust von Proteinen gekennzeichnet ist. Es besteht die Möglichkeit, dass die beschriebenen ektodermalen Veränderungen (Alopezie, Hyperpigmentierung der Haut und gestörtes Wachstum der Nägel) auf diese chronische Malabsorption und schwere Mangelernährung zurückzuführen sind. Neben Durchfällen (Diarrhoen) sind die herabgesetzten Geschmacksempfindungen (Hypogeusien) die häufigsten klinisch auffallenden Symptome (Blonski et al. 2005). Wie bei den anderen Erkrankungen, die mit einer gastrointestinalen Polyposis einhergehen, ist das Risiko ein Karzinom im Kolon oder Magen zu entwickeln beim CCS erhöht. Bis 2004 wurden 50 (13%) Patienten mit CCS beschrieben, bei denen ein Karzinom entstanden ist, wobei 31 (8%) davon Kolonkarzinome waren und sich bevorzugt im Rektum befanden und 19 (5%) ein Magenkarzinom entwickelten (Yashiro et al. 2004). Untersuchungen wurden durchgeführt, bei denen es gelang 25 von 31 der Fälle mit Cronkhite-Canada-Syndrom und Kolonkarzinom zu untersuchen und stellten fest, dass in 10 Fällen (40%) Adenome vom Sägeblatttyp vorhanden waren (Yashiro et al. 2004).

Ausgangspunkt für diese Doktorarbeit war der Fall einer 58jährigen Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom, deren Kolon wegen eines Eiweißverlustsyndroms vollständig reseziert wurde und am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Untersuchung gelangte. Dieser Darm zeigte bei der histologischen Untersuchung eine ungewöhnliche Kombination von Cronkhite-Canada-Polypen und Adenomen vom Sägeblatttyp. Ein derartiger Fall könnte unter Umständen wegweisend sein um die Entstehung von Adenomen vom Sägeblatttyp, möglicherweise aus Cronkhite-Canada-Polypen, auf der molekularen Ebene zu charakterisieren. Immer wieder wurden in der Vergangenheit wichtige pathogene Genveränderungen in einzelnen Patienten mit einem besonderen Phänotyp beschrieben. Ein Beispiel dafür ist das Peutz-Jeghers-Syndrom, bei welchem es abgesehen von der gastrointestinalen Polyposis zu melanotischen

Pigmentflecken im Gesicht, der Wangen und der Lippen kommt. Verantwortlich ist der Gendefekt einer Serin-Threonin-Kinase (STK11) auf Chromosom 19p13.3. Um die ganze Bandbreite von nicht adenomatösen Polypen in unserer Untersuchung zu berücksichtigen wurde neben der genannten Patientin ein Kollektiv von zahlreichen Hyperplastischen Polypen von insgesamt 147 Patienten untersucht.

Die Tissue Microarray (TMA) Technik ist für die Untersuchung großer Patientenkollektive optimal geeignet. Bei diesem Verfahren werden kleine Gewebeproben (typischerweise 0,6 mm) von bis zu 600 verschiedenen Paraffinblöcken auf einen einzigen Objektträger gebracht. All diese Gewebeproben können deswegen gleichzeitig mittels in situ Techniken wie Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder RNA-in-situ-Hybridisierung untersucht werden (Kononen J. et al. 1998). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Untersuchung derart kleiner Gewebeproben pro Tumor zu repräsentativen Resultaten führt (Sauter, G. et al 2003).

Die spezifische Fragestellung der folgenden Doktorarbeit war: Gibt es molekulare Unterschiede zwischen Adenomen vom Sägeblatttyp, hyperplastischen Polypen, Cronkhite-Canada-Polypen bzw. normaler Darmschleimhaut?

Die in der Untersuchung berücksichtigten Gene bzw. deren Produkte waren p53, p16, Bcl-2, P504S, MUC6, MUC2, MUC5AC und CD10. Von allen diesen Genen ist bekannt, dass in der Karzinogenese bzw. der Polypenbildung Expressionsstörungen im Kolon zu finden sind. Darüber hinaus wurde die Proliferationsaktivität der Gewebe untersucht (Ki-67 labeling index). Die untersuchten Gene, ihre Funktion und die früher in Kolontumoren gefundenen Befunde sind nachstehend beschrieben.

p53: Das Protein p53 wird durch das Tumorsupressor-Gen TP53 kodiert, welches sich auf Chromosom 17p13.1 befindet. Durch DNA-Schäden, fehlerhafte Replikationen und Mitosen kommt es zu einer Anhäufung dieses Proteins, wodurch der Zellzyklus über Induktion des Enzyms p21 und darauf

folgender Einflüsse gehemmt wird. P53 ist in ca. 50% der menschlichen Tumore mutiert, wodurch es seine regulierende Funktion verliert. In der Mehrzahl von P53 Mutationen kommt es zur intranuklearen Anreicherung von inaktivem p53 Protein („p53 Positivität“). Mutationen in diesem Gen spielen bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen aus traditionellen Adenomen eine entscheidende Rolle (Fearon, E.R. and B. Vogelstein 1990).

p16: Das p16 Protein gehört zur Gruppe der cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren, der INK4 Gruppe, und ist wichtig für die Kontrolle des Zellzyklus. Es funktioniert als Tumorsupressorgen und benötigt für seine Funktion die Anwesenheit des normalen Retinoblastom-Proteins (Lloyd R.V. et al. 1999) Viele menschliche Tumoren enthalten in diesem Gen Mutationen, wie z.B. das maligne Melanom und bestimmte Formen der Leukämie (Hirama T. et al. 1995). Somit wird es in Zusammenhang mit maligner Transformation gebracht. Bei p53 Inaktivierung kommt es zur physiologischen p16 Überexpression.

Bcl-2: Es handelt sich um ein Protoonkogen, welches in der äußeren Mitochondrienmembran und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und eine hemmende Funktion auf die Apoptose hat. Beim Übergang von low grade Adenomen zu Kolonkarzinomen wurde eine verstärkte Expression von Bcl-2 beobachtet (Yu, H. G. et al. 2003).

P504S: P504S wird auch Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) bezeichnet. AMACR ist ein hochspezifischer Marker für Prostatakarzinomzellen. Im malignen Gewebe ist die Expression wesentlich höher als die Expression des Prostata spezifischen Antigens (PSA). Im gesunden Prostatagewebe wird AMACR nicht exprimiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass auch in Kolonkarzinomen die Expression von AMACR höher ist als im Normalgewebe des Kolons (Jiang, Z. et al 2003).

MUC6, MUC5AC und MUC2: Muzine sind Glykoproteine welche von den Epithelien des Verdauungstraktes sezerniert werden. Bis heute wurden mindestens 15 verschiedene Muzine beschrieben. Welche exprimiert werden

hängt von der Art des Gewebes ab. MUC2 wird vorwiegend von den Becherzellen und den resorbierenden Zellen des Verdauungstraktes produziert. MUC6 und MUC5AC hingegen werden hauptsächlich durch die oberflächliche Zellschicht des Magens sezerniert. Ein verstärktes bzw. abweichendes Expressionsmuster wurde in hyperplastischen Polypen, Adenomen vom Sägeblatttyp und Kolonkarzinomen beobachtet (Kim D.H. et al. 2005).

CD10: Es handelt sich um eine Metalloprotease, welche unter anderem auf der Zelloberfläche von lymphoiden Vorstufen und in den Keimzentren von B-Lymphozyten exprimiert wird. Vorangehende Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression von CD10 durch die Stromazellen des Darms bei zunehmendem Dysplasiegrad und steigender Malignität erhöht ist (Ogawa H. et al 2002).

Ki-67- Antigen: Dieses Antigen ist ein Proliferationsmarker, welcher die Wachstumsfraktion anfärbt. Dadurch ist dieser Marker richtungweisend für die Wachstumsgeschwindigkeit von Geweben. Da normalerweise das Gewebe in Tumoren sehr wachstumsaktiv ist, unterstützt dieses Antigen die Beurteilung der Malignität von Kolongewebe (Yu, H. G. et al. 2003).

2. Material und Methoden

2.1 Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom

2.1.1 Anamnese

In unserem Fall handelt es sich um eine 58jährige Patientin, welche im März 2006 im UKE vorstellig wurde. Vom äußerlichen Erscheinungsbild her litt die Patientin unter einer Alopezie, d.h. einer sichtbaren Lichtung des Kopfhaares. Zudem wurden brüchige Nägel festgestellt. Die endoskopische Untersuchung ergab eine hohe Zahl an Polypen im gesamten Gastrointestinaltrakt mit Aussparung des Ösophagus. Zudem ergaben die Laborbefunde unter anderem neben einer makrozytären Anämie eine Erniedrigung des Albumin und des Gesamteiweißes, was auf ein Eiweißverlustsyndrom durch die stark veränderte Resorptionsfläche im Verdauungstrakt zurückzuführen ist. Zusätzlich leidet die Patientin unter der autoimmunen Hashimoto-Thyreoiditis. Um den Eiweißverlust zu therapieren wurde am 10.04.2006 eine totale Kolektomie und Proktokolektomie mit Anlage einer Anastomose mit Reservoir (Pouch) durchgeführt. Das resezierte Kolon wurde dem Institut für Pathologie zugeführt (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1:Totales Kolektomie- und Proktokolektomiepräparate einer Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom

2.1.2 Pathologischer Befund

Das in Abbildung 1 dargestellte Präparat ist ein nach Formalinfixierung 85 cm langes Proktokolektomiepräparat aus 80 cm Kolon und Rektum sowie 5 cm terminalem Ileum. Die Schleimhaut des terminalen Ileum ist unauffällig. Im gesamten Kolon und Rektum befinden sich multiple bis 3,5 cm große Polypen (ca. 1600 an der Zahl) mit abnehmender Frequenz im Bereich des Rektums. Das Kolon wurde von oral nach aboral in acht (I-VIII) jeweils 10 cm lange Segmente geteilt. Pro Segment wurden von oral nach aboral die größten polypösen Veränderungen im Abstand von circa 1 cm in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden diese Polypen histologisch beurteilt und zeigten eine Kombination aus 108 Cronkhite-Canada-Polypen, 38 Adenomen vom Sägeblatttyp mit unterschiedlichen Dysplasiegraden (low- und high grade Dysplasien) und 5 hyperplastischen Polypen.

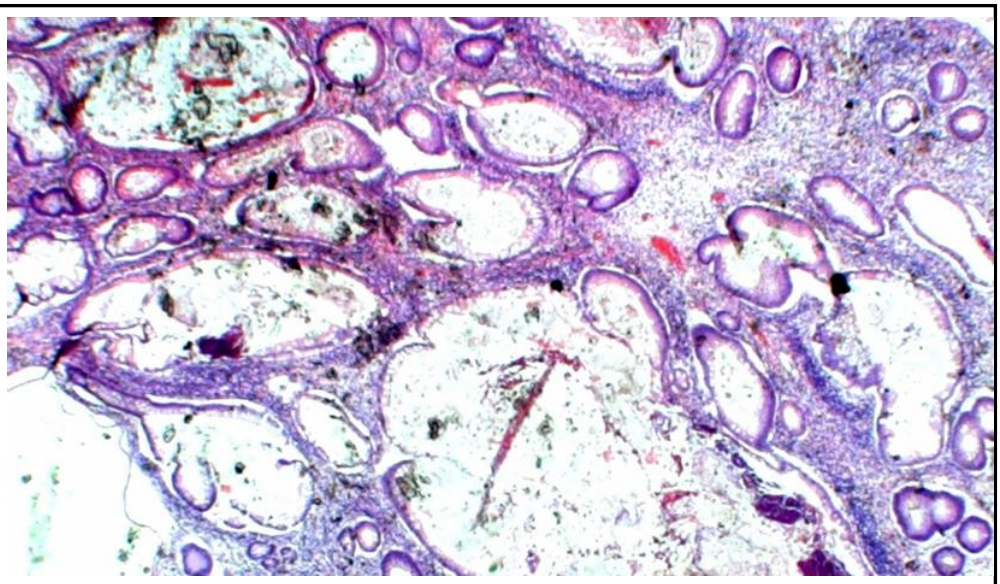

Abbildung 2: Ausschnitt aus einem Cronkhite-Canada-Polypen

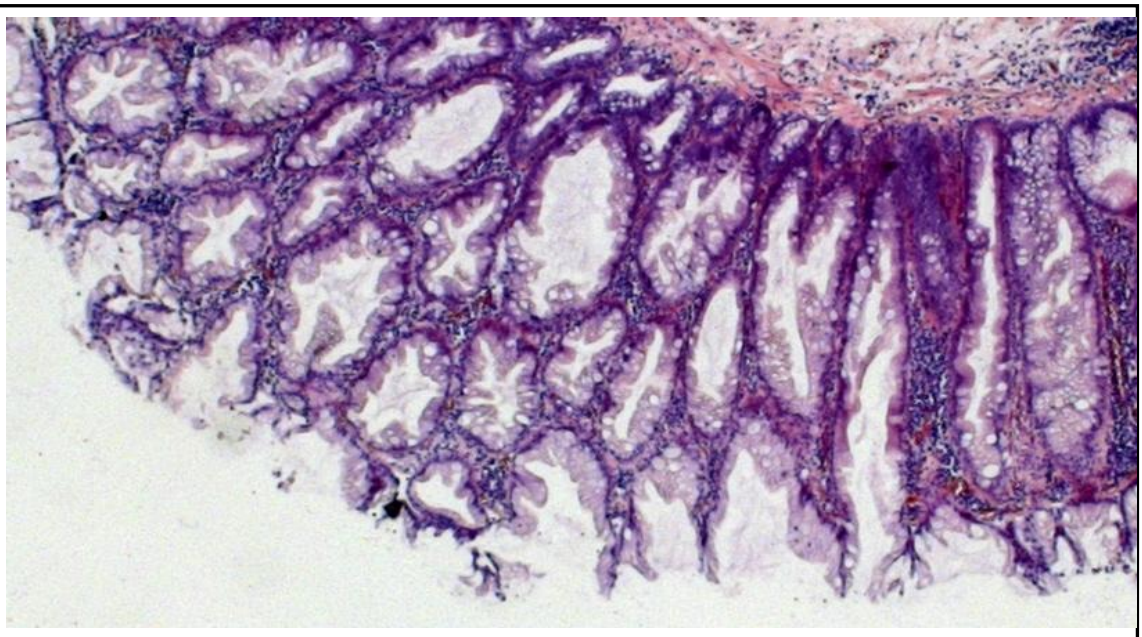

Abbildung 3: Ausschnitt aus einem hyperplastischen Polypen

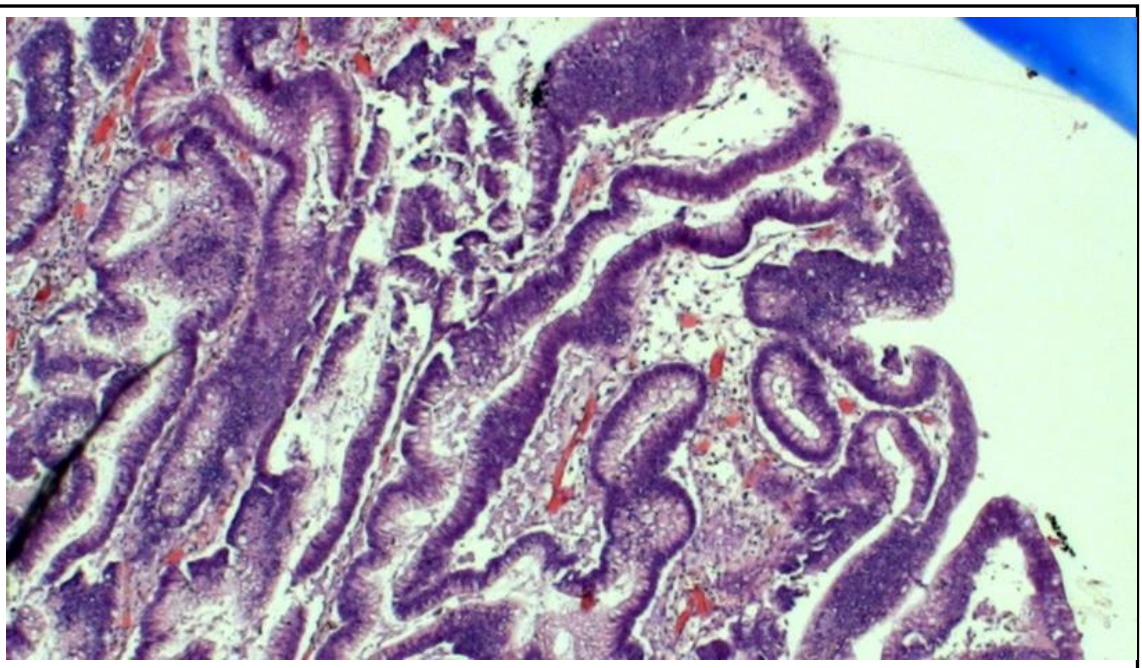

Abbildung 4: Ausschnitt eines Adenom vom Sägeblattyp mit schwerer Dysplasie einer Patientin mit CCS

2.2 Erstellung von Tissue-Microarrays

2.2.1 Prinzip

Bei den Tissue-Microarrays werden aus in Paraffin eingebetteten Geweben Stanzen einer Größe von 0,6 mm entnommen und auf einem einzigen Paraffinblock zusammengesetzt. Mit dieser Methode können zum Beispiel auf einem Objektträger mit nur einmaliger Applikation eines Antikörpers viele Gewebeproben untersucht werden. Vorteil ist hierbei der geringe Materialverbrauch der Immunhistochemie und die Möglichkeit der Beurteilung eines großen Gewebe- und Patientenkollektivs.

Die Tissue-Microarray Technik hatte bis zum heutigen Zeitpunkt ihren Schwerpunkt in der Krebsforschung. Diese Methode kann jedoch bei jeglicher Gewebeart angewandt werden, wie zum Beispiel bei entzündlichem Gewebe, neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen. Es gibt drei verschiedene Formen von Studien, bei denen die Tissue – Microarray – Technik in der Krebsforschung vorwiegend verwendet wird:

1. Multi-Tumor-Arrays

   Es werden Gewebeproben unterschiedlicher Tumoren, wie im vorliegenden Fall, auf einen Paraffinblock aufgetragen; anschließend wird die Bedeutung verschiedener molekularer Marker evaluiert.

2. Progressionsarrays

   Es wird anhand von verschiedenen Stadien eines Tumortyps die Veränderung ausgewählter molekularer Marker untersucht, wie zum Beispiel das Expressionsmuster im Vergleich von Primärtumoren zu ihren Metastasen.

3. Prognosearrays

   Sind klinische follow-up-Daten vorhanden, kann mittels dieser Technik die prognostische Relevanz neu entdeckter Gene beurteilt werden.

2.2.2 Methode und Gerät

2.2.2.1 TMA-Herstellung

Der größte Aufwand bei der TMA-Herstellung ist traditionelle pathologische Arbeit. Zunächst muss potenziell geeignetes Material in einer Pathologie-Datenbank identifiziert werden. Im Fall des Colon-Resektates mit Cronkhite-Canada-Syndrom wurde wie bereits in 2.1.2 beschrieben verfahren. Dann müssen entsprechend archivierte Proben nach und nach bezüglich geeigneter Donor-Blöcke durch einen Pathologen begutachtet werden. Während dieses Vorganges werden entsprechende Diagnosen gestellt und die interessanten Areale markiert. Anschließend werden die Schnitte den Paraffinblöcken zugeordnet und nach Abgleich die betroffenen Gebiete ausgestanzt und in den Empfängerblock eingebracht. Aus diesem werden mit Hilfe eines so genannten „tape sectioning kits“ (Instrumedics Inc., NJ, USA) Schnitte erstellt. Dieses ermöglicht ein besseres Haften der Proben während der weiteren Verarbeitung in der in-situ-Analyse.

Mit einem semiautomatischen Präzisionsinstrument, dem so genannten „Array-Stanz-Gerät“ oder „Arrayer“, werden die einzelnen Tumorproben aus repräsentativen Tumorarealen eines „Donor“-Geweblockes entnommen und in „Empfänger“-Paraffin-Blöcke eingebracht, welche bis zu 1000 einzelne Proben aufnehmen können. Der „Arrayer“ besteht aus einem dünnen Hohlzylinder von 600 µm Innendurchmesser mit scharfer Spitze, welcher präzise in einer xy-Achse gehalten wird. Ein genau in diesen Hohlzylinder passender Stahldraht (Außendurchmesser: 600 µm) ermöglicht die Einbringung der im Primärtumorblock gewonnenen Tumorproben in die vorgefertigten Löcher des Empfänger-Paraffinblockes. Die zylindrische Form und der kleine Durchmesser der gewonnenen Proben, die dem „Donor“-Block entnommen werden, maximiert die Zahl der Materialproben, die aus einem „Donor“-Block gewonnen werden können, bei gleichzeitiger Minimierung einer Gewebeschädigung desselben. Gestanzte Gewebsblöcke bleiben so voll interpretierbar für alle morphologischen und molekularen Analysen, die im Laufe der Zeit notwendig werden können.

Da die volle Tiefe des ursprünglichen Tumorblocks in jeder der zylinderförmigen Proben des TMA-Blockes erhalten ist, kann dieselbe Anzahl an Schnitten aus dem TMA-Block, wie aus dem Primärtumorblock gewonnen werden. Aus einem Tumorgewebsblock von 18 mm Kantenlänge können so rund 90.000 in-situ-Analysen hergestellt werden.

(Fragmente entnommen aus der Dissertation von Sylvia Seibt, Hamburg 2006, mit Bewilligung der Autorin)

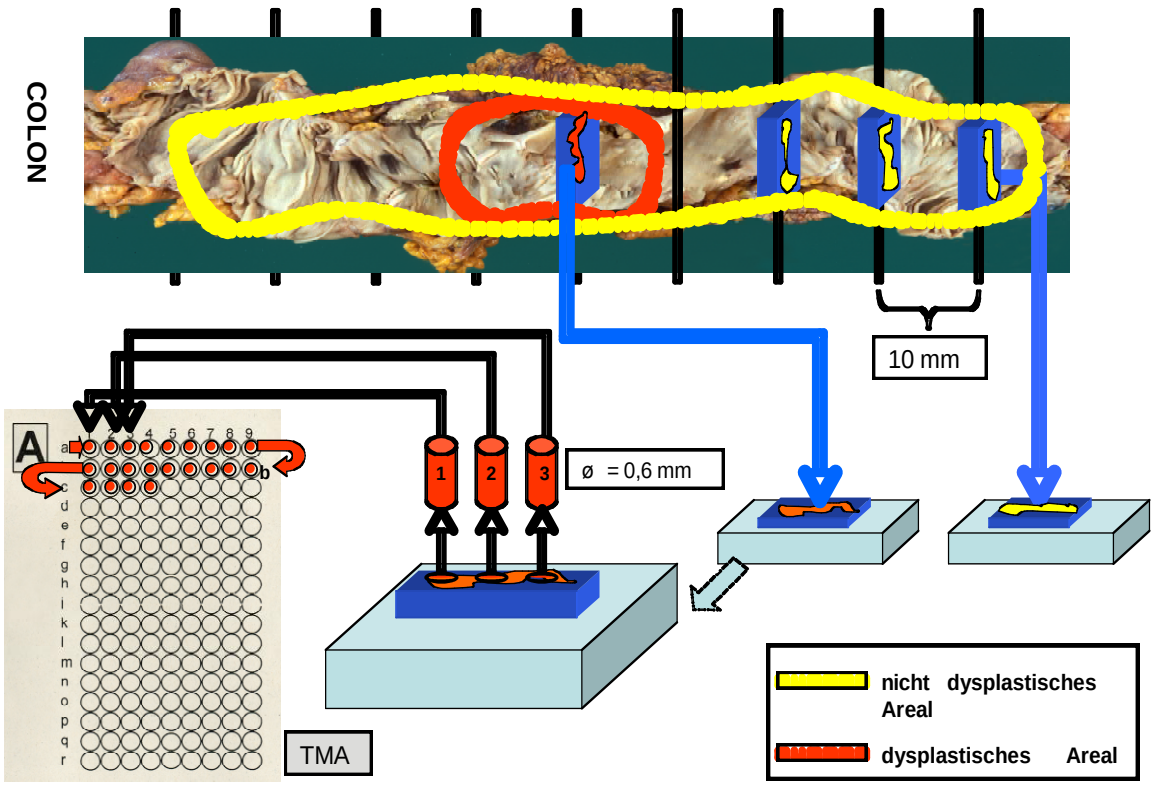

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herrstellung von Tissue Microarrays

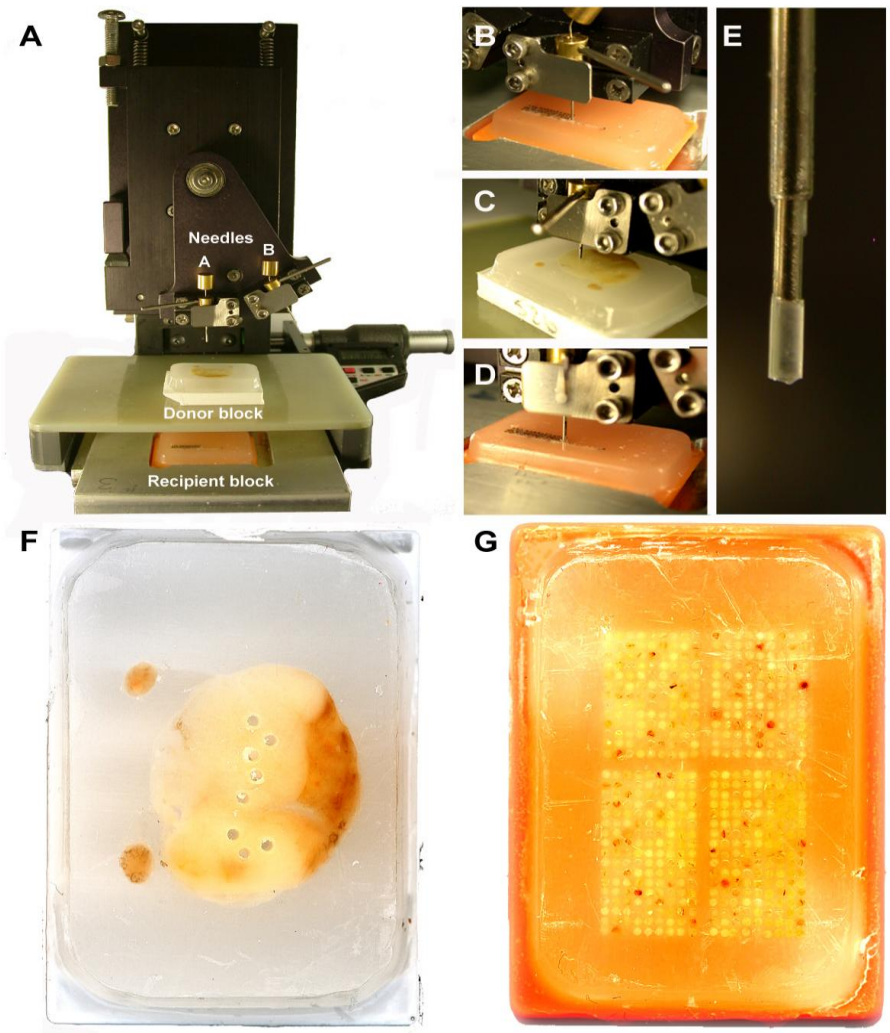

Abbildung 6: Stanzgerät zur Erstellung von TMAs

Abbildung 6 zeigt das Array-Stanzgerät, dessen wesentlicher Bestandteil die aus zwei an der Spitze geschärften Hohlzylindern aufgebaute Stanze ist: Der innere Hohlzylinder hat einen Außendurchmesser von 0,6 mm und dient dem Stanzen von Löchern in den „Empfänger“-Paraffin-Block, während der größere Hohlzylinder dem Ausstanzen von Gewebszylindern aus dem als Donor dienenden Tumorgewebe und dem Einbringen der so gewonnenen Proben in den Empfängerblock dient. Der innere Durchmesser des größeren Hohlzylinders entspricht dabei dem äußeren Durchmesser des kleineren Hohlzylinders.

2.2.2.2. TMA-Färbung und Analyse

Die TMA-Technik ist für Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH), sprich alle in-situ-Untersuchungen geeignet. Es werden die gleichen Bearbeitungsprotokolle wie bei großen Schnitten angewandt. Im Vergleich mit Studien an größeren Tumorschnitten ist der große Vorteil das besonders große Ausmaß an Standardisierung welches die TMA-Technik mit sich bringt. Alle Schnitte der TMA-Analyse werden im selben Gefäß inkubiert, mit der Konsequenz, dass identische Konzentrations- und Temperaturverhältnisse für alle Proben gewährleistet sind. Die Zeitspanne zwischen Anfertigung und Verarbeitung der Proben, die Schnittdicke und die Zeitintervalle der einzelnen Färbeschritte sind identisch. Selbst wenn es zu unterschiedlichen Ergebnissen von TMA-Studien eines Instituts durch leichte Abweichungen in den Versuchsbedingungen kommt, werden alle Proben einer einzelnen TMA-Analyse in gleicher Weise beeinflusst, so dass die Zusammenhänge untersuchter Merkmale mit klinischen und pathologischen Daten erhalten bleibt. Insbesondere bei suboptimalen Färbebedingungen ist es empfehlenswert, eine TMA-Analyse von ausreichend großem Probenumfang zu konstruieren, die es ermöglicht, eine gewisse Anzahl nicht interpretierbarer Tumorproben in einer Studie zuzulassen.
(Fragmente entnommen aus Dissertation von Sylvia Seibt, Hamburg 2006, mit Bewilligung der Autorin)

2.2.3. Herstellung eines TMA aus dem Kolon einer Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom

Selektierte Areale aus 108 Cronkhite-Canada-Polypen (CCP), 38 Adenomen vom Sägeblatttyp (SA) mit unterschiedlchen Dysplasiegraden (low- und high grade Dysplasien), 13 Proben normaler Darmschleimhaut und 5 hyperplastischen Polypen (HP) einer Patientin wurden mit der in 2.2.2. beschriebenen Technik untersucht. Um den Erfolg der Färbungen zu kontrollieren wurden zusätzlich unterschiedliche Vergleichsgewebe aufgetragen:

- 2 x Herz-Normalgewebe
- 2 x Niere-Normalgewebe
- 2 x Lunge-Normalgewebe
- 12x Kolon-Normalgewebe
- 2 x Endometrium-Normalgewebe
- 2 x Prostata-Normalgewebe
- 2 x Lymphknoten
- 1 x quergestreifte Muskulatur
- 2 x Haut-Normalgewebe
- 10 x Mamma-Karzinom
- 5 x Lunge-Adenokarzinom
- 5 x Lunge-Plattenepithelkarzinom
- 10 x Kolon-Karzinom
- 10 x Prostata-Karzinom

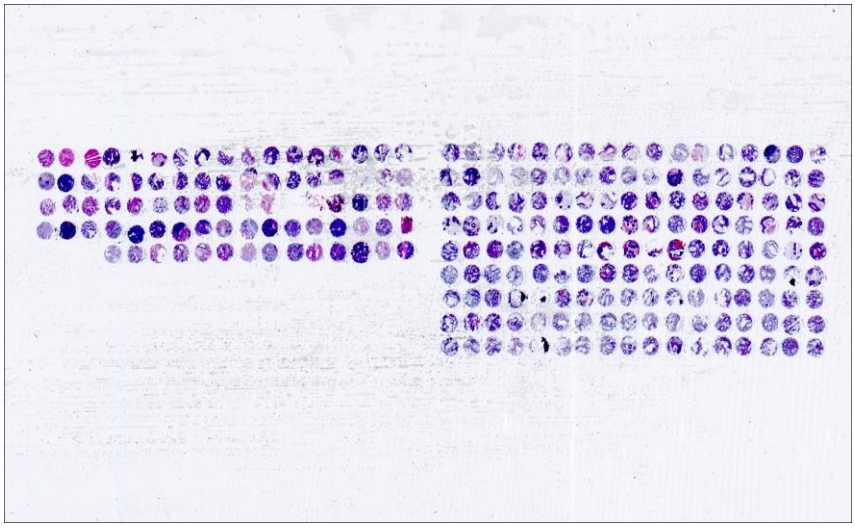

Abbildung 7: Tissue Multiarray, Cronkhite-Canada-Syndrom, H.E.

2.2.4. Herstellung eines TMA bestehend aus Hyperplastischen Polypen

Um die Polypen aus dem Darm der Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom mit nicht adenomatösen Polypen deskriptiv vergleichen zu können wurden selektierte Areale aus 165 hyperplastischen Polypen (HP) von 145 Patienten wie in 2.2.2 beschrieben untersucht. Bei der statistischen Auswertung wurde von jedem Patienten jeweils nur ein HP betrachtet. Um den Erfolg der Färbungen zu kontrollieren wurde zusätzlich wiederum ein Set unterschiedlicher Vergleichsgewebe aufgetragen:

- 2 x Herz-Normalgewebe
- 2 x Niere-Normalgewebe
- 2 x Lunge-Normalgewebe
- 12x Kolon-Normalgewebe
- 2 x Endometrium-Normalgewebe
- 2 x Prostata-Normalgewebe
- 2 x Lymphknoten
- 1 x quergestreifte Muskulatur
- 2 x Haut – Normalgewebe
- 10 x Mamma-Karzinom
- 5 x Lunge-Adenokarzinom
- 5 x Lunge-Plattenepithelkarzinom
- 10 x Kolon-Karzinom
- 10 x Prostata-Karzinom

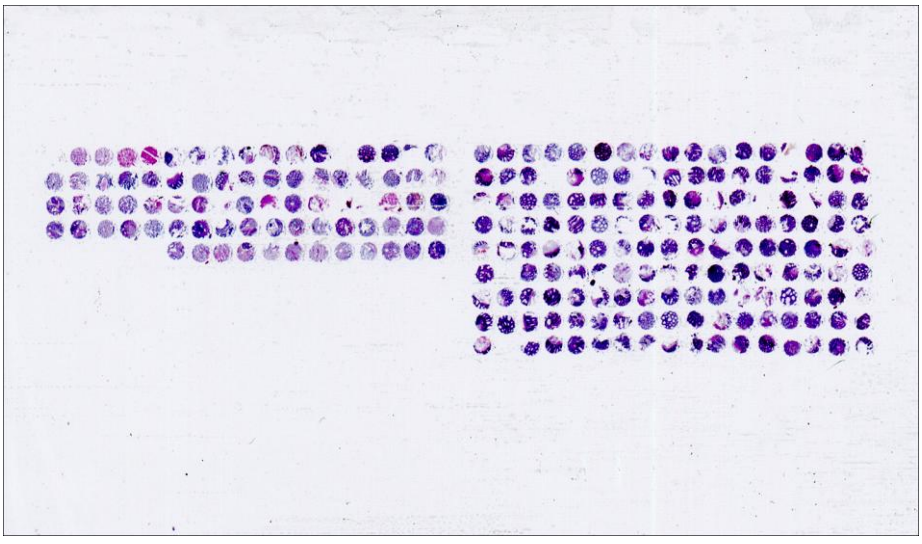

Abbildung 8: Tissue Multiarray, Hyperplastische Polypen, H.E.

2.3. Immunhistochemie

Die Arrays in dieser Studie wurden mit einer standardisierten Immunoperoxidase-Methode untersucht. Diese wurde mit dem Dako (Glostrup, Denmark) REAL™ EnVision Detection System Peroxidase/ DAB+, Rabbit/Mouse im DAKO Autostainer durchgeführt. Für den Nachweis von MUC2, MUC5AC, MUC6 und CD10 wurden Antikörper von Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle-upon-Tyne, UK) verwendet, für den Nachweis von P504S, Bcl-2 und Ki-67 Antikörper von DAKO, für p16 von BD PharMingen (San Diego, USA) und für p53 von Oncogene. Die Antikörper, ihre Verdünnung, die notwendige Vorbehandlung der Schnitte und Bewertung der einzelnen Färbungen können der Tabelle 2 entnommen werden.

Antikörper	Hersteller	Protokolldetails	Bewertungsskala
p53	Oncogene (OP 43-100UG)	MC, 20 Minuten; 1:2000	Negativ: keine Färbung Schwach positiv: 1+ oder <20% der Zellen und 2+ Mittel: > oder gleich 20% der Zellen und 2+ oder <30% der Zellen und 3+ Stark Positiv: > oder gleich 80% der Zellen und 2+ oder > oder gleich 30% der Zellen und 3+
MUC2	Novocastra (NCL-MUC-2)	MC, 20 Minuten; 1:100	
MUC5AC	Novocastra (NCL-MUC5AC)	MC, 20 Minuten; 1:50	
MUC6	Novocastra (NCL-MUC-6	MC, 20 Minuten; 1:50	
CD10	Novocastra (NCL-CD10-270)	MC, 20 Minuten; 1:50	
p16	PharMingen (554070)	MC, 20 Minuten; 1:100	
P504S	DAKO (M3616)	MC, 20 Minuten; 1:200	
Bcl-2	DAKO (M887)	MC, 20 Minuten; 1:40	
Ki-67 Li	DAKO (M7240)	MC, 20 Minuten ; 1:400	Prozentzahl positiver Zellen (100 Zellen beurteilt)

MC = Mikrowelle 1000W

Tabelle 2: verwendete Antikörper, Hersteller, Inkubationsbedingungen, Verdünnung und Bewertungsskala der einzelnen Färbungen.

Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DBD) verwendet. Bekannte Positivität bei bestimmten Tumoren wurde als positive Kontrolle verwendet, Schnitte bei denen der erste Antikörper weggelassen wurde, als negative Kontrolle. Alle Schnitte wurden manuell ausgewertet. Es wurde für alle Färbungen der Prozentsatz gefärbter Zellen und die Intensität positiver Zellen bestimmt und anschließend, ausgenommen der Ki-67 – Färbung, in eine Skala von 1-3 eingeordnet (siehe Tabelle 2). Für das Protein Ki-67 wurde nach Bestimmung der positiven Zellkerne die Prozentzahl ermittelt.

2.4. Statistik

Zur Auswertung der molekularen Veränderungen in den Geweben aus dem Kolonrahmen der Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS) wurden für die diskreten Variablen MUC2, MUC5AC, MUC6, P504S, Bcl-2, p53, p16 und CD10 Kreuztabellen erstellt. Die Unterschiede in der Expression bzw. Färbung in den einzelnen Geweben wurden mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson und dem Exakten Test nach Fisher untersucht. Für die Hyperplastischen Polypen mit den oben genannten Markern wurden deskriptive Tabellen mit Beschreibung der Häufigkeiten erstellt. Da es sich um zwei sehr unterschiedlich große Patientenkollektive handelt (auf der einen Seite eine Patientin mit CCS und auf der anderen Seite 147 Patienten ohne CCS mit Hyperplastischen Polypen) können Vergleiche zwischen diesen beiden Gruppen nur rein deskriptiver Natur sein. Um Unterschiede in der Proliferationsaktivität der verschiedenen Gewebearten mittels

Ki-67 aufzuzeigen, wurde der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test angewandt.

3. Resultate

3.1. Technische Aspekte

Von den insgesamt 329 auf die beiden Arrays aufgebrachten Gewebefragmenten waren bei jeder Untersuchung eine unterschiedliche Zahl der Gewebeproben nicht auswertbar, weil entweder kein Gewebe auf dem TMA enthalten war oder weil kein epitheliales Gewebe identifiziert werden konnte. Beispiele für nicht auswertbare Präparate sind in den Abbildung 9 und 10 dargestellt. Der Anteil nicht auswertbarer Präparate war für MUC2 6,1%, MUC5AC 4,2%, p53 3,3%, p16 3,3%, P504S 1,8%, CD10 0,9%, Bcl-2 3,0%, Ki-67 3,3% und MUC6 4,3%.

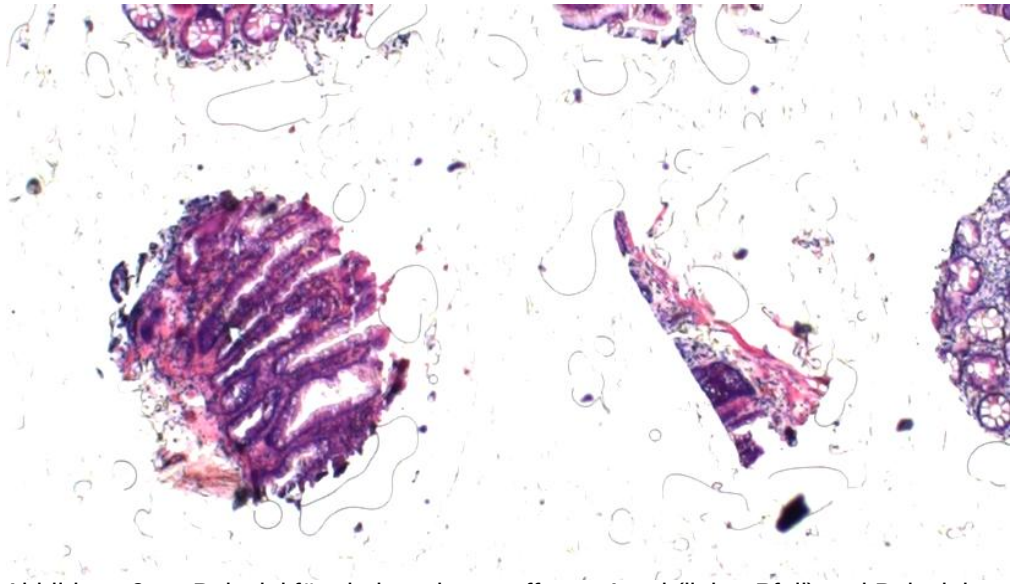

Abbildung 9: Beispiel für ein korrekt getroffenes Areal (linker Pfeil) und Beispiel für einen nicht auswertbaren Spot (rechter Pfeil).

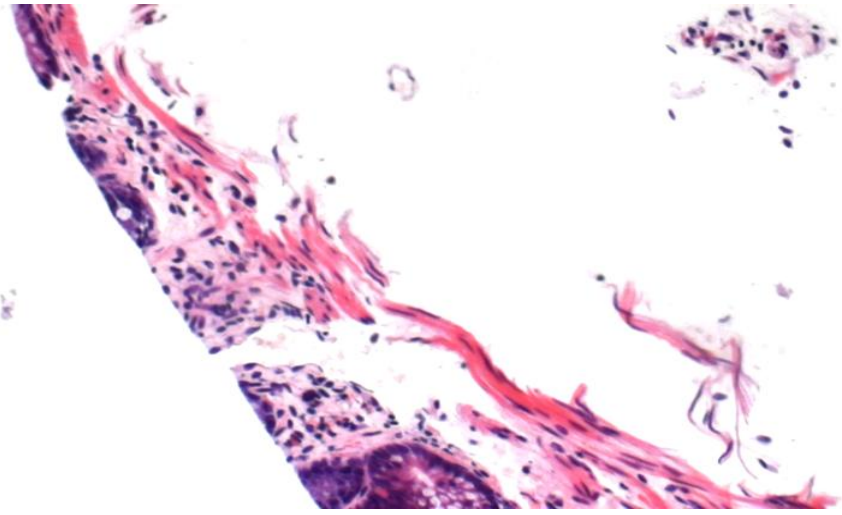

Abbildung 10: Vergrößerung des nicht auswertbaren Spots

3.2 Immunhistochemie

Die typischen immunhistochemischen Befunde sind für die untersuchten Marker in den Abbildungen 11 bis 26 dargestellt. Die Art der immunhistochemischen Färbungen schwankt zwischen den untersuchten Antikörpern. Für MUC2 war die Färbung typischer Weise zytoplasmatisch. Für p53 fanden sich in einzelnen Krypten Anfärbungen einiger weniger Zellen (Abbildung 20). Die Kriterien einer starken p53-Positivität fanden sich aber nirgends. p16 stellte sich typischerweise zytoplasmatisch dar, mit einer diffusen Anfärbbarkeit (Abbildung 21). P504S wurde ebenfalls zytoplasmatisch nachgewiesen, wobei typischer Weise ein feingranuläres Zellbild zur Darstellung kam (Abbildung 22). CD10 ließ sich als Membranfärbung darstellen (Abbildung 23). Bcl-2 (Abbildung 24) war in einem Teil der Biopsien zytoplasmatisch nachweisbar, ebenso wie MUC6 (Abbildung 25). Ki67-Protein konnte in allen Biopsien in einem Teil der Zellkerne als nukleäre Färbung dargestellt werden. Ebenfalls färbten sich sämtliche in den Präparaten erkennbare Mitosen mit dem Ki67-Antikörper an.

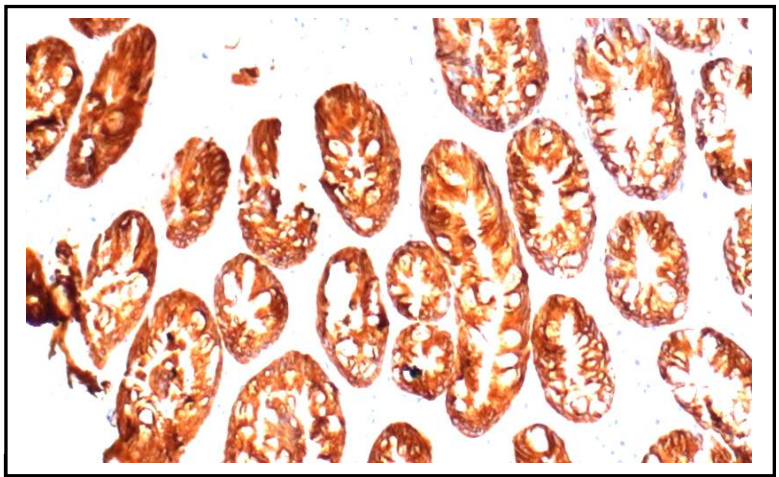

Abbildung 11:
MUC2 positiver HP

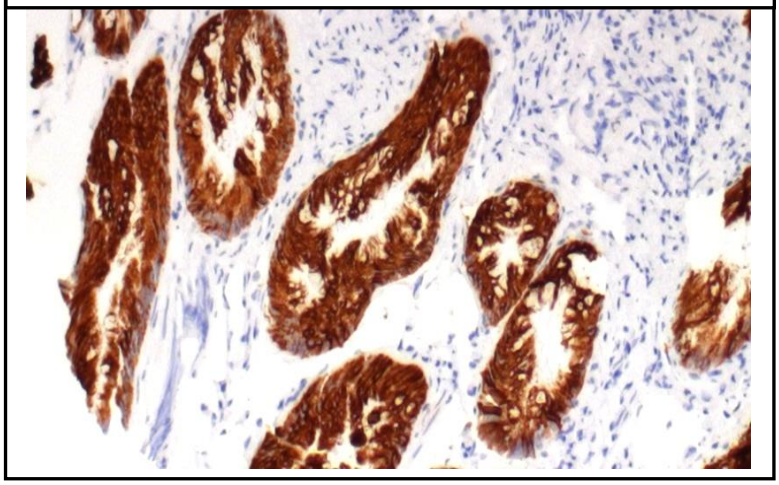

Abbildung 12:
MUC5AC positiver HP

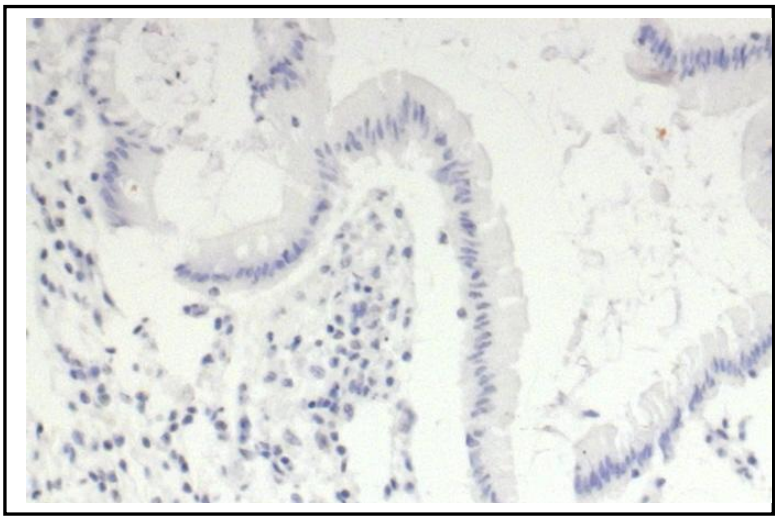

Abbildung 13:
p53 negativer CCP

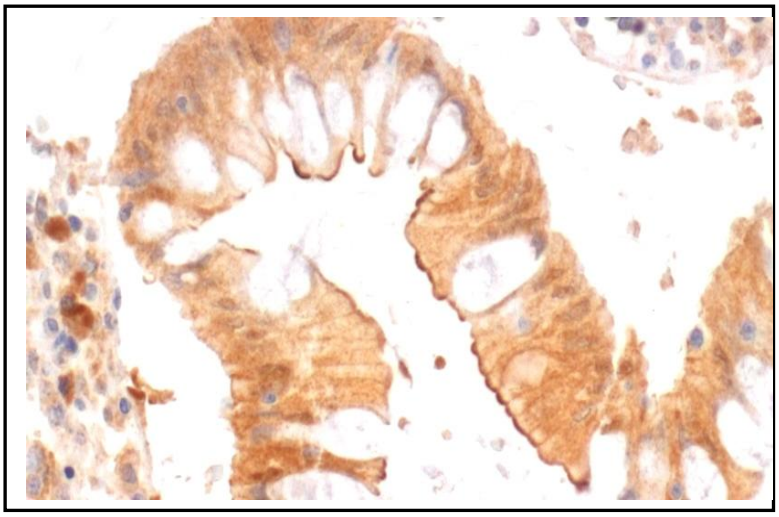

Abbildung 14: p16 positiver
CCP

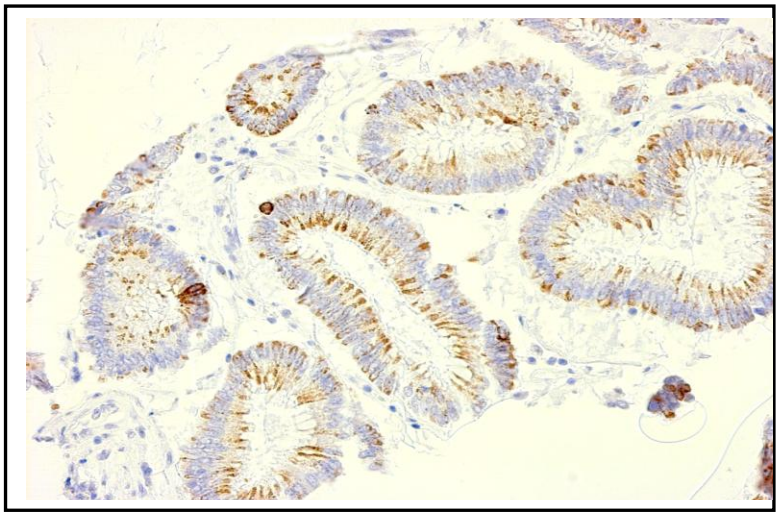

Abbildung 15: P504S
Positivität in einem
Adenom vom
Sägeblatttyp

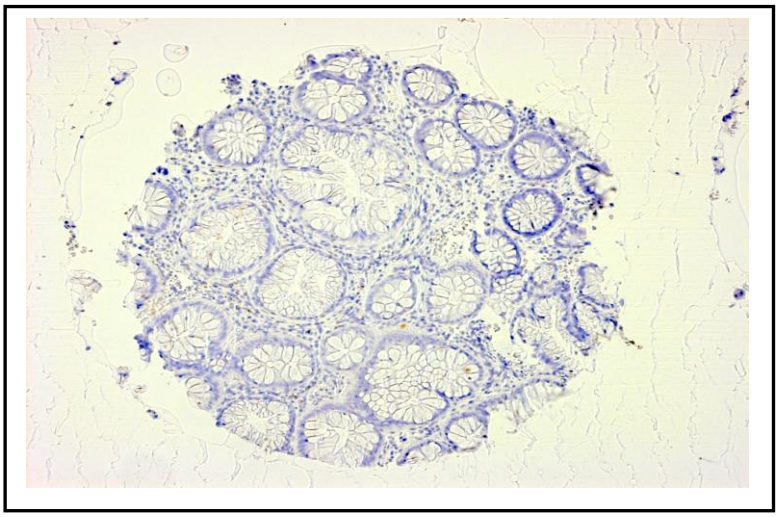

Abbildung 16:
CD10 negativer HP

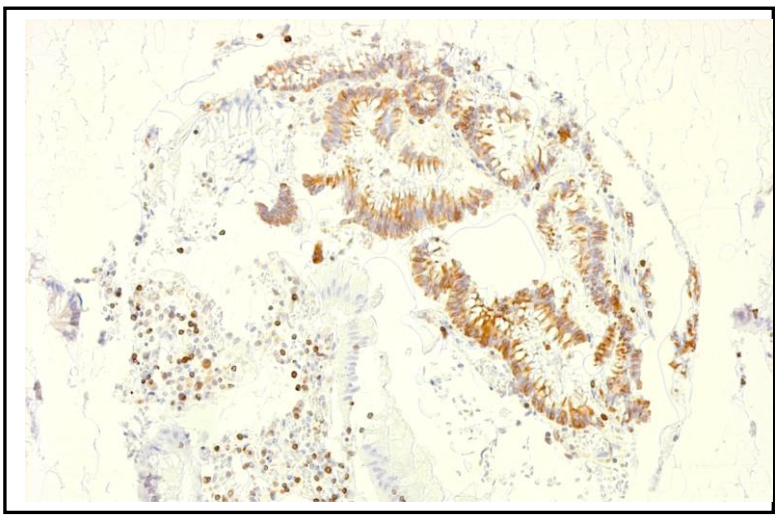

Abbildung 17: Bcl-2 Positivität in einem Adenom vom Sägeblatttyp

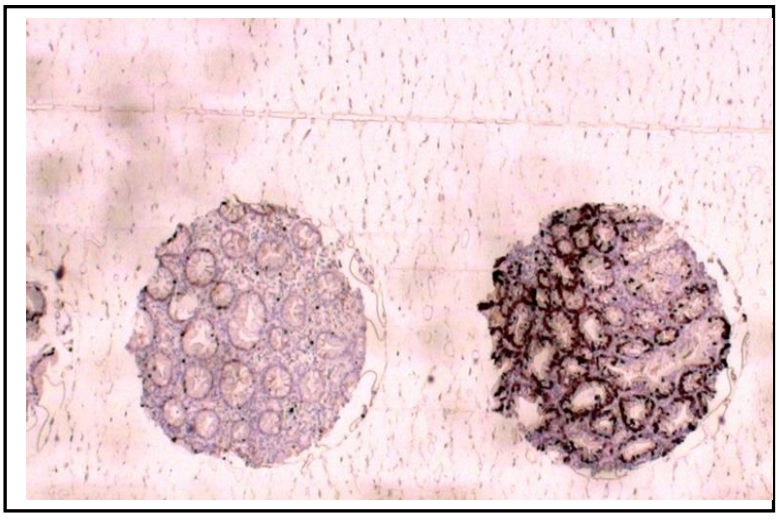

Abbildung 18: Ki-67 Färbung in HP; links schwach, rechts stark

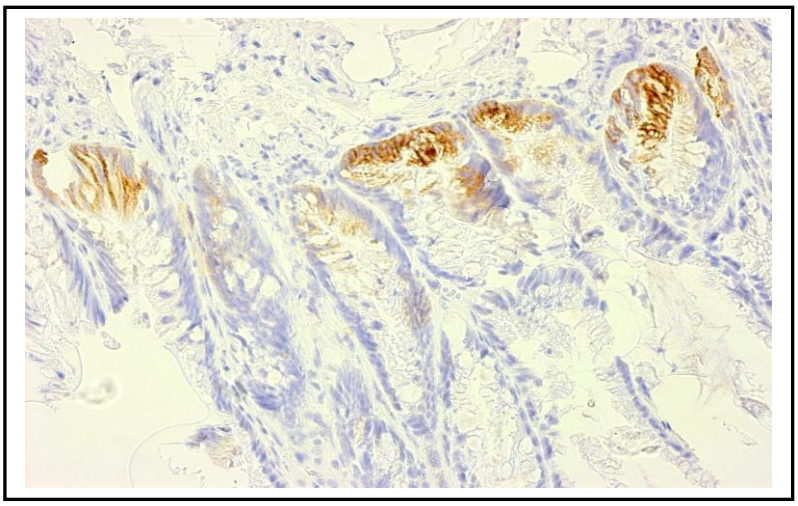

Abbildung 19:
leichte Positivität
von MUC6 im HP

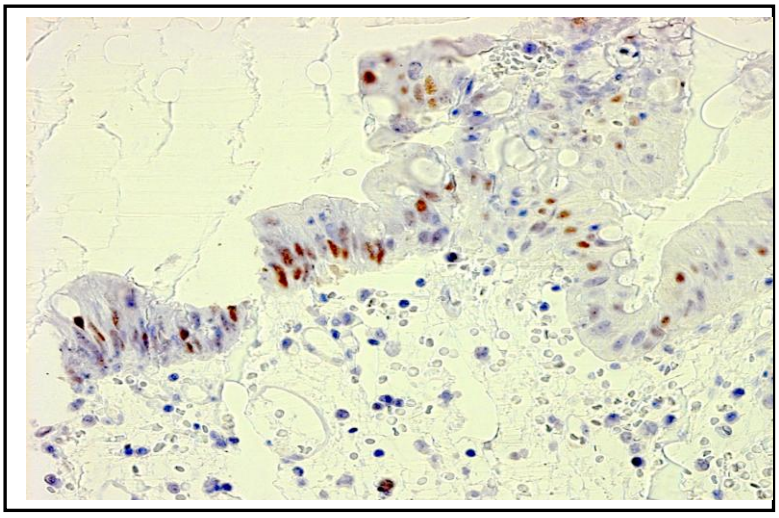

Abbildung 20: leichte p53
Positivität in einem
Sägeblattadenom

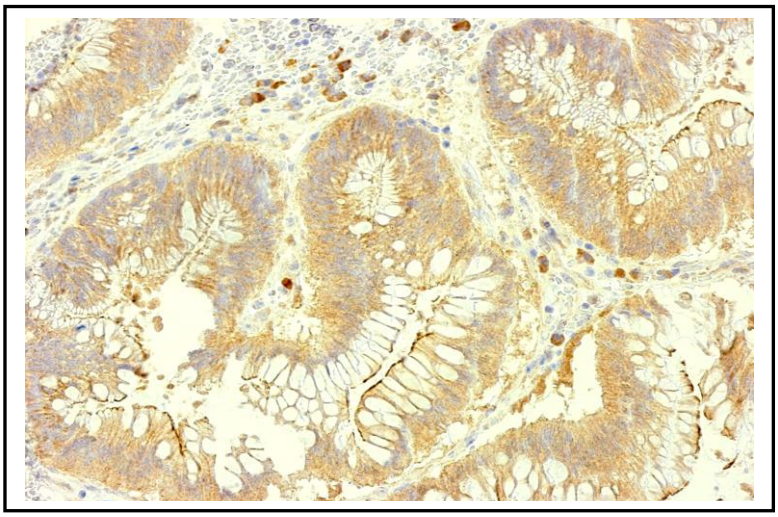

Abbildung 21: p16
zytoplasmatische Färbung

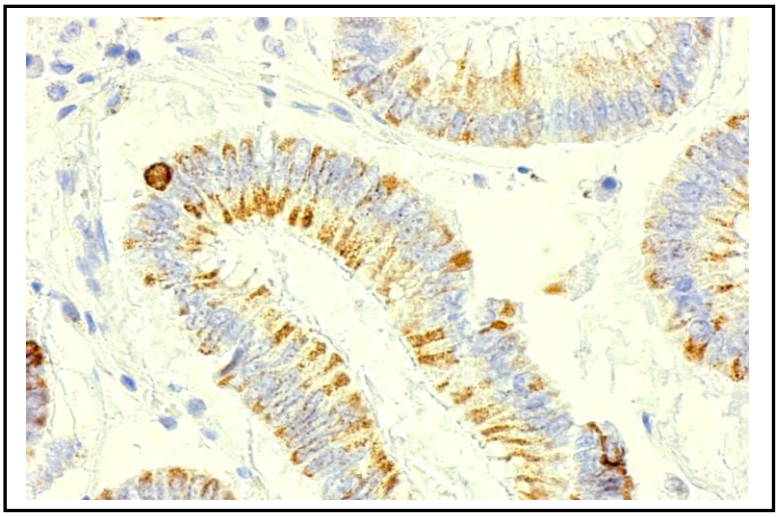

Abbildung 22: P504S
zytoplasmatische Färbung

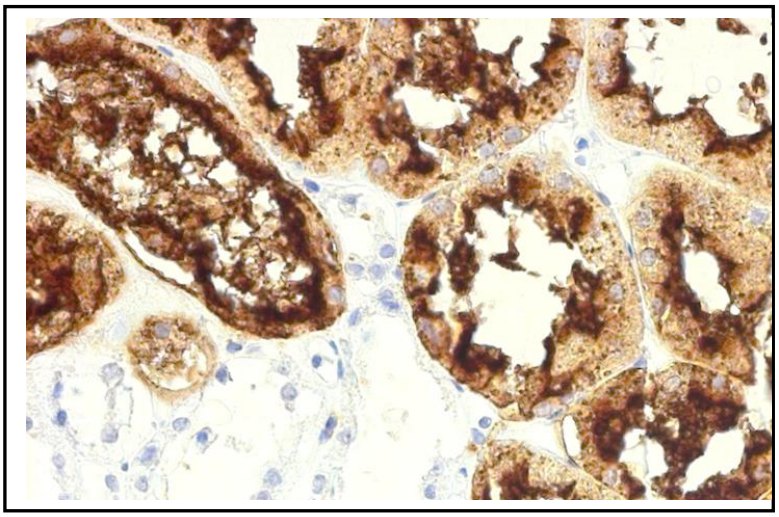

Abbildung 23: CD10
Membranfärbung

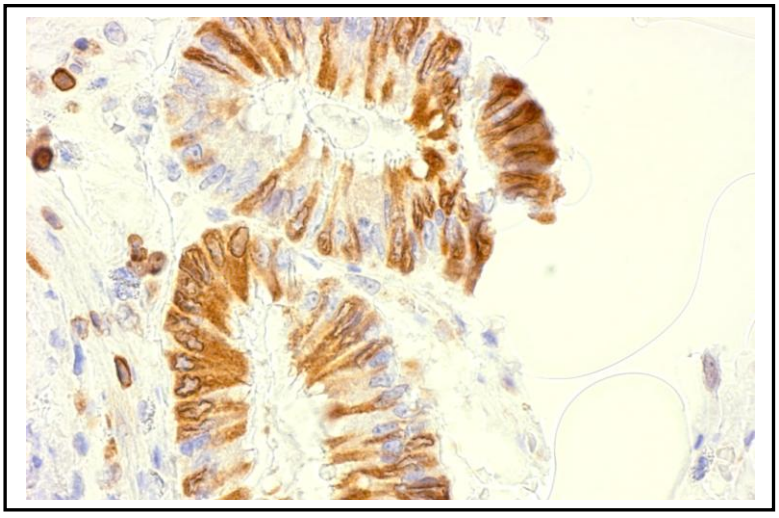

Abbildung 24: Färbung mit Bcl-2

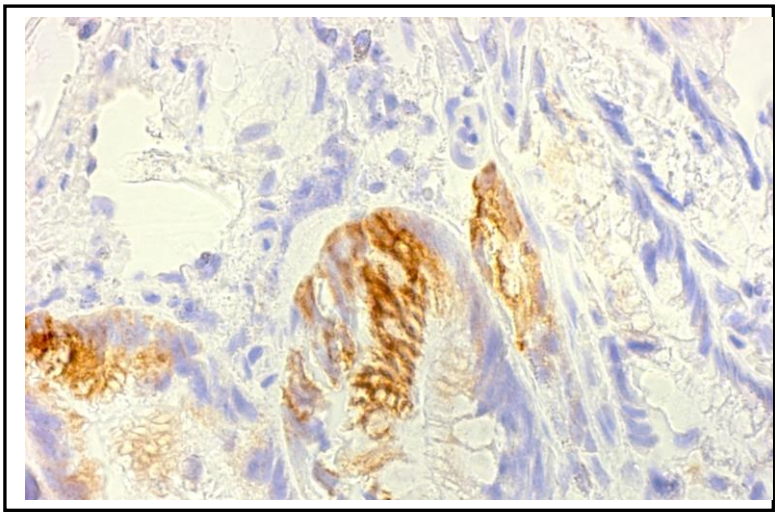

Abbildung 25: Färbung mit MUC6

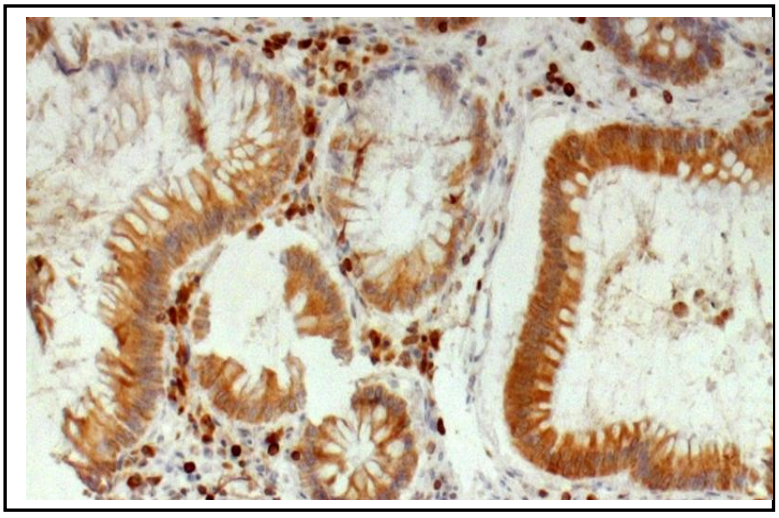

Abbildung 26: Bcl-2 Expression in Kolongewebe mit erhöhter Entzündungsaktivität

3.3 Beziehung zum Phänotyp der Polypen

Die immunhistochemischen Befunde der einzelnen untersuchten Polypenarten beziehungsweise von Normalgewebe sind in den Tabellen 3-29 und den Diagrammen 1-29 dargestellt.

Normale Kolonschleimhaut war durch eine niedrige Proliferationsaktivität (Median = 0%, Tabelle 27, Diagramm 20) und eine konstante, wenn überwiegend auch schwache Expression von MUC2 charakterisiert. In etwas mehr als 20% der Fälle konnte auch eine schwache Bcl-2 Expression nachgewiesen werden (Tabelle 21), dies vor allem in Lokalisationen mit erhöhter Entzündungsaktivität (Abbildung 26). Cronkhite-Canada-Polypen unterschieden sich nur sehr wenig von normaler Kolonschleimhaut. Auch bei Cronkhite-Canada-Polypen war immer eine MUC2 Expression nachweisbar, wobei MUC6 bzw. MUC5AC praktisch nie zur Darstellung kam. Ebenso wie bei normaler Kolonschleimhaut wurde in einem Teil der Fälle eine Bcl-2 Expression (meistens schwach) gefunden. Wesentlichster Unterschied zur normalen Schleimhaut war die in ca. 15% der Fälle nachweisbare P504S Positivität (Tabelle 18) und die in etwa 36% der Fälle nachweisbare p16 Expression (Tabelle 16). Hyperplastische Polypen der Patienten ohne CCS zeigten ebenso wie normale Kolonschleimhaut und Cronkhite-Canada-Polypen in allen Fällen eine MUC2 Expression, wobei diese häufiger stärker ausgeprägt war als bei den vorher beschriebenen Entitäten. Besonders charakteristisch für hyperplastische Polypen aus unserem Patientenkollektiv ohne Cronkhite-Canada-Syndrom war in unserer Untersuchung eine stark erhöhte Proliferationsaktivität. Die Hälfte der hyperplatischen Polypen zeigt einen Ki-67 labeling index zwischen 5% und 20% (Tabelle 27, Diagramm 20). Beinahe 70% aller Fälle wiesen eine Überexpression von MUC5AC (Tabelle 8) auf. Adenome vom Sägeblatttyp unterschieden sich von den vorher beschriebenen Diagnosen besonders in ihrer P504S Expression, welche in mehr als 40% der Fälle beobachtet wurde (Tabelle 18). Bemerkenswerterweise waren alle typischerweise von Adenomen vom Sägeblatttyp morphologisch schwierig abgrenzbaren hyperplastischen Polypen P504S negativ (Tabelle 20). Interessanterweise lag die Proliferationsaktivität deutlich unterhalb der Werte beim weniger „malignen“ hyperplastischen Polypen. Die Hälfte dieser Entität

hatte einen geringen Ki-67 labeling index zwischen 0% und 5% (Tabelle 27, Diagramm 20).

Unter den Adenomen vom Sägeblatttyp ließen sich 33 Adenome mit geringer Dysplasie und 5 Adenome vom Sägeblattyp mit schwerer Dysplasie identifizieren. Die immunhistochemischen Befunde sind für beide Gruppen in den Tabellen und Diagrammen auch jeweils separat dargestellt. Dabei zeigt sich ein schwacher signifikanter Unterschied in der p16 Expression. 5 von 5 (100%) der schwer dysplastischen Adenome vom Sägeblattyp zeigten eine mäßiggradige bis starke p16 Expression, aber nur 36,3% von 33 Adenomen vom Sägeblatttyp mit geringer Dysplasie (p=0,049) (Tabelle 16). Die Schwäche der Signifikanz könnte auf der geringen Größe der Stichprobe mit schwerer Dysplasie beruhen. Die Hälfte aller Adenome vom Sägeblatttyp mit geringer Dysplasie wies eine Proliferationsaktivität zwischen 0% und 5% auf, wohingegen die Hälfte aller Adenome vom Sägeblatttyp mit schwerer Dysplasie eine Proliferationsaktivität zwischen 5% und 10% zeigte (p=0,023) (Tabelle 29, Diagramm 21).

Abkürzungserläuterung zu den Diagrammen:

Serratiertes Adenom:	Adenom vom Sägeblatttyp
LGIN:	low grade intraepithelial neoplasia
HGIN:	high grade intraepithelial neoplasia

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	MUC2		
	leicht	mittel	stark
Normale Kolonschleimhaut	84,6%	15,4%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	66,7%	23,1%	10,2%
Serratierte Adenome	36,8%	31,6%	31,6%
Hyperplastische Polypen	100,0%	0,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	21,048	,002	,003
Exakter Test nach Fisher	17,858		,003

Tabelle 3: MUC2, Patientin mit CCS

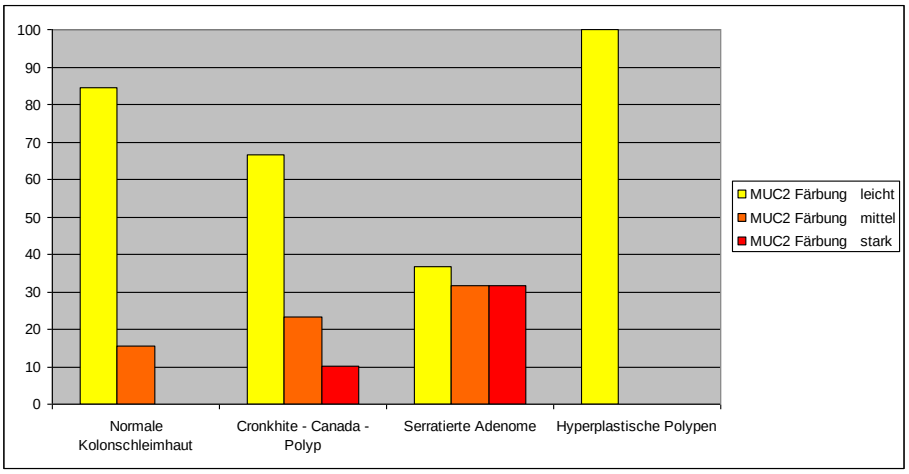

Diagramm 1: MUC2 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	MUC2		
	leicht	mittel	stark
SA/LGIN	39,4%	33,3%	27,3%
SA/HGIN	20,0%	20,0%	60,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,160	0,340	0,487
Exakter Test nach Fisher	1,909		0,487

Tabelle 4: MUC2, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

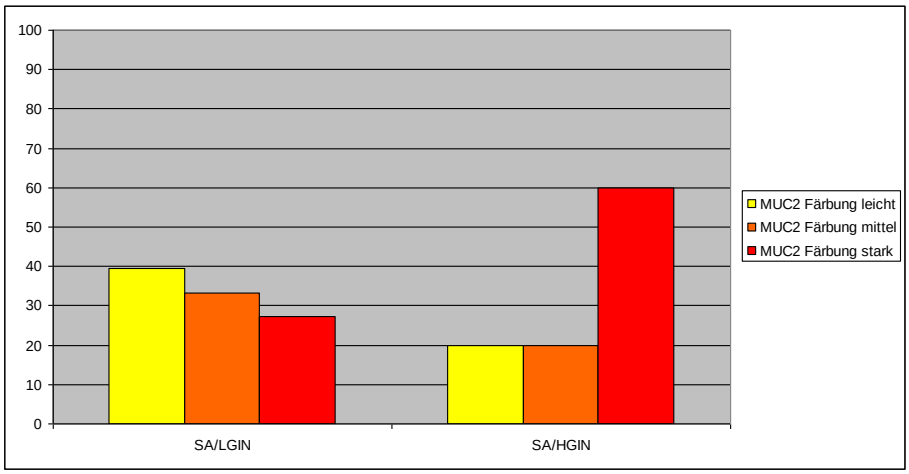

Diagramm 2: MUC2 Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten		MUC2
	leicht	14,0%
	mittel	11,6%
	stark	74,4%

Tabelle 5: MUC2, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

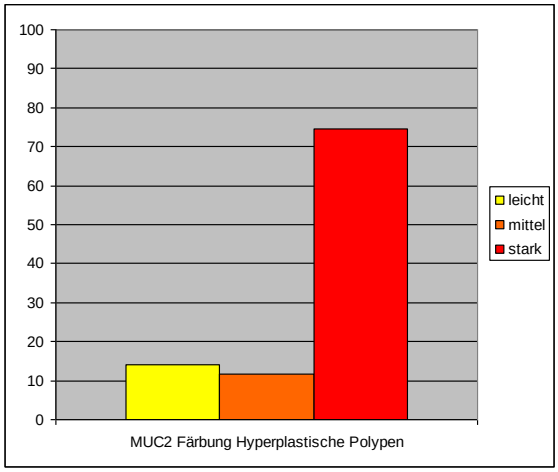

Diagramm 3: MUC2 Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	MUC5AC		
	keine Färbung	mittel	stark
Normale Kolonschleimhaut	100,0%	0,0%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	100,0%	0,0%	0,0%
Serratierte Adenome	86,8%	5,3%	7,9%
Hyperplastische Polypen	80,0%	20,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	24,298	0,000	0,011
Exakter Test nach Fisher	18,073		0,002

Tabelle 6: MUC5AC, Patientin mit CCS

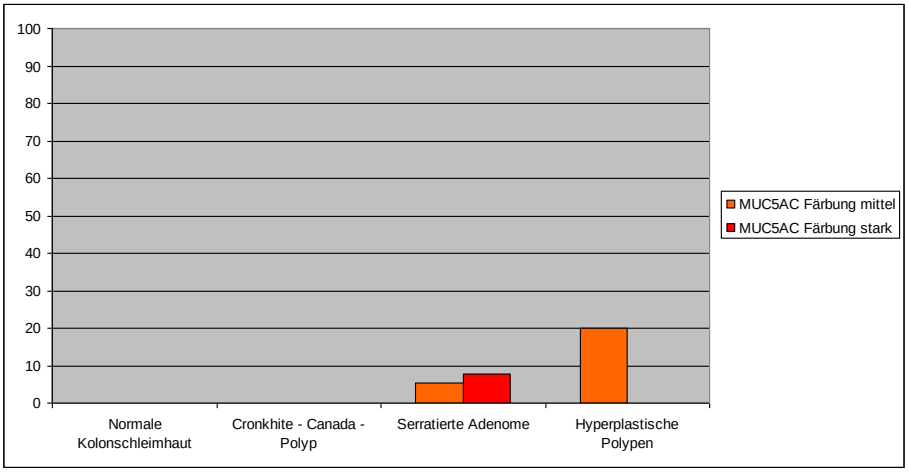

Diagramm 4: MUC5AC Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	MUC5AC		
	keine Färbung	mittel	stark
SA/LGIN	90,9%	0,0%	9,1%
SA/HGIN	60,0%	40,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	14,132	0,001	0,015
Exakter Test nach Fisher	8,056		0,022

Tabelle 7: MUC5AC, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

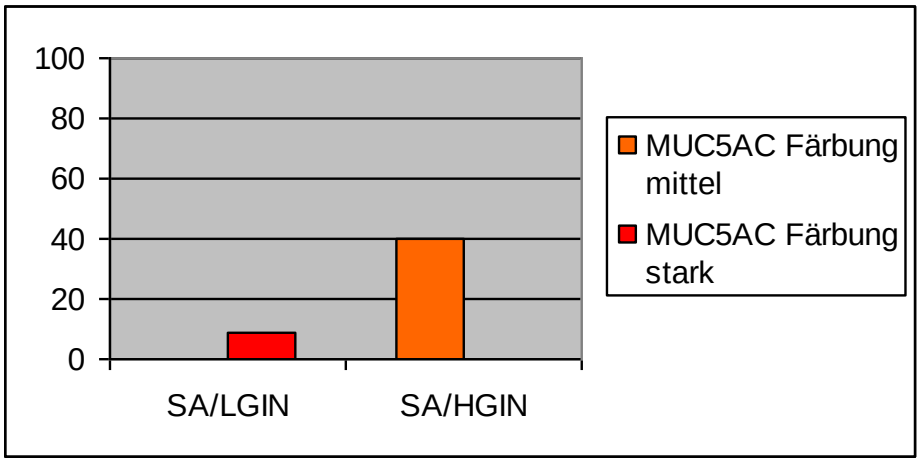

Diagramm 5: MUC5AC Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten	MUC5AC
keine Expression	27,8
leicht	**21,1**
mittel	**35,3**
stark	**15,8**

Tabelle 8: MUC5AC, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

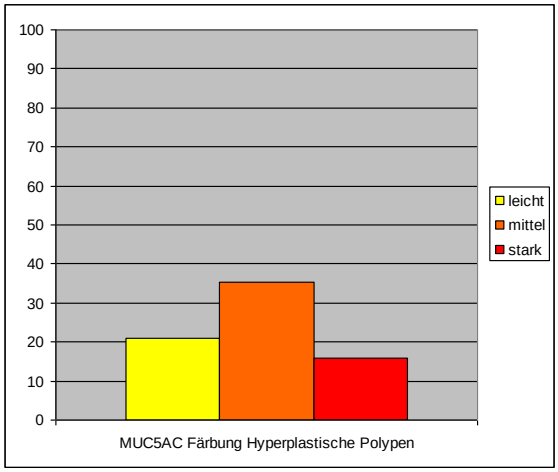

Diagramm 6: MUC5AC Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	MUC6	
	keine Färbung	leicht
Normale Kolonschleimhaut	91,7%	8,3%
Cronkhite-Canada-Polyp	99,1%	0,9%
Serratierte Adenome	100,0%	0,0%
Hyperplastische Polypen	100,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,615	0,132	0,252
Exakter Test nach Fisher	5,047		0,252

Tabelle 9: MUC6, Patientin mit CCS

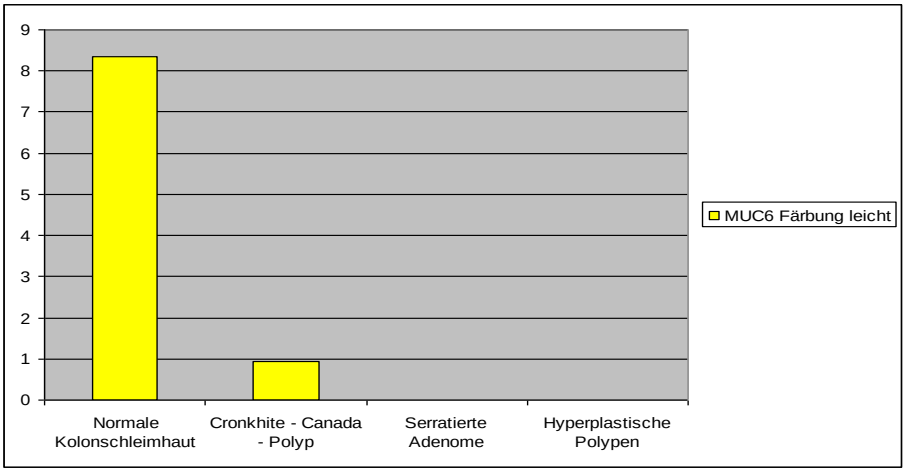

Diagramm 7: MUC6 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	MUC6
	keine Färbung
SA/LGIN	100,0%
SA/HGIN	100,0%

Tabelle 10: MUC6, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten		MUC6
	keine Expression	64,9
	leicht	35,1

Tabelle 11: MUC6, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

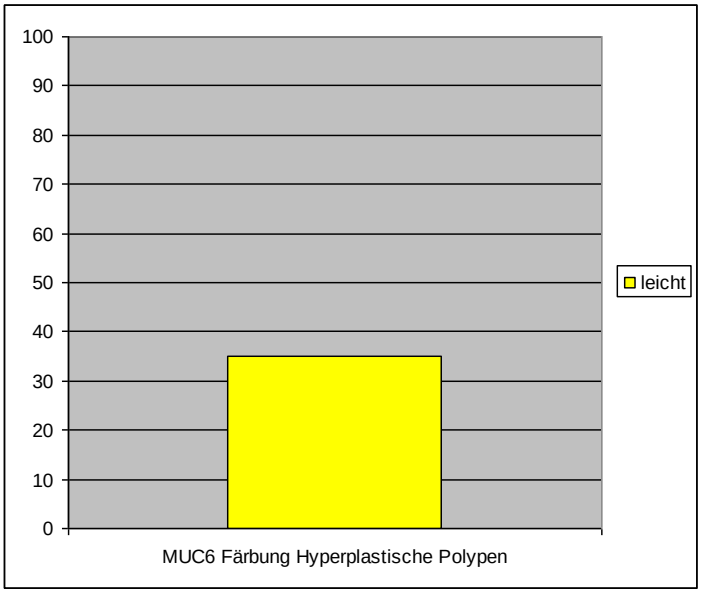

Diagramm 8: MUC6 Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	p53	
	keine Färbung	leicht
Normale Kolonschleimhaut	100,0%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	100,0%	0,0%
Serratierte Adenome	94,7%	5,3%
Hyperplastische Polypen	100,0%	100,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,713	0,082	0,119
Exakter Test nach Fisher	6,239		0,156

Tabelle 12: p53, Patientin mit CCS

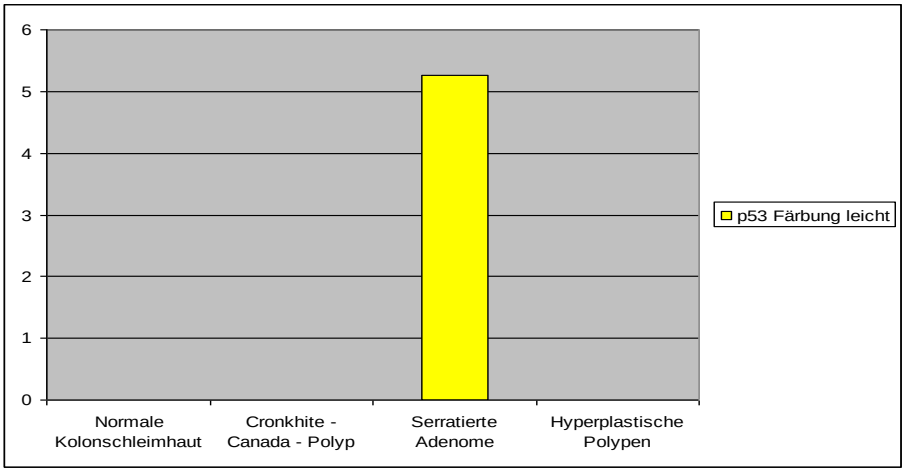

Diagramm 9: p53 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	p53	
	keine Färbung	leicht
SA/LGIN	97,0%	3,0%
SA/HGIN	80,0%	20,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,508	0,113	0,249	0,249
Exakter Test nach Fisher			0,249	0,249

Tabelle 13: p53, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

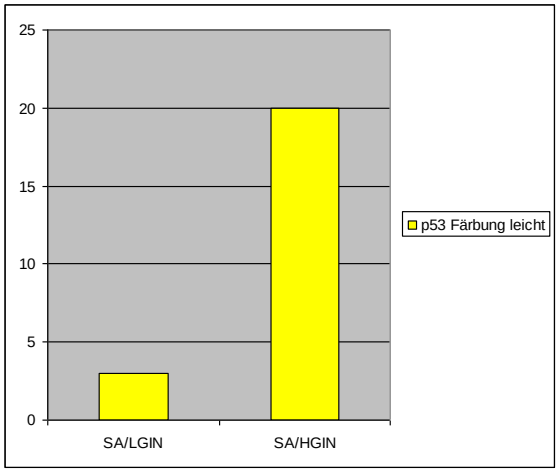

Diagramm 10: p53 Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten	p53
keine Expression	89,9%
leichte	9,4%
mittel	0,7%

Tabelle 14: p53, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

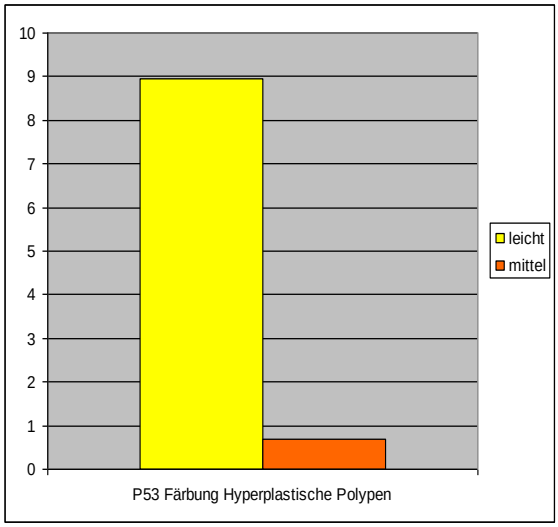

Diagramm 11: p53 Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	p16			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
Normale Kolonschleimhaut	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	63,9%	**13,9%**	**21,3%**	**0,9%**
Serratierte Adenome	42,1%	13,2%	28,9%	15,8%
Hyperplastische Polypen	80,0%	20,0%	0,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	28,125	0,001	0,003
Exakter Test nach Fisher	23,271		0,002

Tabelle 15: p16, Patientin mit CCS

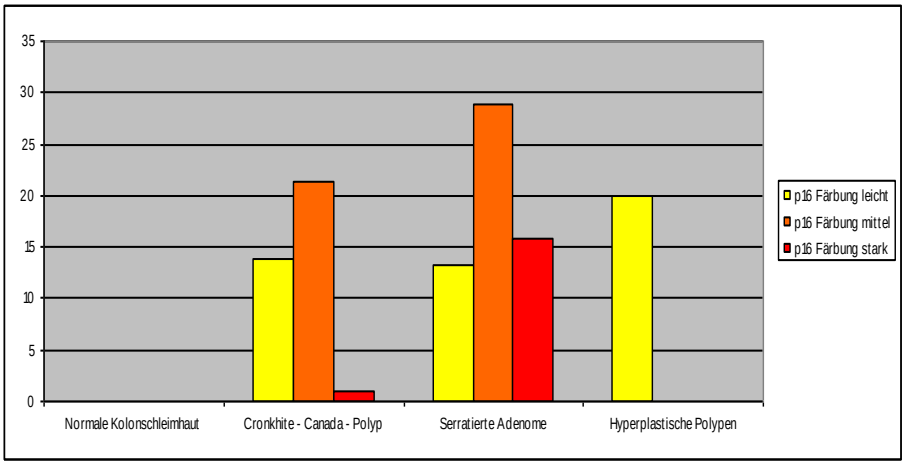

Diagramm 12: p16 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	p16			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
SA/LGIN	48,5%	15,2%	**24,2%**	**12,1%**
SA/HGIN	0,0%	0,0%	**60,0%**	**40,0%**

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	7,237	0,065	0,075
Exakter Test nach Fisher	6,684		**0,049**

Tabelle 16: p16, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

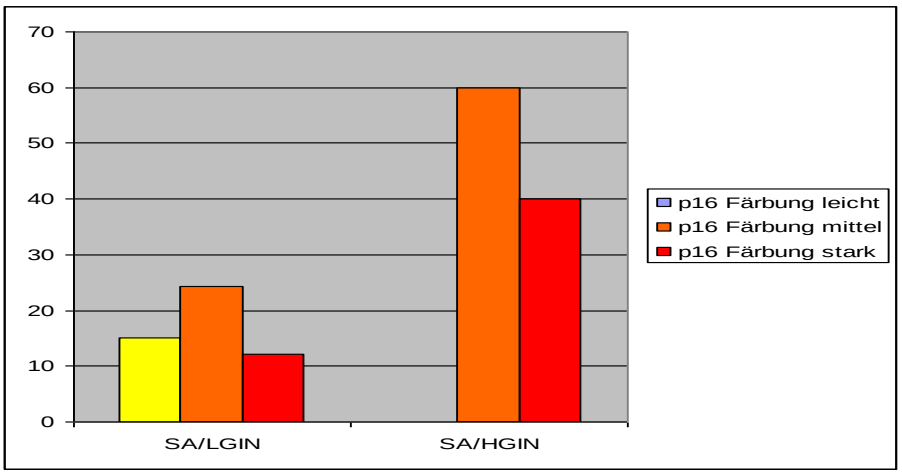

Diagramm 13: p16 Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten	p16
keine Färbung	70,1%
leicht	**5,1%**
mittel	**24,1%**
stark	**0,7%**

Tabelle 17: p16, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

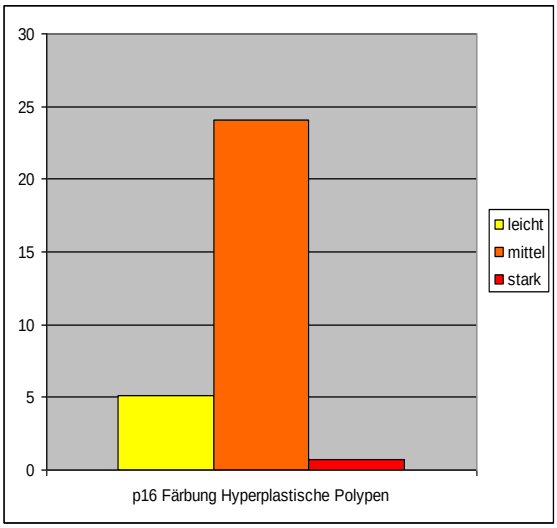

Diagramm 14: p16 Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	P504S			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
Normale Kolonschleimhaut	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	85,2%	**9,3%**	**4,6%**	**0,9%**
Serratierte Adenome	57,9%	**18,4%**	**13,2%**	**10,5%**
Hyperplastische Polypen	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	21,630	0,010	0,025
Exakter Test nach Fisher	16,990		0,022

Tabelle 18: P504S, Patientin mit CCS

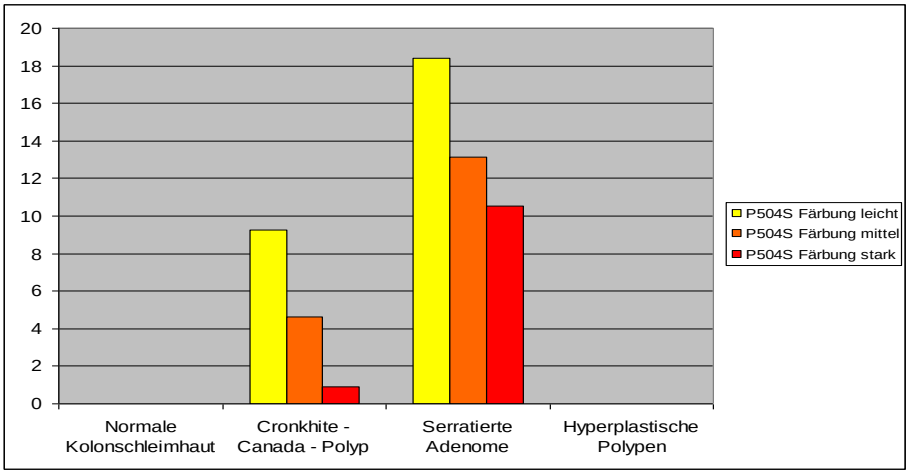

Diagramm 15: P504S Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	P504S			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
SA/LGIN	57,6%	21,2%	15,2%	6,1%
SA/HGIN	60,0%	0,0%	0,0%	40,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,574	0,087	0,090
Exakter Test nach Fisher	4,589		0,162

Tabelle 19: P504S, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

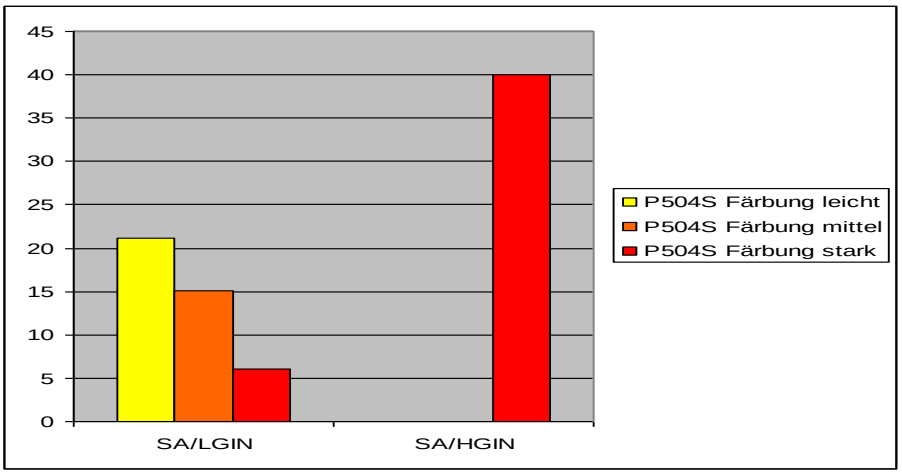

Diagramm 16: P504S Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten		**P504S**
	keine Färbung	**100,0%**

Tabelle 20: P504S, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	Bcl-2			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
Normale Kolonschleimhaut	76,9%	**23,1%**	0,0%	0,0%
Cronkhite-Canada-Polyp	58,3%	32,4%	5,6%	3,7%
Serratierte Adenome	63,2%	15,8%	5,3%	15,8%
Hyperplastische Polypen	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	15,213	0,085	0,096
Exakter Test nach Fisher	11,753		0,151

Tabelle 21: Bcl-2, Patientin mit CCS

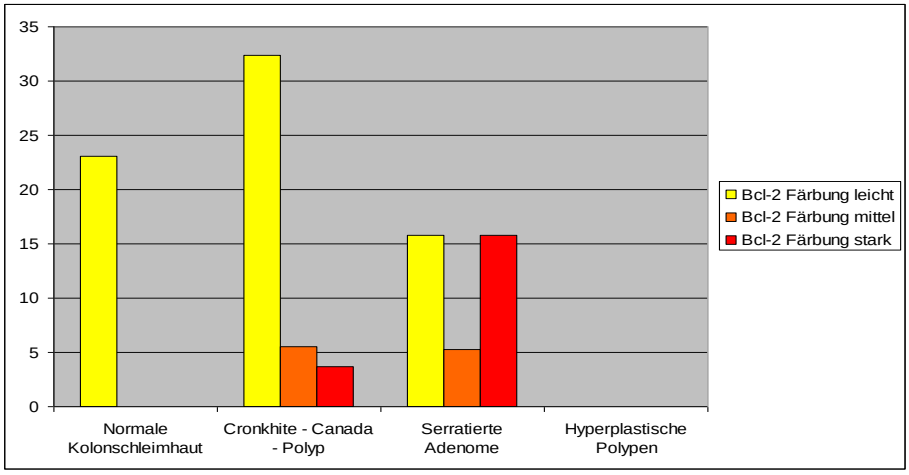

Diagramm 17: Bcl-2 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin	Bcl-2			
	keine Färbung	leicht	mittel	stark
SA/LGIN	63,6%	18,2%	6,1%	12,1%
SA/HGIN	60,0%	0,0%	0,0%	40,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,359	0,340	0,462
Exakter Test nach Fisher	2,788		0,516

Tabelle 22: Bcl-2, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

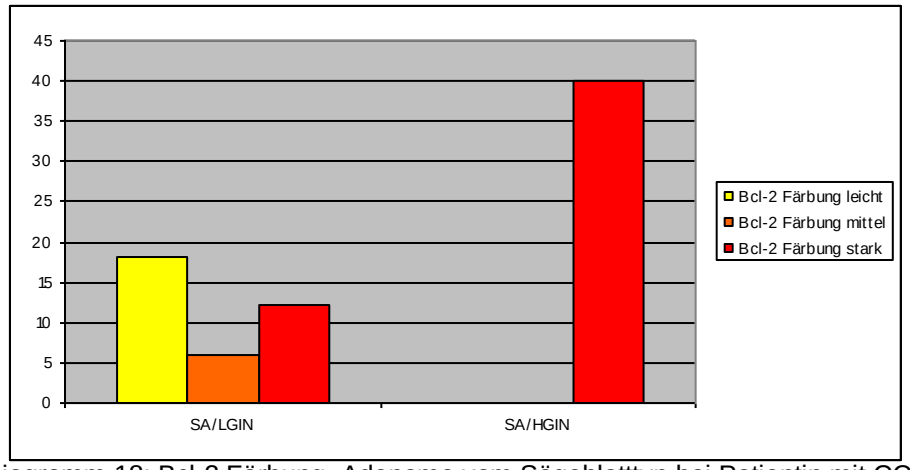

Diagramm 18: Bcl-2 Färbung, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten		Bcl-2
	keine Färbung	68,1%
	leicht	27,5%
	mittel	4,3%

Tabelle 23: Bcl-2, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

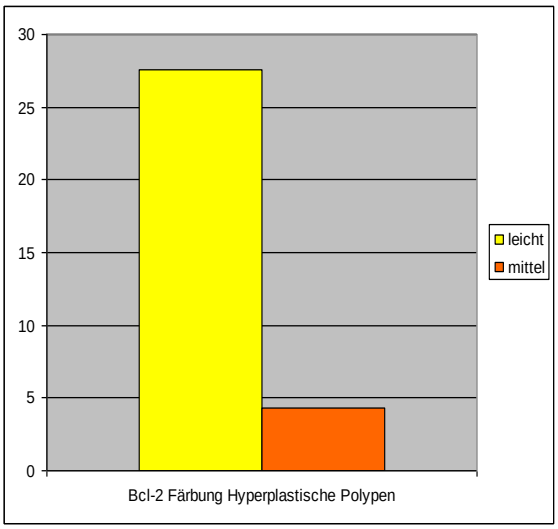

Diagramm 19: Bcl-2 Färbung, Hyperplastische Polypen bei Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)		CD10	
		Keine Färbung	stark
	Normale Kolonschleimhaut	92,3%	7,7%
	Cronkhite-Canada-Polyp	99,1%	0,9%
	Serratierte Adenome	100,0%	0,0%
	Hyperplastische Polypen	100,0%	0,0%

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,130	0,163	0,261
Exakter Test nach Fisher	4,856		0,261

Tabelle 24: CD10, Patientin mit CCS

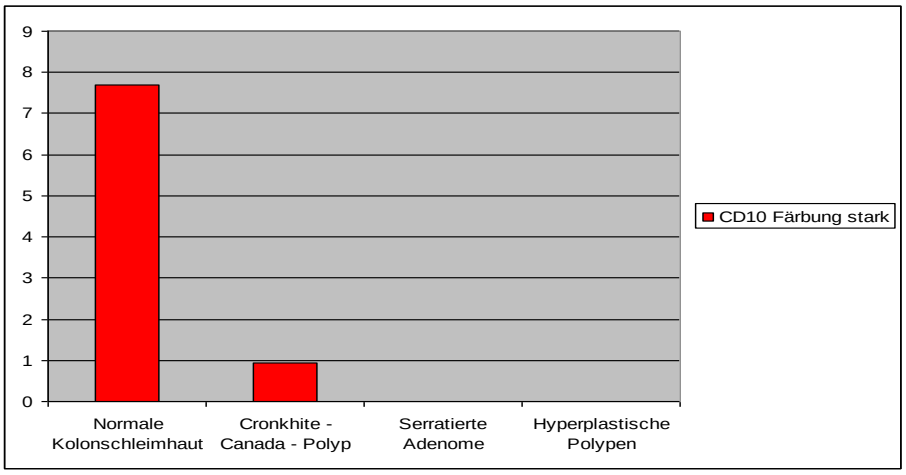

Diagramm 20: CD10 Färbung, Patientin mit CCS

Adenome vom Sägeblatttyp nach Dysplasiestufe bei CCS-Patientin		CD10
		keine Färbung
	SA/LGIN	100,0%
	SA/HGIN	100,0%

Tabelle 25: CD10, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

Hyperplastische Polypen unterschiedlicher Patienten		CD10
	keine Färbung	100,0%

Tabelle 26: CD10, Hyperplastische Polypen, Patienten ohne CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)		Ki67			
		Anzahl	Median	Perzentil 25	Perzentil 75
	Normale Kolonschleimhaut	13	**0**	0	0
	Cronkhite-Canada-Polyp	108	**0**	0	5
	Hyperplastische Polypen Patienten ohne CCS	147	**10**	**5**	**20**
	Serratierte Adenome	38	**3**	**0**	**5**
	Hyperplastische Polypen	5	0	0	0

Tabelle 27: Ki-67 labeling index, Patientin mit Cronkhite Canada Syndrom

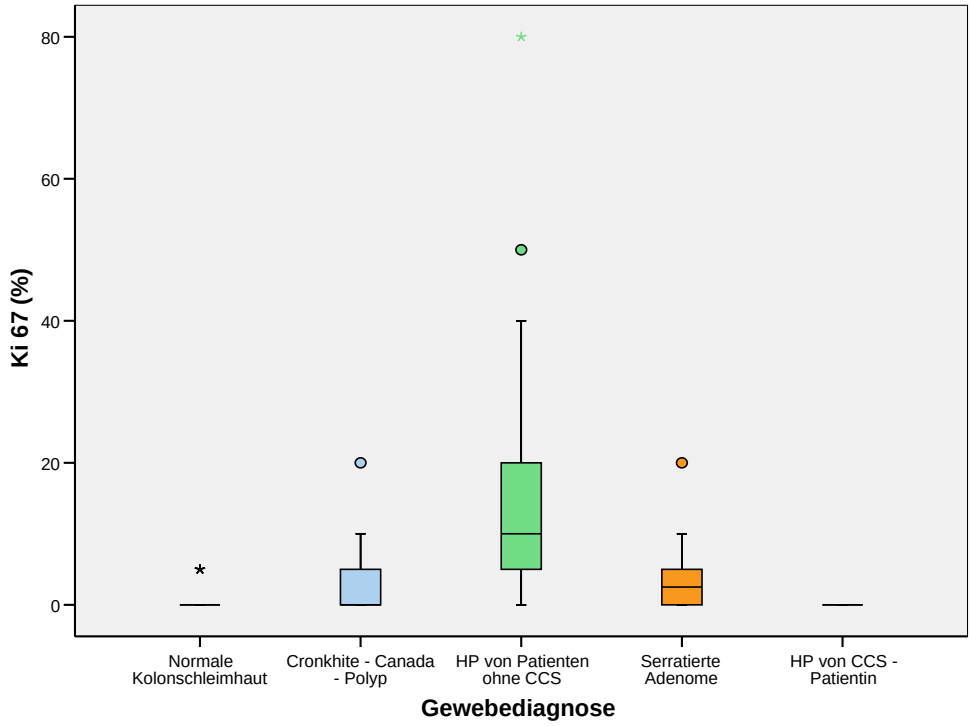

Diagramm 20: Ki-67, Boxplot, Patientin mit CCS

Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom (CCS)	Ki67 Mittelwert	N
Normale Kolonschleimhaut	1,15	13
Cronkhite-Canada- Polyp	1,67	108
Serratierte Adenome	3,82	38
Hyperplastische Polypen	0,00	5

Tabelle 27: Ki-67 labeling index Mittelwerte, Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom

SA/LGIN Ki-67	Anzahl N	33
Mittelwert		3,18
Perzentile	25	0,00
	50	0,00
	75	5,00

SA/HGIN Ki-67	Anzahl N	5
Mittelwert		8,00
Perzentile	25	5,00
	50	10,00
	75	10,00

Tabelle 28: Ki-67, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS

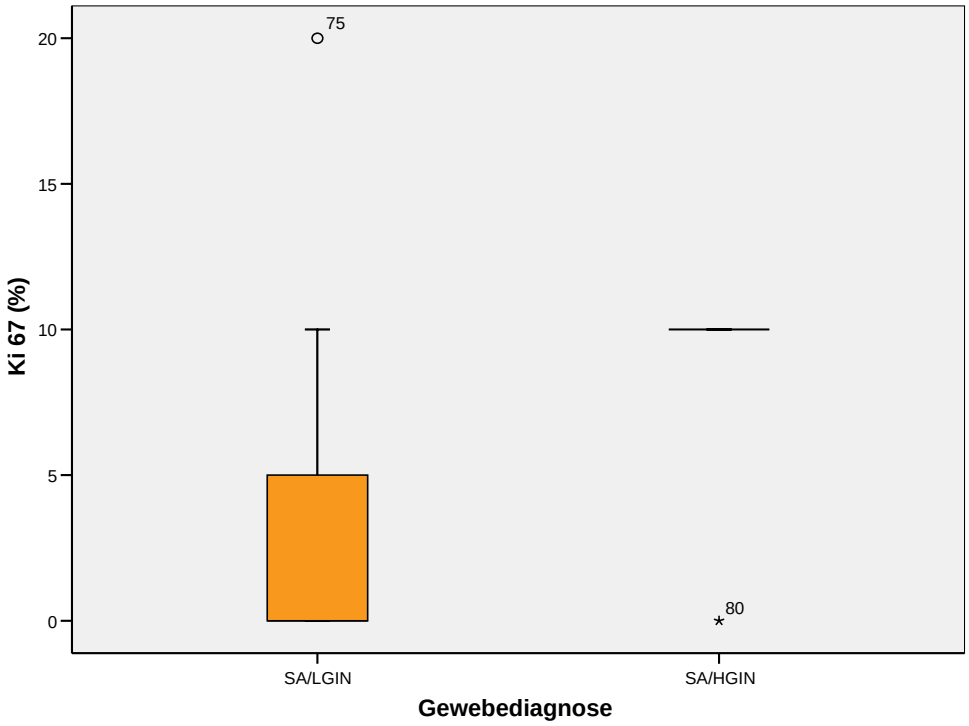

Diagramm 21: Ki-67 Boxplot, Adenome vom Sägeblatttyp bei Patientin mit CCS

Ki-67 (%)	Gewebediagnose	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
	4 SA/LGIN	33	18,03	595,00
	5 SA/HGIN	5	29,20	146,00

	Ki-67 (%)
Mann-Whitney-U	34,000
Wilcoxon-W	595,000
Z	-2,278
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	**0,023**
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	0,035

Tabelle 29: Ki-67, Adenome vom Sägeblatttyp, Patientin mit CCS, Mann-Whitney-U-Test

4 Diskussion

In diesem Projekt wurde die Tissue-Microarray-Technik zur Identifikation von molekularen Befunden in verschiedenen Arten von Kolonpolypen verwendet. Obwohl für jeden Polypen nur ein einziges Gewebefragment mit einem Durchmesser von 0,6 mm zur Untersuchung gelangte, zeigte die Studie mehrere signifikante Unterschiede zwischen diesen Tumorarten. Dieses Resultat passt zu den Ergebnissen verschiedener anderer Studien bei denen deutliche Zusammenhänge zwischen Gewebearraydaten und klinisch – pathologischen Parametern gefunden werden konnten. Beispielsweise haben mehrere Studien Zusammenhänge zwischen der in Tumoren typischerweise heterogenen Proliferationsaktivität und klinischen Verlaufsdaten beziehungsweise anderen molekularen Veränderungen gezeigt (Moch H, Sauter G. et al. 1997). Verschiedene Autoren haben ursprünglich die Repräsentativität von TMAs für klinisch pathologische Korrelationen bezweifelt (Merseburger AS et al. 2003). Möglicherweise kompensieren die Vorteile dieser TMA-Technik (standardisierte Untersuchung und Auswertung sämtlicher Präparate) die wahrgenommenen Nachteile einer geringen Gewebemenge.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung ergeben keine Anhaltspunkte für eine neoplastische Entstehung von Cronkhite-Canada-Polypen. Streng genommen finden sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen normaler Kolonschleimhaut und dem Epithel in Cronkhite-Canada-Polypen.

Dies gilt insbesondere für die für neoplastische Veränderungen bedeutsame Proliferation von Epithelzellen. Der Ki67-labelling-index war in normaler Kolonschleimhaut praktisch gleich wie in Cronkhite-Canada-Polypen (Mediane=0%, Tabelle 27). Die selten beobachteten p16 und oder P504S Überexpressionen in Cronkhite-Canada-Polypen könnten entweder mit dem Vorliegen einer Entzündung (gehäuft bei p16 positiven Cronkhite-Canada-Polypen?) oder (bei P504S) einem beginnend Übergang in ein Adenom vom Sägeblatttyp zusammenhängen. Andere Autoren hatten verschiedene Hypothesen zur Entstehung von Cronkhite-Canada-Polypen formuliert. Dazu

gehören unter anderem die Vermutung, dass Arsen für die Entstehung des Syndroms verantwortlich sein könnte (Senesse et al. 1999), oder die Verwandtschaft mit anderen Syndromen mit gastrointestinaler Polyposis wie dem Juvenilen Polyposis Syndrom (Burke et al.1989). Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Studien, die einen eindeutigen Hinweis auf die Ätiologie des Syndroms geben. Das auffallende Ödem in Cronkhite-Canada-Polypen wäre mit einer wichtigen Rolle von Gefäßen (vascular leakage?) bei dieser Erkrankung vereinbar.

Aufgrund der Koexistenz von Adenomen vom Sägeblatttyp (SA) und Cronkhite-Canada-Polypen (CCP) in unserer Patientin könnte auch spekuliert werden, dass es eine Genveränderung gibt, die SA und CCP gemeinsam ist. Trotz der hohen Häufigkeit von Adenomen vom Sägeblatttyp im Darm dieser Cronkhite-Canada-Syndrom-Patientin ließen sich aber keine direkten Anhaltspunkte für eine Entstehung von Adenomen vom Sägeblatttyp aus Cronkhite-Canada-Polypen finden. Einziges Argument für einen möglichen Zusammenhang dieser beiden Läsionen wäre die P504S Expression in einem kleinen Teil der Cronkhite-Canada-Polypen. Es könnte postuliert werden, dass diese P504S positiven Cronkhite-Canada-Polypen in ein Adenom vom Sägeblatttyp übergehen. Die hohe Häufigkeit der P504S Expression in Adenomen vom Sägeblatttyp lässt daran denken, dass dieses Protein auch in der Diagnostik von Darmadenomen eine Bedeutung haben könnte. Nachdem P504S ursprünglich als Marker zur Diagnostik von Prostatakarzinomen vorgeschlagen wurde, zeigten kürzlich durchgeführte Studien, dass dieses Protein bei vielen Präkanzerosen überexprimiert wird und möglicherweise in vielen diagnostischen Bereichen nützlich sein könnte. Offenbar gehört hierzu auch die histologisch oft schwierige Abgrenzung von Adenomen vom Sägeblatttyp und hyperplastischen Polypen.

Die nicht von der Cronkhite-Canada-Patientin stammenden hyperplastischen Polypen unterschieden sich deutlich von den ebenfalls untersuchten Cronkhite-Canada-Polypen und Adenomen vom Sägeblatttyp. Insbesondere wiesen die hyperplastischen Polypen eine deutlich erhöhte Proliferationsaktivität auf. Diese lag bei der Hälfte der Hyperplastischen

Polypen zwischen 5% und 20%, bei den als „maligner“ empfundenen Adenomen vom Sägeblatttyp lag die Hälfte zwischen 0% und 5%. Diese Resultate widersprechen den Befunden von Konishi et al. (2004), welche in Adenomen vom Sägeblatttyp eine höhere Proliferationsaktivität als in hyperplastischen Polypen beschrieben hatten. Es wäre denkbar, dass die Adenome vom Sägeblatttyp der Patientin eine besondere Variante von Adenomen vom Sägeblatttyp darstellt, welche besonders bei Cronkhite-Canada-Syndrom vorkommt und möglicherweise nicht repräsentativ für die Gesamtmenge der Adenome vom Sägeblatttyp ist, die typischerweise in Darmbiopsien diagnostiziert werden. Für diese Annahme würde auch die durchwegs atypische Morphologie der untersuchten Adenome vom Sägeblatttyp sprechen. Erst die Konsultation eines Referenzpathologen (Prof. Dr. med. M. Stolte, Klinikum Bayreuth, Institut für Pathologie) erlaubte es diese Diagnose mit Sicherheit zu stellen. Auch das andere Muzin-Expressionsmuster der meisten unserer hyperplastischen Polypen spricht gegen einen engen Verwandtheitsgrad zu Cronkhite-Canada-Polypen. Dies ist nicht unerwartet, denn im Gegensatz zu Cronkhite-Canada-Polypen sind hyperplastische Polypen eindeutig neoplastische Erkrankungen, welche typischerweise durch molekulare Veränderungen wie zum Beispiel Mutationen von BRAF etc. charakterisiert sind.

Keine Hinweise erlaubt diese Arbeit auf mögliche Anhaltspunkte für eine maligne Transformation in „low grade“ Polypen. P53 Mutationen, welche mit einem aggressiven Phänotyp in Kolonadenomen und Karzinomen assoziiert sind, waren in unseren Polypen nicht eindeutig vorhanden. Lediglich einzelne Adenome vom Sägeblatttyp zeigten eine schwache p53-Anfärbbarkeit. Derartig schwache p53-Protein-Nachweise sind nicht immer mit Mutationen des Gens assoziiert. In einzelnen hyperplastischen Polypen und Adenomen vom Sägeblatttyp konnte eine Expression von p16 und Bcl2 beobachtet werden. Beide Proteine spielen in der Kanzerogenese eine Rolle und werden in normaler Kolonschleimhaut nicht überexprimiert gefunden. Ob eine Expression dieser Gene auf eine bereits beginnende maligne Transformation von Polypen gewertet werden kann, ist derzeit unklar. O´Brien et al. (2004) vermuten, dass besonders Methylierungen von

Genen, unter anderem des Gens p16 (29,9% der hyperplastischen Polypen), eine Rolle in der Entstehung von Kolonkarzinomen spielt. Cho et al. (2000) zeigten, dass sich das Bcl2-Expressions-Verteilungmuster mit steigender Entartung im Kolongewebe verändert.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen Adenomen vom Sägeblatttyp, hyperplastischen Polypen und Cronkhite-Canada-Polypen auf der molekularen Ebene. Besonders bedeutsam ist aus unserer Sicht das völlige Fehlen von Anhaltspunkten für eine neoplastische Genese von Cronkhite-Canada-Polypen. Es stellt sich die Frage, ob die Entstehung dieser Polypen tatsächlich durch eine Läsion von Epithelzellen bedingt ist. Als alternative Pathogenese käme z.B. ein Stromadefekt bzw. eine erhöhte vaskuläre Permeabilität (vascular leakage) in Frage.

5 Zusammenfassung

Das Kolonkarzinom ist bei Männern und Frauen die zweithäufigste Neoplasie und die zweithäufigste Krebstodesursache. Die meisten Kolonkarzinome entstehen aus nicht-invasiven Vorstufen (Polypen). Bisher war man der Meinung, dass Kolonschleimhautadenome die einzigen polypösen Kolonkarzinomvorstufen darstellen. In letzter Zeit wurde aber klar, dass auch zumindest ein Teil der bisher als komplett benigne interpretierten Hyperplastischen Polypen eine Krebsvorstufe darstellen. Diese Erkenntnis hat bei den polypösen Darmerkrankungen auch zur Schaffung einer neuen Entität dem so genannten „Adenom vom Sägeblatttyp“ geführt. Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit war der Fall einer 58-jährigen Patientin mit Cronkhite-Canada-Syndrom, deren Kolon eine ungewöhnliche Kombination von massenhaft vielen Cronkhite-Canada-Polypen und zahlreichen Adenomen vom Sägeblatttyp enthielt. Das Vorliegen dieses einzigartigen Darms inspirierte uns zur Bearbeitung der folgenden Fragestellung:

Gibt es molekulare Unterschiede zwischen Adenomen vom Sägeblatttyp, Hyperplastischen Polypen, Cronkhite-Canada-Polypen bzw. normaler Darmschleimhaut?

Zur Klärung dieser Frage wurden Gewebeproben von 38 Adenomen vom Sägeblatttyp, 108 Cronkhite-Canada-Polypen und 13 Proben von normaler Darmschleimhaut auf einen Tissue-Micro-Array (TMA), 165 hyperplastische Polypen auf einen zweiten TMA gebracht. Die TMA-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 600 Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger mit in situ Techniken. Die Gewebeproben wurden immunhistochemisch auf die Proteine p53, p16, Bcl-2, P504S, MUC6, MUC2, MUC5AC, CD10 und Ki-67 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten nur geringe Unterschiede zwischen Cronkhite-Canada-Polypen und normaler Kolonschleimhaut. Dieses Resultat würde zu einer „nicht-neoplastischen“ Entstehung von Cronkhite-Canada-Polypen passen, z.B. durch Ödembildung in der Schleimhaut bedingt durch „vascular

leakage“, einer erhöhten Permeabilität der Gefäße. Veränderungen wie bei Adenomen vom Sägeblatttyp bzw. Dysplasien (Bcl-2-Positivität, P504S-Positivität, p16-Expression) fanden sich bei Cronkhite-Canada-Polypen nur sehr selten. Möglicherweise könnten solche molekularen Erscheinungen Vorboten einer neoplastischen Transformation bzw. einer Tumorbildung sein. Besonders eindrücklich war die geringe Proliferationsaktivität bei Cronkhite-Canada-Polypen (Median=0%), welche praktisch identisch ist zur Proliferationsaktivität in normaler Kolonschleimhaut (Median=0%). Eine stark erhöhte Proliferationsaktivität erwies sich charakteristisch für hyperplastische Polypen (Median=10%). Adenome vom Sägeblatttyp zeigten eine geringe Proliferationsaktivität (Median=3%), unterschieden sich von den vorher beschriebenen Diagnosen aber insbesondere in ihrer häufig erhöhten P504S-Expression (ca.40%). P504s (AMACR) wurde zuletzt bei verschiedenen Tumorarten als Indiz für eine neoplastische Transformation beschrieben. Auch in Kolonadenomen scheint dieser Marker diagnostisch relevant zu sein. Unter den Adenomen vom Sägeblatttyp ließen sich 33 Adenome mit geringer Dysplasie und 5 Adenome mit schwerer Dysplasie identifizieren. Die Zahl der Adenome mit schwerer Dysplasie war zu gering um signifikante Unterschiede zwischen Adenomen mit unterschiedlichen Dysplasieschweregraden zu erkennen.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen den Adenomen vom Sägeblatttyp, hyperplastischen Polypen und Cronkhite-Canada-Polypen auf molekularer Ebene. Besonders bedeutsam ist aus unserer Sicht das völlige Fehlen von Anhaltspunkten für eine neoplastische Genese von Cronkhite-Canada-Polypen. Es stellt sich die Frage ob die Entstehung dieser Polypen tatsächlich durch eine Läsion von Epithelzellen bedingt ist. P504s (AMACR) ist auch bei Kolonschleimhautadenomen ein brauchbarer Marker für Dysplasie und maligne Transformation.

6. Literatur

- Blonski, W. C., E. E. Furth, et al. (2005). "A case of Cronkhite-Canada syndrome with taste disturbance as a leading complaint." Digestion **71**(4): 201-5.

- Burke, A. P. and L. H. Sobin (1989). "The pathology of Cronkhite-Canada polyps. A comparison to juvenile polyposis." Am J Surg Pathol **13**(11): 940-6

- Cho, J. H., I. H. Roe, et al. (2000). "Topographic expression of p21WAF1/SDI1/CIP1, bcl2, and p53 is altered at the early stage of colorectal carcinogenesis." J Korean Med Sci **15**(6): 667-74.

- Cronkhite, L. W., Jr. and W. J. Canada (1955). "Generalized gastrointestinal polyposis; an unusual syndrome of polyposis, pigmentation, alopecia and onychotrophia." N Engl J Med **252**(24): 1011-5.

- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.

- Hirama, T. and H. P. Koeffler (1995). "Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer." Blood **86**(3): 841-54.

- Ikeda, Y., M. Mori, et al. (2002). "The role of adenoma for colorectal cancer development: differences in the distribution of adenoma with low-grade dysplasia, high-grade dysplasia, and cancer that invades the submucosa." Surgery 131(1 Suppl): S105-8.

- Jarvinen, H., A. Husa, et al. (1984). "[Finnish registry for familial colonic adenomatosis]." Duodecim 100(18): 1158-65.

- Jass, J. R., K. Baker, et al. (2006). "Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer." Histopathology 49(2): 121-31.

- Jiang, Z., G. R. Fanger, et al. (2003). "A dietary enzyme: alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S is overexpressed in colon carcinoma." Cancer Detect Prev 27(6): 422-6.

- Kim, D. H., J. W. Kim, et al. (2005). "Expression of mucin core proteins, trefoil factors, APC and p21 in subsets of colorectal polyps and cancers suggests a distinct pathway of pathogenesis of mucinous carcinoma of the colorectum." Int J Oncol 27(4): 957-64.

- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell 87(2): 159-70.

- Konishi, K., T. Yamochi, et al. (2004). "Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas." Clin Cancer Res 10(9): 3082-90.

- Kononen, J., L. Bubendorf, et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med 4(7): 844-7.

- Lloyd, R. V., L. A. Erickson, et al. (1999). "p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers." Am J Pathol 154(2): 313-23.

- Longacre, T. A. and C. M. Fenoglio-Preiser (1990). "Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia." Am J Surg Pathol 14(6): 524-37.

- Makinen, M. J., S. M. George, et al. (2001). "Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis." J Pathol 193(3): 286-94.

- Merseburger, A. S., M. A. Kuczyk, et al. (2003). "Limitations of tissue microarrays in the evaluation of focal alterations of bcl-2 and p53 in whole mount derived prostate tissues." Oncol Rep 10(1): 223-8.

- Moch, H., G. Sauter, et al. (1997). "p53 protein expression but not mdm-2 protein expression is associated with rapid tumor cell proliferation and prognosis in renal cell carcinoma." Urol Res 25 Suppl 1: S25-30.

- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science 253(5020): 665-9.

- O'Brien, M. J., S. Yang, et al. (2004). "Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype." Am J Surg Pathol 28(4): 423-34.

- Ogawa, H., K. Iwaya, et al. (2002). "Expression of CD10 by stromal cells during colorectal tumor development." Hum Pathol 33(8): 806-11.

- Reed, T. E. and J. V. Neel (1955). "A genetic study of multiple polyposis of the colon with an appendix deriving a method of estimating relative fitness." Am J Hum Genet 7(3): 236-63.

- Sauter, G., R. Simon, et al. (2003). "Tissue microarrays in drug discovery." Nat Rev Drug Discov 2(12): 962-72.

- Seibt S. (2006) Tissue microarrays zur Evaluation der prognostischen Relevanz des Ki67-Färbeindex beim Mammakarzinom und zur Untersuchung des Einflusses molekularer Marker auf die

Proliferationsaktivität von Tumoren. Med.Dissertation, Universität Hamburg

- Senesse, P., E. Justrabo, et al. (1999). "[Cronkhite-Canada syndrome and arsenic poisoning: fortuitous association or new etiological hypothesis?]." Gastroenterol Clin Biol **23**(3): 399-402.

- Shinya, H. and W. I. Wolff (1979). "Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps." Ann Surg **190**(6): 679-83.

- Takakura M, Adachi H, Tsuchihashi N, Miyazaki E, Yoshioka Y, Yoshida K, Oryo F, Sawada T: A case of Cronkhite-Canada syndrome markedly improved with mesalazine therapy. Dig Endosc 2004;16:74-78.

- Takeuchi, Y., M. Yoshikawa, et al. (2003). "Cronkhite-Canada syndrome with colon cancer, portal thrombosis, high titer of antinuclear antibodies, and membranous glomerulonephritis." J Gastroenterol **38**(8): 791-5.

- Torhorst, J., C. Bucher, et al. (2001). "Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints." Am J Pathol **159**(6): 2249-56.

- Urbanski, S. J., A. E. Kossakowska, et al. (1984). "Mixed hyperplastic adenomatous polyps--an underdiagnosed entity. Report of a case of adenocarcinoma arising within a mixed hyperplastic adenomatous polyp." Am J Surg Pathol **8**(7): 551-6.

- Ward, E. M. and H. C. Wolfsen (2002). "Review article: the non-inherited gastrointestinal polyposis syndromes." Aliment Pharmacol Ther **16**(3): 333-42.

- Yang, S., F. A. Farraye, et al. (2004). "BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status." Am J Surg Pathol **28**(11): 1452-9.

- Yashiro, M., H. Kobayashi, et al. (2004). "Cronkhite-Canada syndrome containing colon cancer and serrated adenoma lesions." Digestion **69**(1): 57-62.

- Yu, H. G., L. L. Yu, et al. (2003). "Increased expression of RelA/nuclear factor-kappa B protein correlates with colorectal tumorigenesis." Oncology **65**(1): 37-45.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei dieser Arbeit ihre Unterstützung geboten haben:

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. med. A. Marx, welcher mir bei dieser Dissertation mit seinem unermüdlichen Einsatz und seiner fachlichen Kompetenz zur Seite stand, beraten und angeleitet hat. Durch seine Hilfe konnte diese Arbeit erst zustande kommen. Dank ihm konnte ich nicht nur mein medizinisches Fachwissen erweitern, sondern nehme viele Anregungen mit auf meinem weiteren Lebensweg.

Ich möchte mich auch außerordentlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G. Sauter bedanken, welcher mir ermöglicht hat an der Klärung von molekularen Veränderungen eines sehr seltenen Syndroms mitzuwirken. Sein Engagement, seine fachkompetente Beratung und seine Ideen haben es mir möglich gemacht meine Arbeit zu realisieren.

An dieser Stelle auch vielen Dank an PD Dr. R. Simon und Dr. med. U. Reichelt, welche mir bei der Auswertung der Ergebnisse hilfreich waren.

Für die Unterstützung und Beratung bei der statistischen Auswertung herzlichen Dank an Prof. Dr. K. Wegscheider und Frau S. Sehner.

Des Weiteren großen Dank an L. Tharun. Mir hat die gemeinsame Arbeit sehr viel Spaß gemacht.

Ebenfalls möchte ich mich bei den technischen Angestellten des Instituts für Pathologie, und ganz besonders bei Martina Mirlacher, für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Name:	Pawel Mariusz Bralla
Geburtsdatum:	08.06.1984
Geburtsort:	Danzig (Polen), 1987 Aussiedlung nach Deutschland
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
1990 – 1994	Katholische Grundschule in Bergedorf
1994 – 2003	Katholisches Gymnasium, Sankt-Ansgar-Schule
14.06.2003	Abitur
01.07.2003	Eintritt in den Sanitätsdienst der Bundeswehr als „Sanitätsoffizieranwärter“
ab 01.10.2003	Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
01.03.2004 – 31.03.2004	Offiziersschule des Sanitätsdienstes der Bundeswehr
08/2005	Abschluss des ersten Abschnittes der ärztlichen Prüfung
08/2006	Beginn der Arbeit an der Dissertation Tissue Microarrays zur Evaluation der molekularen Eigenschaften von Cronkhite – Canada Polypen und nicht adenomatösen Polypen
01/2007	Annahme der Promotionsarbeit durch den Promotionsausschuss
07/2008	Anmeldung zum Praktischen Jahr
08/2008	Beginn des Praktischen Jahres

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: Bralla