

Aus der
Chirurgischen Klinik und Hochschulambulanz I
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prognostische Relevanz von p53 und den Mismatch Repair Genen
MLH1 und MSH2 beim kolorektalen Karzinom und deren Bedeutung
für den Benefit einer adjuvanten Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Kathrin Müller
aus Berlin

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. M. Kruschewski
2.: Prof. Dr. med. S. Höcht
3.: Priv.-Doz. Dr. med. P. Schneider

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Das kolorektale Karzinom.....	6
1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms.....	6
1.1.2. Klinik und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms.....	6
1.1.3. Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	7
1.1.4. Prognose des kolorektalen Karzinoms	8
1.2. Hereditäres und sporadisches kolorektales Karzinom	9
1.3. Molekulare Entstehungsmechanismen für Karzinome, insbesondere für das kolorektale Karzinom.....	9
1.4. Molekulargenetik	10
1.4.1. Übersicht über den Zellzyklus und seine Regulation.....	10
1.4.2. Tumorsuppressorgen p53	14
1.4.2.1. Regulation und Funktion von p53.....	14
1.4.2.2. Expression und Mutation von p53	16
1.4.2.2. Die p53-unabhängige Apoptose: die mitotische Katastrophe	17
1.4.2.3. Zusammenhang zwischen p53 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie.....	18
1.4.3. Die Mismatch Repair Gene	18
1.4.3.1. Regulation und Funktion der Mismatch Repair Gene.....	18
1.4.3.2. Expression und Mutation der Mismatch Repair Gene	18
1.4.3.3. Zusammenhang zwischen den Mismatch Repair Genen und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie	20
1.5. Zusammenfassung	20
1.6. Fragestellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Ein- und Ausschlusskriterien	22
2.2. Erhebung der Patientendaten.....	23
2.3. Therapie.....	24
2.4. Anfertigung der histologischen Schnitte	24
2.5. Immunhistochemie	25

2.5.1. Etablierung der Immunhistochemie von p53, MLH1 und MSH2.....	25
2.5.2. Immunhistochemische Technik.....	25
2.5.3. Durchführung der Expressionsanalyse.....	25
2.6. Ermittlung des p53-Mutationsstatus.....	26
2.7. Mikroskopische Auswertung.....	27
2.8. Statistische Auswertung.....	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Patientenkollektiv.....	30
3.2. Immunhistochemische Analyse.....	34
3.3. Tumorsuppressorgen p53.....	36
3.3.1. Expressionsstatus des Tumorsuppressorgens p53.....	36
3.3.2. Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens p53.....	38
3.4. Mismatch Repair Gene.....	41
3.4.1. Expressionsstatus von MLH1 und MSH2.....	41
3.4.2. Mismatch Repair Gen-Expressionsstatus.....	45
3.5. Koinzidenz zwischen p53 und den Mismatch Repair Genen.....	47
3.6. Adjuvante Therapie.....	49
3.6.1. p53-Expressionsstatus und adjuvante Therapie.....	49
3.6.2. p53-Mutationsstatus und adjuvante Therapie.....	49
3.6.3. Mismatch Repair Gen-Status und adjuvante Therapie.....	50
3.6.4. p53, Mismatch Repair Gene und adjuvante Therapie.....	51
4. Diskussion.....	52
4.1. Einführung.....	52
4.2. Material und Methoden.....	53
4.3. Diskussion der Ergebnisse.....	55
4.3.1. Zusammensetzung des Patientengutes.....	55
4.3.2. p53-Status.....	55
4.3.2.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika.....	55
4.3.2.2. Einfluss der p53-Expression auf die Prognose.....	57
4.3.2.3. Einfluss der p53-Mutation auf die Prognose.....	58
4.3.3. Mismatch Repair Gen-Expressionsstatus.....	60
4.3.3.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika.....	60
4.3.3.2. Einfluss der Mismatch Repair Gene auf die Prognose.....	61

4.3.4. Koinzidenz zwischen p53 und den Mismatch Repair Genen.....	62
4.3.5. Genstatus und Einfluss der adjuvanten Therapie auf die Prognose	63
4.3.5.1. p53-Expressionsstatus und adjuvante Therapie	63
4.3.5.2. p53-Mutationsstatus und adjuvante Therapie	64
4.3.5.3. Mismatch Repair Gen-Status und adjuvante Therapie.....	66
4.3.6. p53, Mismatch Repair Gene und adjuvante Therapie	67
4.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	68
5. Zusammenfassung	69
6. Abkürzungsverzeichnis	71
7. Literaturverzeichnis	73
8. Danksagungen	85
9. Erklärung	86
10. Lebenslauf.....	87
11. Publikationsliste.....	88

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Krebsleiden der westlichen Welt. Sechs Prozent der Bewohner der westlichen Industrienationen müssen damit rechnen, während ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Von diesen sechs Prozent wird voraussichtlich ein Drittel der Patienten die folgenden fünf Jahre aufgrund ihres Tumorleidens nicht überleben. Hinsichtlich seiner Häufigkeit zeigt das kolorektale Karzinom eine deutlich höhere Inzidenz in Australien, Nordamerika und Europa als in Afrika und Asien. Hierzulande ist es bei der Frau nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste, beim Mann nach dem Bronchial- und Prostatakarzinom das dritthäufigste Karzinom. Pro Jahr erkranken rund 50.000 Patienten in der Bundesrepublik am kolorektalen Karzinom, 30.000 sterben jährlich an den Folgen. Das kolorektale Karzinom stellt die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht dar. Der Erkrankungsgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt.

Anhand von Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, nicht nur genetisch bedingt ist, sondern dass auch exogene Faktoren eine bedeutende Rolle einnehmen. Zu diesen Faktoren zählen neben nicht beeinflussbaren wie männlichem Geschlecht und Alter auch Nikotin- und Alkoholhabitus, Übergewicht, Bewegungsarmut sowie falsche Ernährungsgewohnheiten. Empfohlen wird eine ausgewogene Kost, in der viel Wert auf Obst und Gemüse gelegt wird und Fleisch und Fett eher selten verzehrt werden sollten [1].

1.1.2. Klinik und Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist ein langsam wachsender Tumor und bleibt klinisch lange unbemerkt. Zu den uncharakteristischen Symptomen gehören Flatulenz, Darmkrämpfe, chronische Anämie und Gewichtabnahme sowie Stuhlnunregelmäßigkeiten, Blut im Stuhl, abwechselnd Diarrhöen und Obstipation. Im lokal fortgeschrittenen Stadium kann es zum Ileus kommen. Zur klinischen Früherkennung dienen, neben der Koloskopie als Mittel der Wahl, die rektal-digitale Untersuchung und die Testung auf okkultes Blut im Stuhl (Hämocult-Test).

Die Lokalisations-Verteilung und die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms sind den Tabellen 1 und 2 entnehmbar.

Anatomische Verteilung	Häufigkeit (%)
Zökum	14
Colon ascendens	10
Colon transversum	12
Colon descendens	7
Sigma	25
Rektosigmoidaler Übergang	9
Rektum	23

Tabelle 1: Anatomische Verteilung des kolorektalen Karzinoms [2]

UICC	Dukes	TNM-Stadium	Definition
0		TIS N0 M0	Carcinoma in situ
I	A	T1 N0 M0 T2 N0 M0	Beschränkung auf Mukosa und Submukosa Infiltration Muscularis propria
II	B	T3 N0 M0 T4 N0 M0	Infiltration aller Wandschichten Überschreiten der Darmwand
III	C	Tx N1-2 M0	Regionale Lymphknoten
IV	D	Tx Nx M1	Fernmetastasen

Tabelle 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms [3]

1.1.3. Therapie des kolorektalen Karzinoms

Nach der Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der deutschen Krebsgesellschaft [4] beinhaltet die kurative Therapie des kolorektalen Karzinoms neben der primären chirurgischen Therapie die Durchführung einer adjuvanten Therapie. Beim Kolonkarzinom im Stadium III erfolgte eine Kombination von 5-Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure (FA) für sechs bis acht Monate. Diese Therapie wurde beim Rektumkarzinom im Stadium II und III durch eine Radiotherapie ergänzt (siehe Abbildung 3, Seite 19). Außerhalb von klinischen Studien ist heute die Therapie nach dem FOLFOX-Schema aufgrund der Überlegenheit gegenüber 5-Fluoruracil und Folinsäure seit 2004 (nach der MOSAIC-Studie) der neue Standard in der adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms [5]. Dieses sieht eine Chemotherapie über 14 Tage mit Folinsäure, Oxaliplatin und Fluorouracil vor. Beim Rektumkarzinom im Stadium II oder III wird eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie empfohlen [6].

1.1.4. Prognose des kolorektalen Karzinoms

Als entscheidender prognostischer Faktor gilt bei erfolgreicher R0-Resektion des Primärtumors, das nach der UICC-Klassifikation festgelegte Tumorstadium. Bei fortschreitendem Tumorstadium verschlechtert sich die Prognose zusehends (Tabelle 3).

UICC-Stadium	Kolonkarzinom (%)		Rektumkarzinom (%)	
	m	w	m	w
UICC I und II	92,4	90,2	86,0	87,6
UICC III	67,5	66,7	57,2	57,6
UICC IV	8,2	8,9	7,8	7,6
Gesamt	61,9	60,5	60,2	61,5

Tabelle 3: Fünfjahresüberlebensrate des CRCs von 1992–1997 nach dem SEER Cancer Statistics Review des amerikanischen National Cancer Institute in Prozent, (www.cancer.gov)

Neben dem Tumorstadium gibt es eine Vielzahl von weiteren Faktoren, die die Prognose beeinflussen, hierzu zählen: Tumorlokalisierung, histologische Differenzierung, Lymphgefäß-Infiltration, Tumorperforation, Obstruktion und Operateur [7-11]. Des Weiteren wurde im Verlauf der vergangenen Jahre ein Zusammenhang zwischen der Prognose des kolorektalen Karzinoms und unterschiedlichen molekulargenetischen Markern ermittelt. So werden Veränderungen (Mutationen, Blockierungen oder Abwesenheit) von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose diskutiert [12].

Vielen bisherigen Arbeiten ist zu entnehmen, dass sich die individuelle Behandlung von Patienten mit CRC grundlegend ändern kann, wenn die Bedeutung der einzelnen die Karzinogenese betreffenden Gene vollständig aufgedeckt und erklärt ist. Die Kenntnis des genetischen Status könnte in Zukunft nicht nur Behandlung und Prognose der Patienten bestimmen, sondern auch eine prädiktive Funktion übernehmen. Die Ergänzung bisheriger Screeningverfahren zur Erkennung von frühen Vorstadien von Darmkarzinomen durch andere Methoden ist erstrebenswert. Hierbei ist die Erforschung und Etablierung der molekularbiologischen Marker hervorzuheben. Die Detektion von Mutationen der Onkogene und Tumorsuppressorgene, die zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms beitragen, wäre eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Untersuchungsmethoden, da diese Marker schon vor Entwicklung eines invasiven Karzinoms nachweisbar sind. Insbesondere beim sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinom wäre dies eine vielversprechende Methode, da keine Grundkrankheit eruierbar ist und Frühsymptome meist fehlen.

Patienten mit Tumoren desselben Grundtyps können also durchaus unterschiedliche Verläufe ihrer Krankengeschichte aufweisen. Während ein Patient mit CRC jahrelang beschwerde- und rezidivfrei bleibt, kann ein anderer nur Monate später an seinem kolorektalen Karzinom versterben. Dieses Phänomen wird durch die unterschiedliche Ausstattung der Tumorzellen der beiden Patienten mit „genetischen Problemen“ begrifflich. Zu erwarten ist zukünftig ein Voranschreiten der Forschung in Richtung der Bestimmung des individuellen Tumormutationsprofils und die Entwicklung einer rational begründeten, maßgeschneiderten Therapie [13].

1.2. Hereditäres und sporadisches kolorektales Karzinom

Beim CRC unterscheidet man zwischen einer sporadischen (85%) und einer hereditären Form (15%). Auch kann es im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen auftreten.

Beim sporadischen CRC stellen Adenome fakultative Präkanzerosen dar, aus denen sich im späteren Verlauf innerhalb von 10–15 Jahren Karzinome entwickeln können, diese Entstehung wird auch als Adenom-Karzinom-Frequenz bezeichnet. Man geht davon aus, dass sich aus etwa 10% der Kolon-Adenome Karzinome entwickeln.

Genetische Faktoren führen bei den erblichen Syndromen zu einer häufigeren und frühzeitigen Karzinomentwicklung. Zu den erblichen Syndromen zählen: Hereditäres Nichtpolypöses Kolonkarzinom (HNPCC), Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), Gardner-Syndrom, juvenile Polyposis und Peutz-Jeghers-Syndrom.

Ein erhöhtes Karzinomrisiko findet man auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn [14, 15].

1.3. Molekulare Entstehungsmechanismen für Karzinome, insbesondere für das kolorektale Karzinom

Bekannt sind zwei verschiedene molekulare Entstehungsmechanismen für Karzinome: CIN und MSI.

Bei der CIN (chromosomale Instabilität), auch Suppressor-Pathway genannt, kommt es zur Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene. Dieser Weg ist auch unter der Adenom-Karzinom-Sequenz bekannt [16]. Hierbei kommt es zur Aktivierung von Onkogenen (ras) und

zur Inaktivierung (Mutation) verschiedener Tumorsuppressorgene (DCC, p53 oder APC), was dazu führt, dass aus einem Adenom ein invasives Karzinom entsteht. Tumorsuppressorgene kodieren normalerweise Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren und somit die Möglichkeit verringern, dass eine Zelle zur Tumorzelle mutieren kann. Ebenfalls rechnet man diejenigen Gene zu den Tumorsuppressorgenen, die Proteine kodieren, welche die Zelle zur Apoptose („programmierter Zelltod“) veranlassen können. Die Entwicklung des sporadischen kolorektalen Karzinoms ist mittels der Adenom-Karzinom-Sequenz erklärbar.

Bei der MSI (Mikrosatelliteninstabilität), auch Mutator-Pathway genannt, kommt es zu irreversiblen Mutationen in DNA-Mismatch Repair Genen (MMRG) und einer unkorrigierbaren Basenfehlpaarung in repetitiven Abschnitten der DNA, den sogenannten Mikrosatelliten. Durch diese Basenfehlpaarung entstehen Längenpolymorphismen, welche man als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Die Entstehung von sekundären Mutationen und malignen Transformationen ist begünstigt und ein CRC kann entstehen. Bei etwa 90% der HNPCC-Patienten kann eine Mikrosatelliteninstabilität beobachtet werden [17, 18], die jedoch nicht spezifisch für das HNPCC ist, denn auch sporadische kolorektale Karzinome sind zu 10–20% durch Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet [17, 19-21].

1.4. Molekulargenetik

1.4.1. Übersicht über den Zellzyklus und seine Regulation

Um die Entstehung und die vielfältigen Möglichkeiten der genetischen Alterationen besser verstehen zu können, wird im folgenden Kapitel eine Übersicht des Zellzyklus gegeben. Die vier Phasen des menschlichen Zellzyklus sind in Tabelle 4 dargestellt.

M-Phase:	Mitose
G1-Phase	Je nach Notwendigkeit growth oder gap (Wachstum oder Unterbrechung)
S-Phase	Synthese (DNA-Replikation)
G2-Phase	Nach Abschluss der DNA-Synthese bis zur nächsten Mitose

Tabelle 4: Die vier Phasen des menschlichen Zellzyklus

In der G1-Phase wird die Entscheidung getroffen, ob die Zelle in die S-Phase eintritt (also „growth“) oder sich vor der DNA-Replikation differenziert bzw. in den programmierten Zelltod übergeht (also „gap“).

Die Zellzykluskontrolle und -progression erfolgt über cyclinabhängige Kinasen (Cdk: cyclin independent kinases) und ihre Cycline, welche an die inaktiven Cdks binden und diese so aktivieren. Die entstandenen Komplexe steuern über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus [22]. Ist ein bestimmter Abschnitt in der G1-Phase überschritten, der auch als Restriktionspunkt bezeichnet wird, geht die Zelle die unwiderrufliche Verpflichtung zur Zellteilung ein. Häufig kommt es in malignen Tumoren zur Dysregulation dieser Restriktionspunkte mit der Folge von genetischer und chromosomaler Instabilität.

Die Cdks werden durchnummeriert, ihre jeweiligen Cycline mit Großbuchstaben gekennzeichnet. In Tabelle 5 sind die für den menschlichen Zellzyklus relevanten Cdks mit ihren dazugehörigen Cyclinen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus dargestellt.

M-Phase	Cdk1/B
G1-Phase	Cdk6/D Komplex phosphoryliert Rb Cdk4/D Komplex phosphoryliert Rb
Übergang G1-S	Cdk2/E
S-Phase	Cdk2/A
Übergang G2-M	Cdk1/A

Tabelle 5: Die Zellzyklusphasen und ihre jeweils relevanten Cdks mit dazugehörigen Cyclinen

Cdk/Cyclin-Komplexe bewirken ein Fortschreiten des Zellzyklus, Hemmer dieser Komplexe (Antionkogene) wirken gewissermaßen als Bremsen am Zellzyklus. Man unterscheidet zwei Gruppen von Inhibitoren (Cdk: cyclin dependent kinase inhibitors). Zu der ersten gehören die Mitglieder der CIP/KIP-Familie, die die Cyclin-Cdk-Komplexe der S- und G2-Phase hemmen (p21 CIP1/WAF1, p27 Kip1 und p57 Kip2), zu der zweiten gehören die Mitglieder der INK-Familie, die die Cyclin-Cdk-Komplexe der G1-Phase hemmen (p16 INK4a, p15 INK4b, p18 INK4c und p14 INK4d).

Insgesamt entsteht durch das Zusammenspiel von Cyclinen, cyclin-abhängigen Kinasen und Inhibitoren ein reich vernetztes, untereinander abhängiges System, welches zum einen Signale von außen moduliert, zum anderen auch interne Rückmeldung über den regelrechten Ablauf des Zellzyklus aufnimmt und weitere Schritte bis hin zur Zellteilung initiieren kann.

Die Cdk/Cyclin-Komplexe, die in der G1-Phase bei Anwesenheit von Wachstumssignalen aktiv werden, bewirken die Phosphorylierung, also funktionelle Inaktivierung des Rb-Proteins [23-26]. Dieses demaskiert und aktiviert den Transkriptionsfaktor E2F, indem es von ihm abfällt. E2F aktiviert nun seine Zielgene [27-30], dargestellt in Tabelle 6.

Cyclin E	Dihydrofolatreductase
Cdk1 und Cdk2	Apaf1
c-myc und c-myb	Capspase3
DNA-Polymerase	p14ARF
Thymidinkinase	E2F selbst als kurzfristige positive Rückkopplung

Tabelle 6: Zielgene von E2F

Diese Zielgene kodieren Proteine, die in der S- und M-Phase wichtige Funktionen wie beispielsweise die Synthese von Desoxynucleotidtriphosphaten übernehmen. Bei Abwesenheit von Wachstumssignalen fungiert Rb als Antionkogen bzw. synonym als Tumorsuppressorgen, indem es E2F maskiert und die Zelle somit in der G1-Phase festhält.

Des Weiteren gibt es das Tumorsuppressorgen p53. Beim Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen wird es aktiviert, induziert daraufhin sein Zielgen p21, welches seinerseits diejenigen Cdk/Cyclin-Komplexe blockiert, die sonst Rb phosphorylieren würden. Somit bleibt E2F maskiert, und die Zelle arretiert in der G1-Phase, in der nun die Reparatur des DNA-Schadens erfolgen kann, oder, wenn dieser irreparabel ist, über p53 der apoptotische Zelltod induziert wird [31].

Auch p14 gehört zu den Tumorsuppressorgen. Es fungiert als Inhibitor des Zellzyklus und antagonisiert die mdm2-Funktion. Mdm2 bindet normalerweise an p53 und ist Teil einer negativen Rückkopplungsschleife, welche zum Abbau von p53 durch Proteasen führt. Unter normalen Bedingungen ist der p53-Spiegel eher niedrig. Interagiert nun p14 mit mdm2 und hält dieses im Nukleolus zurück, kann p53 nicht zur Degradation ins Zytoplasma gelangen [32]. Folglich führt p14 zur Stabilisierung und erhöhter Expression von p53.

Wie p14 ist auch p16 ein INK4a-Protein. Beide führen auf unterschiedlichem Weg zum Zellzyklusarrest. Während p14 über die mdm2-Hemmung die p53-Expression erhöht und somit Arrest oder Apoptose ermöglicht, führt p16 über die Hemmung des Cdk4 und Cdk6/D-Komplexes zum G1-Zellzyklusarrest.

Wie p21 und p57 zählt auch p27 zu den Cdk-Inhibitoren und gehört zur Cip/Kip-Familie. Erhöhte p27-Mengen finden sich in der G0- und G1-Phase von Zellen, die arretieren. Sobald die

Zellen in die S-Phase übergehen, wird das Protein wieder abgebaut [33]. Folglich kontrolliert p27 den Übergang der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus und verhindert diesen, wenn es vermehrt gebildet wird.

Die Zellzyklus- und Apoptoseregulation sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

Abbildung 1: Zellzyklusregulation durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen [34]

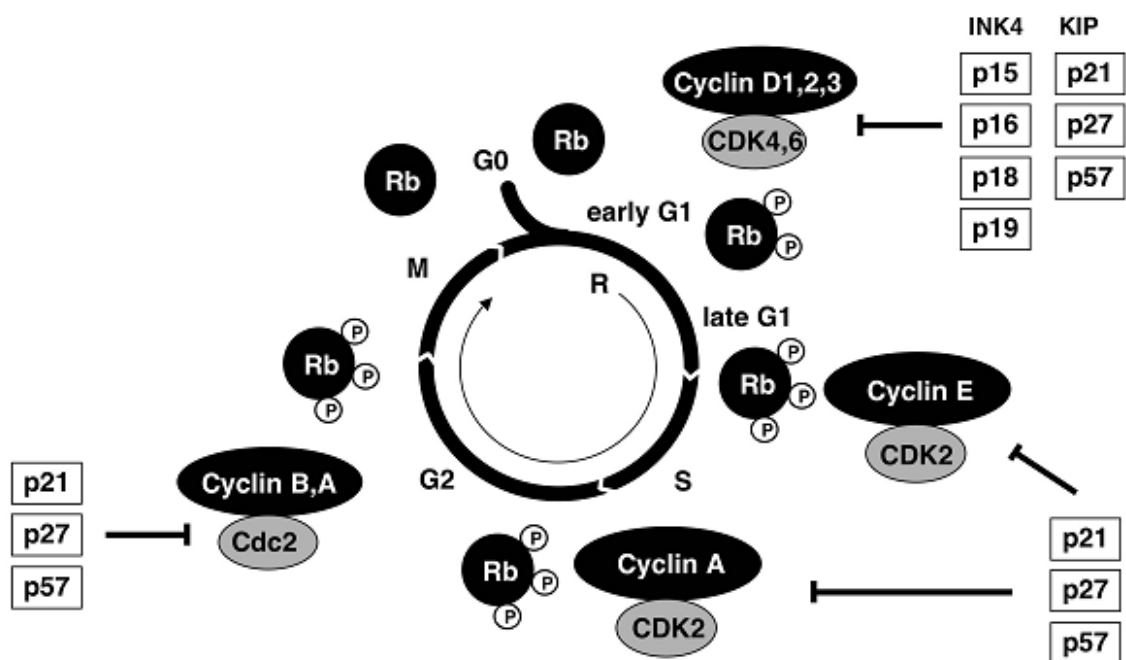
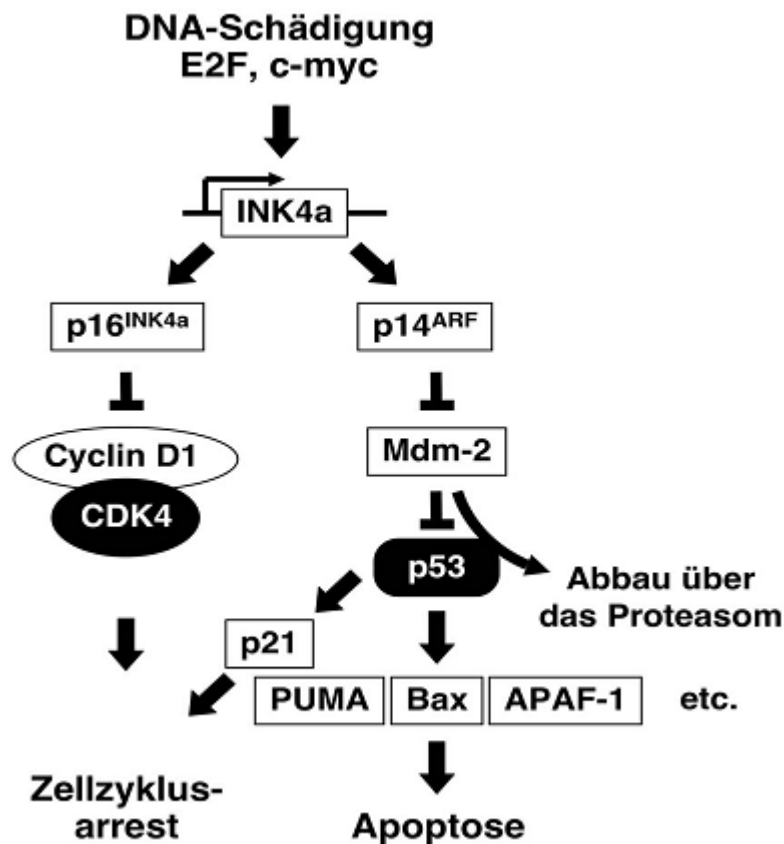


Abbildung 2: Zellzyklus- und Apoptoseregulation [34]



1.4.2. Tumorsuppressorgen p53

1.4.2.1. Regulation und Funktion von p53

Mit einem Molekulargewicht von 53.000 Dalton, das zur Namensgebung führt und 393 Aminosäuren Länge ist das humane p53 auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 kodiert. Es ist ein wichtiges Regulationsmolekül, welches in Wachstum, Apoptose, Transformationen sowie in die Differenzierung von Zellen eingreift.

Im Zentrum der p53-Regulation steht die Interaktion mit dem Onkoprotein mdm2, welches oft auch als „Master Regulator of p53“ bezeichnet wird. Mdm2 bindet an p53 im N-terminalen Bereich direkt in der Transaktivierungs-Domäne [24, 35, 36] und kann dann durch Störung der Wechselwirkung von p53 mit seinen transkriptionellen Aktivatoren die transkriptionelle Aktivität von p53 beeinflussen und direkt hemmen [37-39]. Der p53-Proteinspiegel wird folglich über einen negativen Feedbackmechanismus reguliert. Einerseits führt p53 durch transkriptionelle Aktivierung des mdm2-Gens zu dessen Akkumulation, andererseits ist mdm2 an der Degradation (Abbau) von p53 beteiligt. Mdm2 ist die E3-Ligase von p53 und führt als

solche durch das Ubiquitin-Proteasom-System zum Abbau von p53 [40, 41]. Die zwei Gene p53 und mdm2 bilden somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus.

In einigen Tumorarten liegt mdm2 erhöht vor (z.B. durch Genduplikation), dies verhindert die Akkumulation von p53 und führt zu einer Anhäufung genetischer Defekte. Beispielsweise zeigte sich bei Kindern mit ALL und erhöhter mdm2-Expression eine schlechtere Prognose als für Kinder mit ALL und fehlender mdm2-Expression [42]. Auch scheint die Überexpression von mdm2 und p53 bei Patienten mit Sarkomen eine negative Rolle zu spielen [43, 44].

Ein anderes Gen, welches an der Regulation von p53 beteiligt ist, ist p14ARF. Die Überexpression dieses Tumorsuppressorgens induziert eine Akkumulation von p53, es interagiert direkt mit mdm2 und hält dieses im Nukleolus zurück, so dass p53 nicht zur Degradation ins Zytoplasma gelangen kann [32]. Es fungiert gewissermaßen als Stabilisator von p53. Des Weiteren führt die Überexpression von p14 zur Erhöhung von p21, welches ein transkriptionelles Zielgen von p53 ist [45, 46]. Als Transkriptionsfaktor kontrolliert p53 die Expression von p21. Als Folge eines genotoxischen Stresses akkumuliert p53 in der Zelle, führt über die Aktivierung von p21 zum Zellzyklusarrest und ermöglicht so die DNA-Reparatur bzw. die Apoptose.

In vielerlei Studien wurde dieser Signalweg der Tumorsuppressorgene untersucht. Oftmals ging eine p53-Mutation oder der Verlust von p53 mit dem Verlust von p21 einher, was dafür spricht, dass der Verlust des funktionalen p21-Proteins Folge der p53-Alteration und nicht Folge eine Mutation von p21 selbst ist. Beispielsweise untersuchten Li et al. in ihrer Arbeit die p21-Mutation mittels PCR bei 45 CRC ohne p53-Mutation und konnten keine somatischen Mutationen von p21 feststellen [47]. In einer anderen Studie an über 300 Tumoren verschiedenster Karzinome konnte bei Abwesenheit von p53-Mutation (untersucht mittels PCR) keine p21-Mutation nachgewiesen werden [48]. Die p21-Inaktivierung scheint daher Folge einer p53-Mutation zu sein.

Die zwei wohl bedeutendsten Aufgaben von p53 sind die Induktion des Zellzyklusarrests (von G1 nach S oder von G2 nach M) und des apoptotischen Zelltods [31]. Diese beiden Signalwege erlauben p53, das Wachstum gestresster Zellen zu kontrollieren. Die Kontrolle geschieht entweder durch Zellzyklusarrest, in welchem DNA-Reparaturen durchgeführt werden können, bevor weitere Replikationszyklen stattfinden, oder durch endgültiges Entfernen von Zellen aus dem Organismus durch Apoptose [49]. Zur Herbeiführung der Apoptose induziert p53 BAX, welches die Apoptose fördert, oder es hemmt BCL-2, welches die p53-vermittelte Apoptose verhindert. Zum Zellzyklusarrest kommt es durch die p53-abhängige Aktivierung von p21.

Somit schützt p53 die menschlichen Körperzellen vor onkogenetischer Veränderung und verhindert die Tumorentstehung.

1.4.2.2. Expression und Mutation von p53

Die häufigsten Aberrationen (Punktmutationen) betreffen die hydrophobe Mittelregion des p53-Proteins (sogenannte „hot spots“) [50]. Durch die Inaktivierung von p53 durch Mutation, Deletion oder Komplexbildung mit anderen Proteinen kommt es zum Ausbleiben des programmierten Zelltods und damit zum ungebremsten Wachstum der Tumorzelle. Als negativer Regulator hat p53 somit seine Funktion verloren. Es kann nun auch mit Onkoproteinen aus der Reihe ras, myc oder E1A interagieren. Dadurch kommt es zur Beeinträchtigung der Stabilität; die Mutationen können nun indirekt die sequenz-spezifische DNA-Bindung und Transkriptionsfaktoraktivität beeinträchtigen [51].

Die mutierte Form des p53 hat im Vergleich zu seinem Wildtyp eine stark verlängerte HWZ (circa 24 Std. vs. 20 min.), weshalb in den meisten malignen Tumoren die mutierte Form in einer höheren Konzentration vorliegt und auch nur in diesen immunhistochemisch nachgewiesen werden kann [52, 53].

Diese Akkumulation des Genproduktes induziert über einen bisher unbekanntem Mechanismus eine humorale Immunantwort gegen p53-Proteine mit Antikörpern zumeist der IgG-Klasse. Diese Antikörper konnten bei vielen Karzinompatienten nachgewiesen werden. Bei Patienten mit CRC beispielsweise waren in 26% der Fälle AK gegen p53 zu finden, der Titer stieg parallel zum Tumorprogress an [54]. Es wäre denkbar, dass Karzinome mithilfe dieser Methode vor der klinischen Manifestation entdeckt werden können, was jedoch unserem Wissen nach noch in keiner klinischen Studie untersucht wurde.

Des Weiteren führt die mutierte Form des p53 zu einer fehlenden Verzögerung des Zellzyklus in der G1-Phase, in welcher die Schäden der DNA repariert werden. Sinkt nun die Reparaturzeit, kommt es zur vermehrten Anzahl von Mutationen und der Tumor wächst.

Deletionen in Allelen des p53-Tumorsuppressorgens sind bei Karzinomen sehr häufig (75%), relativ selten jedoch bei Adenomen (10%), weshalb auf eine späte Inaktivierung dieses Gens in der Kolonkarzinogenese geschlossen wurde [55].

Bei über 50% der menschlichen malignen Tumoren konnte eine Mutation oder ein Verlust von p53 nachgewiesen werden [56]. Eine somatische Mutation von p53 speziell beim CRC konnte in etwa 40–60% gezeigt werden [57-60].

1.4.2.2. Die p53-unabhängige Apoptose: die mitotische Katastrophe

Ursprünglich wurde mit dem Begriff „mitotische Katastrophe“ der Zelltod beschrieben, zu dem es dadurch kommt, dass prämaturo Zellen durch eine Überproduktion der zyklinabhängigen Kinasen Cdc-2 in Hefen bzw. CDK-1 in Säugerzellen (beides Proteine, die eine Kontrollpunktfunktion an den Übergängen der Teilungsphasen innehaben) zur Mitose gezwungen werden [61].

Heutzutage wird jedoch jeglicher Zelltod, bedingt durch eine Mitoseaberration, als „mitotische Katastrophe“ bezeichnet. Die mitotische Katastrophe ist demnach durch das Auftreten von aberranten Mitosen charakterisiert. Ausgelöst wird sie durch verschiedene Stimuli wie z.B. die plötzliche Expression von p21 oder die Inhibition von hMps1-Kinase.

In gesunden Zellen kommt es nur beim Vorliegen einer unbeschädigten DNA zum Übertritt von der G2- zur M-Phase der Mitose. Bewerkstelligt wird dieser Übertritt, welcher zur Auflösung der Kernmembranen, zur Zentrosomen-Trennung, zur Spindelauflösung und zur Chromosomen-Kondensation führt, durch die Aktivierung des CDK-1-Cyclin-Komplexes [62, 63]. Beim Vorliegen eines G2-Checkpoint-Defektes kommt es jedoch zur verfrühten M-Phase. Die Zelle ist nun äußerst empfänglich für die mitotische Katastrophe. Durch das verfrühte Eintreten in die Mitose kommt es zur abnormalen Chromosomenausrichtung und Überduplikation von Zentrosomen und schließlich zur Multipolarität der Mitosen.

Derzeit liegt ein wissenschaftlicher Fokus auf der Erforschung des Signalweges der p53-unabhängigen Mitose und somit auf der Identifizierung der beteiligten Gene und deren Regulation im Detail.

In einer Studie erhielten sowohl p53wt-Zellen als auch p53mut-Zellen des CRCs eine Behandlung mit Irinotecan (CPT-II). Die p53wt-Zellen reagierten mit einem über Tage anhaltenden G2/M-Arrest, wohingegen die p53mut-Zellen nur für wenige Tage arretierten und es im Verlauf zu einer p53-unabhängigen mitotischen Katastrophe (Apoptose) über die unzureichende Unterdrückung der hMps1-Kinase-Expression kam [64].

In einer weiteren Studie wurden Zellreihen (p53wt/MLH1-negativ, p53wt/MLH1-positiv, p53mut/MLH1-negativ) mit CPT-II behandelt. In der Gruppe p53wt/MLH1-positiv zeigte sich eine Verlängerung des Zell-Zyklus-Arrestes auf 12 Tage und keine Apoptose, in der Zellreihe p53mut/MLH1-negativ folgte auf einen nur 4-tägigen G2/M-Arrest die mitotische Katastrophe. In der dritten Gruppe (p53wt/MLH1-negativ) erhöhte sich die Dauer des Zell-Zyklus-Arrestes auf 6–9 Tage, zudem kam es zu Apoptosen. Auch hier konnte eine p53-unabhängige Apoptose, induziert durch CPT-II, gezeigt werden. Zudem scheint das mutierte MLH1 die CPT-II-induzierte Apoptose zu verstärken [65].

1.4.2.3. Zusammenhang zwischen p53 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie

Im Laufe der letzten Jahre ist eine Vielzahl von Publikationen zur prognostischen Bedeutung von p53 beim CRC mit widersprüchlichen Ergebnissen erschienen. Viele Arbeiten verbinden die Mutation des p53-Gens mit einer schlechteren Prognose für den Patienten [60, 66], andere wiederum weisen keine prognostische Relevanz nach [67, 68].

Maßnahmen wie Chemotherapie und Bestrahlung scheinen einerseits um vieles effektiver, wenn der Tumor noch funktionstüchtiges p53 besitzt [69], andererseits zeigt sich in vielen Studien ein inverser [70] oder kein Zusammenhang zwischen dem p53-Status und dem Ansprechen auf eine adjuvante Therapie [67, 71].

1.4.3. Die Mismatch Repair Gene

1.4.3.1. Regulation und Funktion der Mismatch Repair Gene

Alle Mismatch Repair Gene (hMLH1, hMSH2, hMSH3, hPMS1, hPMS2, hMSH6) kodieren Enzyme, die an der Reparatur der DNA nach Replikationsfehlern, physikalischen oder chemischen Schäden beteiligt sind.

Abhängig von der Art der zu reparierenden Läsion bildet MSH2 ein Heterodimer mit MSH6 oder MSH3 für die Fehlererkennung. Ein Komplex aus MSH2 und MSH6 ist für die Korrektur von Einzelbasenfehlern verantwortlich, wohingegen für die Reparatur von Insertions- oder Deletionsfehlern MSH3 oder MSH6 einen Komplex mit MSH2 bilden können. Ein Heterodimer aus MLH1 und PMS2 koordiniert das Zusammenspiel zwischen dem Fehlererkennungskomplex und anderen wichtigen Reparaturproteinen. Diese Proteine können Exonuklease1 (EXO1), Helikasen, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Einzelstrang-DNA-Bindungsproteine (RPA) oder DNA-Polymerasen δ und ϵ sein [72].

1.4.3.2. Expression und Mutation der Mismatch Repair Gene

Kommt es zu Mutationen in den Reparaturgenen, so können während der Zellteilung aufgetretene Fehler nicht mehr korrigiert werden. Die Folge ist eine Anhäufung von Replikationsfehlern in repetitiven DNA-Sequenzen, den sogenannten Mikrosatelliten. Das menschliche Genom besteht zu 70% aus diesen Mikrosatelliten, deren Funktion noch unbekannt ist, während die restlichen 30% die gencodierende DNA darstellen. Treten nun im Bereich der Mikrosatelliten solche Längenpolymorphismen (Verkürzungen oder Verlängerungen) auf, resultiert eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) [73]. Diese genomische Instabilität,

die einen Mutator-Phänotyp, den sogenannten „Replication-error phenotyp“ zur Folge hat, begünstigt weitere sekundäre Mutationen und ermöglicht eine maligne Transformation [19, 21, 74, 75].

Obwohl die MSI in verschiedenen Karzinomen vorkommt, ist es schwierig, ihre Prävalenz zu bestimmen. Daher wurden die Richtlinien des National Cancer Institute (NCI) für die Detektion von MSI beim kolorektalen Karzinom eingeführt. Ein Feld von 5 Mikrosatellitenloki, bestehend aus zwei Mononukleotidrepeats (Bat25, Bat26) und drei Dinukleotidrepeats (D2S123, D5S346, D17S250), sollte in jedem Tumor untersucht werden. Dann können die Tumoren in drei Gruppen unterteilt werden: high level MSI (MSI-H), bei denen >30–40% eine Instabilität aufweisen, low level MSI (MSI-L), deren Instabilität <30% umfasst und die MSI-stabilen (MSS) Karzinome. Die NCI-Kriterien identifizieren ausschließlich Tumoren mit MLH1 und MSH2 Mutationen, die bei >90% der MSI-positiven Tumoren vorkommen. Andere Mutationen, zum Beispiel von MSH6, welche zu einer MSI-L führen, werden dabei nicht untersucht.

Eine MSI-H wird bei >90% der HNPCC assoziierten- und bei etwa 15% der sporadischen kolorektalen Karzinome beobachtet [74, 76].

Während die Mikrosatelliteninstabilität beim HNPCC aufgrund von Keimbahnmutation zustande kommt, ist der Verlust der Reparaturgenexpression in über 90% beim sporadischen CRC auf die Inaktivierung von MLH1 aufgrund von Methylierung zurückzuführen [77-79].

MSI-positive Tumoren aus beiden Gruppen weisen ähnliche histologische und biologische Merkmale auf [80]. Sie werden im Gegensatz zu MSI-L- und MSS-Tumoren in einem früheren Stadium entdeckt und haben eine geringere Inzidenz von Lymphknotenbefall und Fernmetastasen [81]. MSI-H-Tumoren treten häufig bei Frauen auf [72], sind im proximalen Kolon lokalisiert [80], gering bis mäßig differenziert [82], haben eine muzinöse Komponente [80] und zeigen häufig deutliche peri- und intratumorale Lymphozyteninfiltrate [83].

Im Gegensatz zu MSI-H-Tumoren unterscheiden sich MSI-L- und MSS-Tumoren biologisch und histologisch kaum voneinander, trotzdem zeigen sie einen Unterschied in der Prävalenz einiger genetischer Mutationen, wie zum Beispiel k-ras, und könnten somit eine andere Untergruppe der Tumoren bilden [84].

1.4.3.3. Zusammenhang zwischen den Mismatch Repair Genen und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie

Der MSI-Status des CRCs wurde wiederholt in Hinsicht auf seinen prognostischen Wert untersucht. Einige Studien zeigten, dass es einen bemerkenswerten Unterschied im Überlebensbenefit zwischen MSI-H und MSI-L/MSS gibt [85-87]. In der Studie von Salashor et al. fand sich dagegen kein Überlebensunterschied zwischen MSI-positiven und -negativen Tumoren [20]. Diese Untersuchung stützte sich allerdings nur auf ein kleines Kollektiv und den routinemäßigen Einsatz der adjuvanten Chemotherapie.

Der Effekt des MSI-Status auf die Ergebnisse einer adjuvanten Therapie wurde in vielen Studien untersucht. Einige Studien zeigten, dass unabhängig vom MSI-Status die Prognose ohne Chemotherapie annähernd gleich ist und dass eine adjuvante Therapie die Überlebensrate für MSI-positive Patienten steigert [85, 88]. Eine andere Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass die MSI-positiven Patienten ohne Chemotherapie einen bemerkenswerten Überlebensbenefit gegenüber den MSI-negativen Patienten aufweisen. Jedoch unterschieden sich die Überlebenschancen nach Anwendung einer adjuvanten Therapie in beiden Gruppen, MSI-positiv und MSI-negativ, nicht [89].

1.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend bietet die TNM-Klassifikation beim CRC zwar eine Grundlage zur Therapieplanung, Prognoseeinschätzung und Bewertung des Krankheitsverlaufs, jedoch wird sie oftmals dem einzelnen Patienten nicht gerecht. In den letzten Jahren nahmen die molekularen Marker daher eine immer wichtigere Rolle beim CRC ein. Bedeutend sind hierbei besonders die Regulatoren von Apoptose und Zellzyklus, da die Therapieprotokolle zur adjuvanten Behandlung des CRCs größtenteils apoptoseinduzierende Therapeutika einsetzen. Zu diesen Regulatoren zählen wie zuvor beschrieben auch das Tumorsuppressorgen p53 und die Mismatch Repair Gene MLH1 und MSH2.

Das Ansprechen auf eine Chemotherapie hängt von der Zusammensetzung der molekularen Läsionen des jeweiligen Tumors ab. Sehr häufig werden beim CRC Läsionen von p53 und den MMRG MLH1 und MSH2 beschrieben. Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur kontrovers diskutierte Rolle von p53 und den MMRG sowie deren Einfluss auf die adjuvante Therapie beim CRC zu evaluieren. Hierzu wurde der Expressionsstatus von p53, MLH1 und

MSH2 immunhistochemisch ermittelt; indirekt wurde durch Kenntnis des p21-Expressionsstatus auf den wahrscheinlichen Mutationsstatus von p53 geschlossen.

Im Interessenmittelpunkt stand die getrennte Untersuchung des Einflusses des p53-Expressionsstatus und des p53-Mutationsstatus. In bisherigen Arbeiten wurde meist lediglich der p53-Expressionsstatus ermittelt, wobei dieser nicht dem p53-Mutationsstatus entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass p53wt-Zellen nach chemotherapeutischer Behandlung in einem längerfristigen Zellarrest verbleiben (p53-abhängiger Arrest), wohingegen p53mut-Zellen nach chemotherapeutischer Behandlung eine vorzeitige Mitose („mitotische Katastrophe“ oder p53-unabhängiger Arrest) durchführen. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass die Länge des p53-unabhängigen Arrestes bei Behandlung mit Oxaliplatin vom MMRG-Status beeinflusst wird [65, 90]. In bisherigen Studien wurde bei der Untersuchung des MMRG-Status beim CRC der p53-Mutationsstatus meist nicht berücksichtigt, die Zellpopulationen wurden lediglich auf ihre p53-Expression untersucht. Tumoren mit p53wt und p53mut wurden demnach stets als eine Gruppe zusammengefasst und ausgewertet. Dies ist eine mögliche Erklärung für die bisher kontroversen Ergebnisse.

1.6. Fragestellung

In dieser Arbeit sollte anhand eines Patientengutes mit kurativ operiertem kolorektalen Karzinom untersucht werden, welchen Einfluss der p53-Expressions-, der p53-Mutations- und der MMRG-Status auf bestimmte Tumorcharakteristika, den klinischen Verlauf sowie das Ansprechen auf die adjuvante Therapie beim CRC hat.

2. Material und Methoden

Untersucht wurde das Tumorgewebe von Kolon- bzw. Rektumkarzinomen der Patienten, die im Zeitraum von 1995 bis 2000 bzw. 1998 bis 2001 in der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin kurativ operiert worden sind. Die Daten dieser Patienten wurden online dokumentiert. Zur Erhebung der klinischen Nachsorgedaten der Patienten wurde den betreuenden Ärzten ein Fragebogen zugesandt. Die von der Pathologie bereitgestellten Tumorblöcke wurden zu histologischen Schnitten verarbeitet. Dann folgte die Etablierung der immunhistochemischen Färbetechnik und anschließend die Färbung aller Gewebeschnitte. Dem schlossen sich die mikroskopische Auswertung und die statistischen Berechnungen an.

2.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Zum Anfang der Studie wurden Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt, nach denen die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte (Tabelle 7).

<u>Einschlusskriterien:</u>	<u>Ausschlusskriterien:</u>
<ul style="list-style-type: none">• Kurativ operierte sporadische kolorektale Karzinome<ul style="list-style-type: none">• Kolonkarzinome UICC III• Rektumkarzinome UICC II und III• Operationszeitraum<ul style="list-style-type: none">• Kolonkarzinome 1995–1998• Rektumkarzinome 1995–2001• Follow-Up<ul style="list-style-type: none">• Kolonkarzinome mindestens 5 Jahre• Rektumkarzinome mindestens 2 Jahre	<ul style="list-style-type: none">• Zweit-/Doppelkarzinome• Rezidive• UICC I und IV• Hereditäres CRC• Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Tabelle 7: Ein- und Ausschlusskriterien für das zu untersuchende Patientenkollektiv

Erfasst wurden diejenigen Patienten, deren Mindestnachsorgezeitraum beim Kolonkarzinom fünf Jahre und beim Rektumkarzinom zwei Jahre betrug. Wir orientierten uns bei der Festlegung des Follow-Up an der Arbeit von Hermanek et al., die zeigt, dass eine Nachbeobachtungszeit beim Rektumkarzinom von zwei Jahren nach Operation als verlässlicher Surrogatendpunkt angesehen

werden kann [91]. Für das Kolonkarzinom konnte ein solcher Zusammenhang nicht nachgewiesen werden, weshalb wir uns an die übliche Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren hielten.

2.2. Erhebung der Patientendaten

Die allgemeinen Patientendaten, Tumordaten und Therapiedaten und die nachsorgenden Ärzte wurden der Online-Datenbank entnommen. Die Nachsorgedaten wurden entweder direkt der Krankenakte entnommen, wenn die Patienten weiter in der chirurgischen Poliklinik betreut wurden, oder mittels schriftlicher Befragung des betreuenden Hausarztes ermittelt. Eine Übersicht der erfassten Patienten- und Tumorcharakteristika findet sich in Tabelle 8. Neben der körperlichen Untersuchung umfasst die Tumornachsorge die Bestimmung der Tumormarker, bildgebende Diagnostik (Sonographie, Röntgen, CT) sowie die Endoskopie (Tabelle 9).

<p><u>Patientendaten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Name • Geburtsdatum • Geschlecht • Identifikationsnummer 	<p><u>Tumordaten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumorlokalisierung • TNM-Klassifikation • Grading • Histologienummer
<p><u>Therapiedaten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Operationsdatum • Alter bei Operation • Adjuvante Chemotherapie/ kombinierte Radio-Chemotherapie 	<p><u>Nachsorgedaten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumorrezidiv (Lokalrezidiv, Fernmetastasen) • Letzter Behandlungstermin • Todesdatum/Todesursache

Tabelle 8: Übersicht der erfassten Patienten- und Tumorcharakteristika

Untersuchung	Monate										
	3	6	9	12	15	18	21	24	36	48	60
Anamnese, körperliche Untersuchung		X		X		X		X	X	X	X
Koloskopie		X							X		
Abdomensonographie		X		X				X	X	X	X
Sigmoidoskopie (Rektoskopie)		X		X				X			
Spiralcomputertomographie	X										
Röntgen-Thorax (kein Konsens)											

Tabelle 9: Programmierte Untersuchungen im Rahmen der Nachsorge beim kolorektalen Karzinom UICC II oder III nach dem AWMF-Leitlinien-Register [92]

2.3. Therapie

Bei der Therapie unseres Patientenkollektivs hielten wir uns an die damaligen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der Deutschen Krebsgesellschaft [93]. Neben der chirurgischen Resektion erfolgte beim Kolonkarzinom im UICC-Stadium III eine Kombinationstherapie mit 5-Fluoruracil und Folinsäure über sechs bis acht Monate. Beim Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III erfolgte eine Radiochemotherapie entsprechend dem Schema der Abbildung 3.

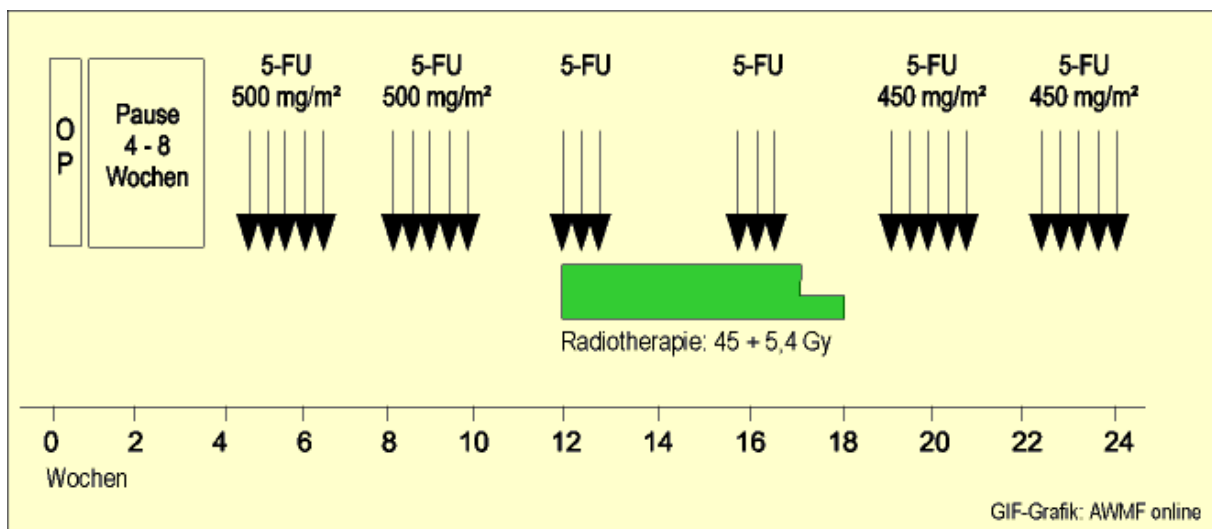


Abbildung 3: Adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms (UICC-Stadien II und III) nach den Leitlinien der CAO/AIO/ARO, [93]

2.4. Anfertigung der histologischen Schnitte

Das Institut für Pathologie (Campus Benjamin Franklin, Direktor Prof. Dr. med. H. Stein) stellte die formalinfixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebeblöcke zur Verfügung. Nach Auswahl der repräsentativen Blöcke anhand der Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen, folgte die Anfertigung der 3-5 µm dicken histologischen Schnitte mithilfe des Mikrotoms. Die Schnitte wurden dann auf Objektträger aufgetragen und über Nacht im Ofen bei einer Temperatur von 60° C getrocknet. Auf den Schnitten zeigten sich Bereiche normaler Darmmukosa mit Übergang zu Anteilen des Karzinoms. Vor der immunhistochemischen Färbung mussten die Schnitte mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und einer 15minütigen hitzeinduzierten Antigendemaskierung im Citratpuffer (pH 6,0) zugeführt werden. Anschließend folgte die Behandlung mit Protein-Block (Dako# X0909).

2.5. Immunhistochemie

2.5.1. Etablierung der Immunhistochemie von p53, MLH1 und MSH2

Um ein optimales zuverlässiges und reproduzierbares Färbegergebnis zu erhalten, erfolgte die Etablierung der Immunhistochemie mit den unten genannten Antikörpern. Hierfür war die Durchführung einiger Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Farbeinwirkzeiten notwendig. Das Weglassen des Primärantikörpers diente als Negativkontrolle.

2.5.2. Immunhistochemische Technik

Die Antigendetektion mittels Immunhistochemie ist ein zweiphasiger Prozess, bei dem erst die Bindung eines Antikörpers an das zu untersuchende Antigen stattfindet und als zweiter Schritt, die Detektion und Visualisierung des Antikörperbindungskomplexes mithilfe eines Enzymchromogensystems erfolgt. Für diesen Prozess gibt es verschiedene Detektionssysteme, die einerseits mit direkten, andererseits mit indirekten Methoden arbeiten. Bei der direkten Methode bindet das Enzym an den primären Antikörper, bei der indirekten Methode ist das Enzym über ein zweites Reagenz (sogenannte Link-Antikörper, Brückenantikörper) an den primären Antikörper gebunden.

Die am häufigsten angewendeten indirekten Methoden sind das Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-, das Avidin-Biotin-Komplex (ABC)- und das Biotin-Streptavidin Amplified (B-SA)-System.

Für diese Arbeit wurde das Super Sensitive Detection System (Large Volume, Ready-to-Use Reagent Kit) von BioGenex (# QA 900-9L) verwendet. Hierbei ist der Brückenantikörper so modifiziert, dass er in der Lage ist, mehr Biotinmoleküle zu binden, ohne dabei seine Bindungseigenschaften zu beeinflussen. Zudem besteht eine Verbesserung einiger Enzymeigenschaften, so dass dieser Detektionskit gegenüber anderen indirekten Methoden vorgezogen wurde.

2.5.3. Durchführung der Expressionsanalyse

Nach Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden die primären monoklonalen Antikörper anti-p53 (Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, DakoCytomation), anti-hMLH1 (Mouse anti-human MLH-1, Clone G168-15, Pharmigen) und anti-hMSH2 (Mouse anti-human MSH-2 (Ab-2), Cat# NA27, Oncogene) in der in Tabelle 10 dargestellten Verdünnung appliziert und im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Als Verdünnungsmedium wurde bei allen Anwendungen

Antibody diluent solution (Zymed # 01162756) gebraucht. Anschließend erfolgte die Verwendung des Detektionskits und des Chromogens (die Chromogeneinwirkzeiten sind Tabelle 10 entnehmbar). Im Anschluss erfolgte die Kerngegenfärbung mit Hämalaun und die Eindeckung der Objektträger mit Aquatex (Merck # 1.08562).

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit (in Std.)	Chromogeneinwirkzeit (in Min.)
Anti-p53	1:100	1	10
Anti-hMLH1	1:50	12	10
Anti-hMSH2	1:50	12	4

Tabelle 10: Schema für die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte

2.6. Ermittlung des p53-Mutationsstatus

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass kein direkter Rückschluss von der p53-Expression auf den p53-Mutationsstatus möglich ist [94]. Die Konkordanz von p53-Überexpression und p53-Mutation liegt bei etwa 50–70% [95-98]. In unserer Studie liegt in 72 Fällen eine Überexpression von p53 vor. Daher konnte in etwa 36–50 Fällen (entspricht 50–70%) von einer p53-Mutation in dieser Gruppe ausgegangen werden.

Bekannt ist, dass die p21-Expression (und damit seine Funktion) in direktem Zusammenhang mit der möglichen p53-Mutation steht [52, 53]. Bei fehlender p21-Expression und gleichzeitiger positiver p53-Expression ist p53 wahrscheinlich mutiert (p53mut). Liegt ein positiver p21-Expressions-Status bei gleichzeitiger positiver p53-Expression vor, spricht das für das Vorliegen eines p53-Wildtyps (p53wt). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde am selben Patientenkollektiv in zurückliegenden Studien die prognostische Relevanz von p21 und p53 beim kolorektalen Karzinom sowie deren Bedeutung als Response-Parameter für die adjuvante Therapie untersucht [99]. Der Expressionsstatus von p21 und p53 wurde mittels IHC bestimmt. Bei 26,3% der Tumoren zeigte p21 eine positive, bei 73,7% eine fehlende Expression. Das Wissen um den p21- und den p53-Expressionsstatus konnten wir nutzen, um indirekt auf den Mutationsstatus von p53 zu schließen. In der p53-überexperimentierenden Gruppe (n=72) zeigten 49 (68,1%) der Gewebeproben eine fehlende p21-Expression, so dass in diesen Fällen von p53mut ausgegangen werden kann. Mit 68,1% Konkordanz zwischen positiver p53-Expression und p53mut ist unsere Arbeit mit den Ergebnissen vorheriger Studien vergleichbar (s.o).

Die Kenntnis über den p53-Mutationsstatus wurde für weitere Untersuchungen bezüglich der Zusammenhänge von p53mut/p53wt mit dem MMRG-Expressionsstatus, der Zusammenhänge

zwischen p53mut/p53wt und klinischen Parametern sowie der prognostischen Relevanz und der Bedeutung für die adjuvante Therapie genutzt.

2.7. Mikroskopische Auswertung

Mittels der Immunhistochemie ist das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53 sowie der Mismatch Repair Gene (hMLH1, hMSH2) nachweisbar. Bei positiver Expression kommt es sowohl bei p53 als auch bei den Mismatch Repair Genen zur Zellkernfärbung der Tumorzellen. Bei p53 zeigen die Zellkerne der normalen Darmmukosa immer (also sowohl bei positiver als auch bei negativer Expression des Genproduktes in den Tumorzellkernen) keine oder eine nur geringfügige Färbung. Bei den Mismatch Repair Genen hingegen zeigen diese immer eine positive Expression. Das Weglassen des Primärantikörpers diente als Negativkontrolle.

Die Auswertung der Immunfärbung der MMRG wurde qualitativ (positive/fehlende Expression), die des Tumorsuppressorgens p53 semiquantitativ vorgenommen (Tabelle 11).

Bei der Gradeinteilung der Expression von p53 und dem Festlegen des cut-offs orientierten wir uns an bereits vorliegenden Studien [66, 100-103]. Als negativ bewerteten wir eine Expression <25%.

Die Beurteilung der Färbe- und Schnittqualität erfolgte zuerst mittels lichtmikroskopischer Übersichtseinstellung des Tumors und der angrenzenden normalen Darmschleimhaut. Ausgewertet wurden nur Bereiche mit gleichmäßiger Färbung, da ungleich starke Farbreaktionen im Tumorzentrum und dessen Randbereichen die Beurteilung erschwerten.

Alle Schnitte wurden von zwei unabhängigen Pathologen lichtmikroskopisch begutachtet und ausgewertet. Die IOV (interobserver variability) lag unter 10%. Die Beurteilung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte jeweils ohne Kenntnis der Klinik des Patienten und der histo-pathologischen Tumordaten.

Gradeinteilung	Proteinexpression von p53 im Tumor		Beurteilung
I	0–5%	keine/sehr schwach	negativ
II	6–10%	schwach	
III	11–25%	mäßig	
IV	26–50%	stark	positiv
V	>50%	sehr stark	

Tabelle 11: Scoreinteilung für p53

Es folgen fotografische Exempel der Proteinexpression der verschiedenen Gene (Abbildung 4 und 5).

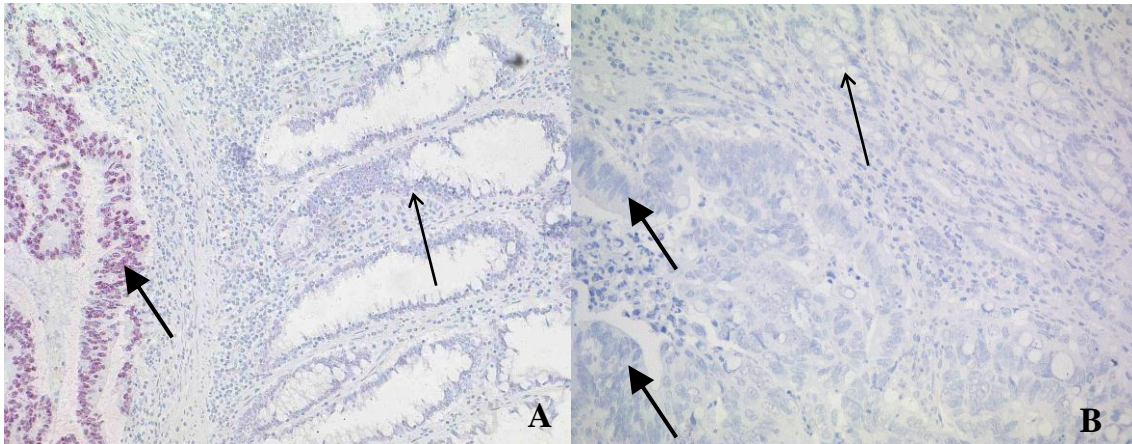


Abbildung 4: Expression von p53

- (A) **p53-positiv:** im Tumorgewebe (links) positive Kernfärbung (dicker Pfeil), rechts im Bild gesunde Kolonschleimhaut mit fehlender Expression von p53 (dünner Pfeil), (x200)
- (B) **p53-negativ:** im Tumorgewebe (links) fehlende Kernexpression (dicke Pfeile), rechts oben im Bild normale Kolonschleimhaut mit fehlender Expression (dünner Pfeil), (x200)

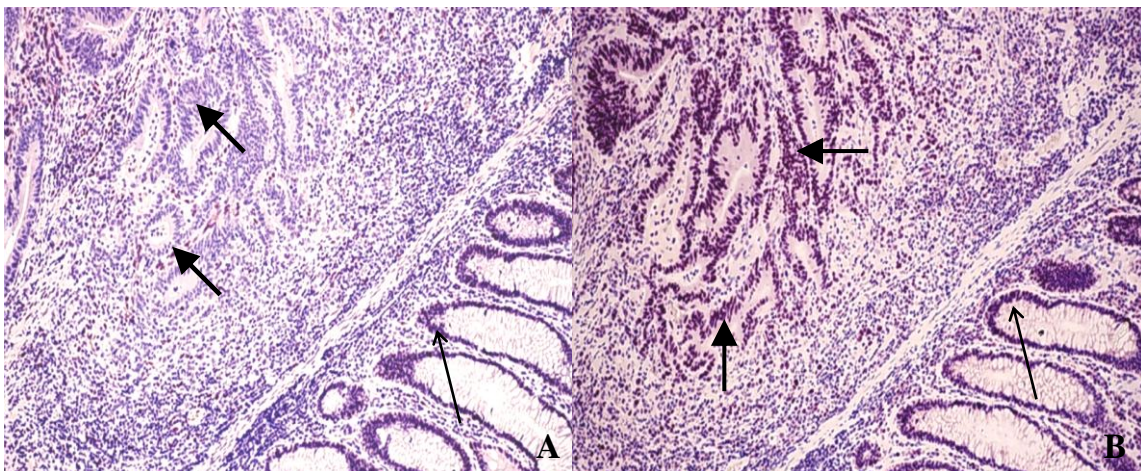


Abbildung 5: MMRG-Expression

- (A) **MLH1:** in den Tumordrüsen ist keine Expression erkennbar (dicke Pfeile), im rechten unteren Bildrand gesunde Kolonschleimhaut mit positiver Kernfärbung (dünner Pfeil), (x200)
- (B) **MSH2:** im Tumorgewebe positive nukleäre Expression (dicke Pfeile), im rechten unteren Bildrand gesunde Schleimhautkrypten mit ebenfalls positiver Kernfärbung (dünner Pfeil), (x200)

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Version 13 (Statistical Package for the Social Science). Der Chi-Quadrat-Test diente zur Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen den untersuchten Genen und den verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern. Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode wurde die Überlebensanalyse durchgeführt. Unterschiede im Überleben wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Bei allen durchgeführten Tests galt $p < 0,05$ als Signifikanzniveau.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Das Patientengut (n=125) setzte sich aus 52 Frauen (41,6%) und 73 Männern (58,4%) zusammen, von denen 42 Patienten (33,6%) (25m, 17w) an einem Kolonkarzinom und 83 Patienten (66,4%) (48m, 35w) an einem Rektumkarzinom erkrankt waren. Im Erfassungszeitraum verstarben 47 der Patienten (37,6%). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug der Altersmedian 64 Jahre (Spanne 38–89 Jahre). Die mittlere Nachbeobachtungszeit lag bei $51,8 \pm 2,5$ Monaten.

Eine adjuvante Chemotherapie mit 5-Fluoruracil und Folinsäure erhielten 36 der Kolonkarzinompatienten (85,7%), eine adjuvante Radiochemotherapie 62 der Rektumkarzinompatienten (74,7%).

Bei der UICC-Klassifikation der Tumoren ergab sich eine Verteilung von 29,6% im Stadium II und 70,4% im Stadium III. Die prozentuelle Verteilung der TNM-Klassifikation und des Gradings kann der Tabelle 12 entnommen werden, die angewandte OP-Methode der Tabelle 13. Die Differenzierung der kolorektalen Adenokarzinome war in den meisten Fällen (53,6%) gering.

Tumordaten		Anzahl der Patienten n (%)
T-Kategorien	T1	2 (1,6)
	T2	8 (6,4)
	T3	94 (75,2)
	T4	21 (16,8)
N-Kategorien	N0	37 (29,6)
	N1	48 (38,4)
	N2	40 (32,0)
Grading	G1	1 (0,8)
	G2	56 (44,8)
	G3	67 (53,6)
	nicht beurteilbar	1 (0,8)

Tabelle 12: Pathologische Charakteristika der CRC (n gesamt=125)

Angewandte OP-Methode	Anzahl der Patienten n (%)
Hemikolektomie rechts	14 (11,2)
Hemikolektomie links	24 (19,2)
Anteriore Rektumresektion nach Dixon	66 (52,8)
Resektion nach Hartmann	5 (4,0)
Rektumexstirpation nach Miles/Quenu	16 (12,8)

Tabelle 13: Angewandt OP-Methode, (n gesamt=125)

Von 125 Patienten entwickelten 18 (14,4%) ein lokoregionäres Rezidiv, in 27 Fällen (21,6%) kam es zur Entwicklung von Fernmetastasen, 5 Patienten (4%) waren sowohl von Lokal- als auch von Fernmetastasen betroffen. 75 Patienten (60%) blieben rezidivfrei.

Die Gesamtüberlebenszeit ($80 \pm 4,4$ Monate) des Kollektivs und die rezidivfreie Überlebenszeit ($77 \pm 4,6$ Monate) der kurativ operierten Patienten mit kolorektalem Karzinom sind in Abbildung 6 und 7 graphisch dargestellt.

Wie zu erwarten zeigten Patienten im UICC-Stadium III ein schlechteres Gesamtüberleben als Patienten im UICC-Stadium II ($p=0,034$). Das Gesamtüberleben im Stadium II betrug $90 \pm 6,8$ Monate, im Stadium III $74 \pm 5,1$ Monate (Abbildung 8). Auch korrelierte die pN-Kategorie mit dem Gesamtüberleben ($p=0,003$) und dem rezidivfreien Überleben ($p=0,024$).

Bezüglich des Gesamtüberlebens und rezidivfreien Überlebens konnte zwischen Kolonkarzinom- und Rektumkarzinom-Patienten kein Unterschied festgestellt werden. Zur Entwicklung eines Rezidivs kam es bei Patienten mit Kolonkarzinom nach durchschnittlich $76,4 \pm 8,1$ Monaten, bei Patienten mit Rektumkarzinom nach $73,7 \pm 5,2$ Monaten ($p=0,769$). Das Gesamtüberleben lag beim Kolonkarzinom bei $79,1 \pm 7,4$ Monaten, beim Rektumkarzinom bei $77,5 \pm 4,8$ Monaten ($p=0,754$).

Die adjuvante Therapie zeigte weder beim Gesamtüberleben noch beim rezidivfreien Überleben einen Effekt (63,7% mit adjuvanter Therapie vs. 54,2% ohne adjuvante Therapie, $p=0,37$ bzw. 35,4% mit adjuvanter Therapie vs. 34,8% ohne adjuvante Therapie, $p=0,99$) (Abbildung 9 und 10).

Abbildung 6: Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs, n=125

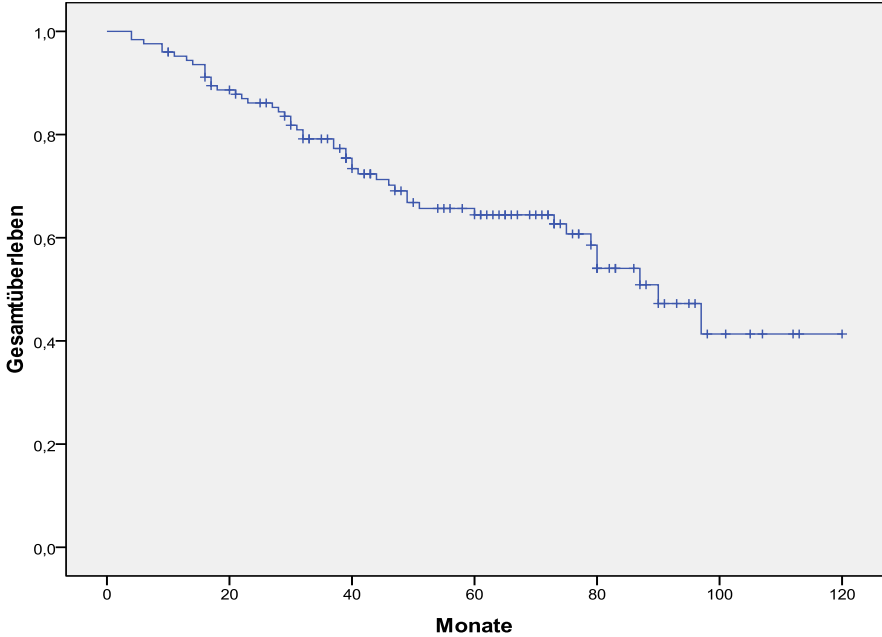


Abbildung 7: Rezidivfreies Überleben des Gesamtkollektivs, n=125

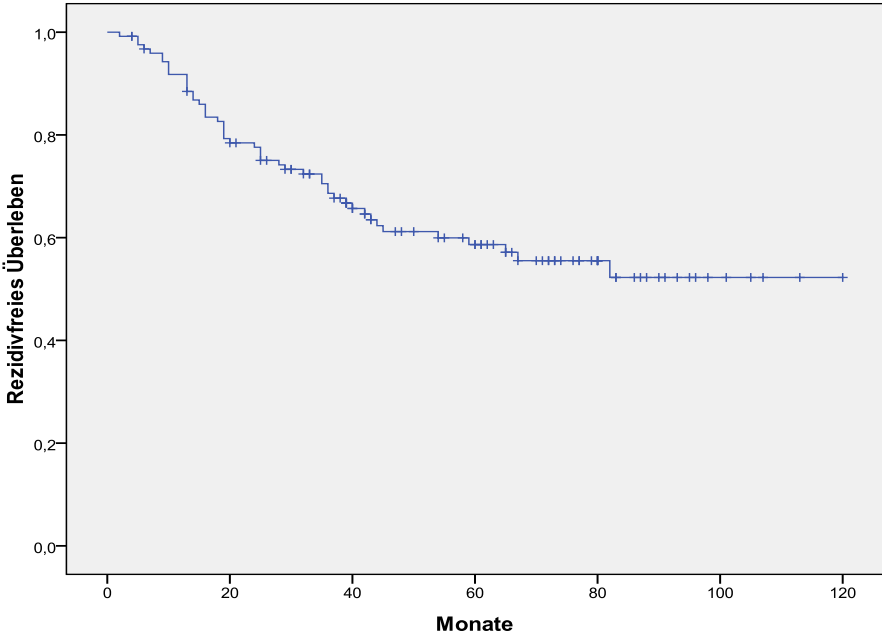


Abbildung 8: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des UICC-Stadiums, n=125, p=0,034

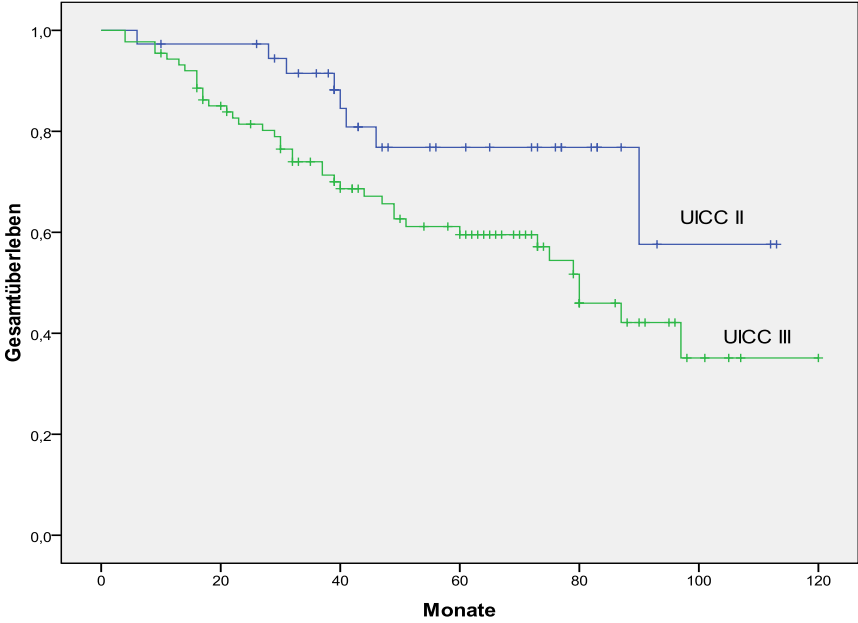


Abbildung 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Erhalt einer adjuvanten Therapie, n=125, p=0,37

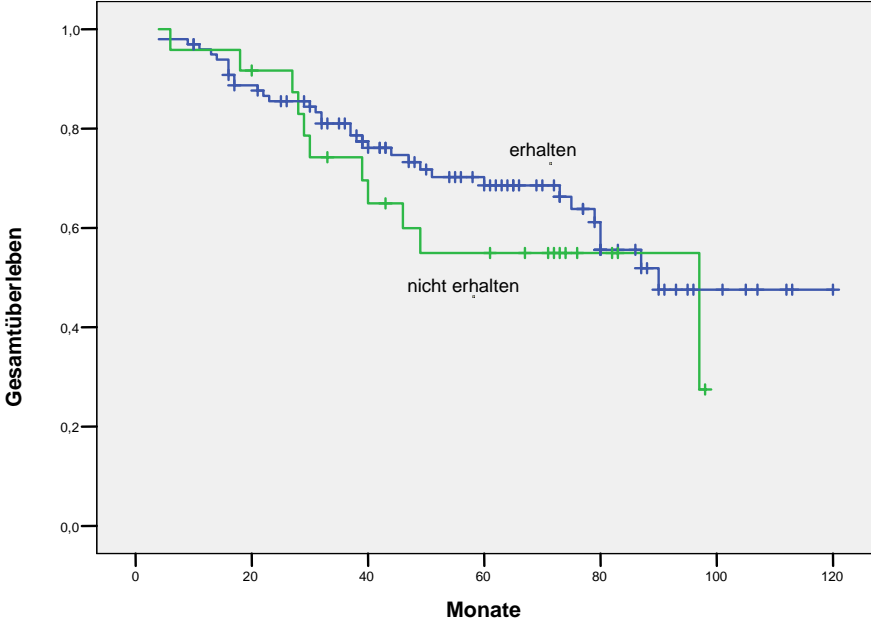
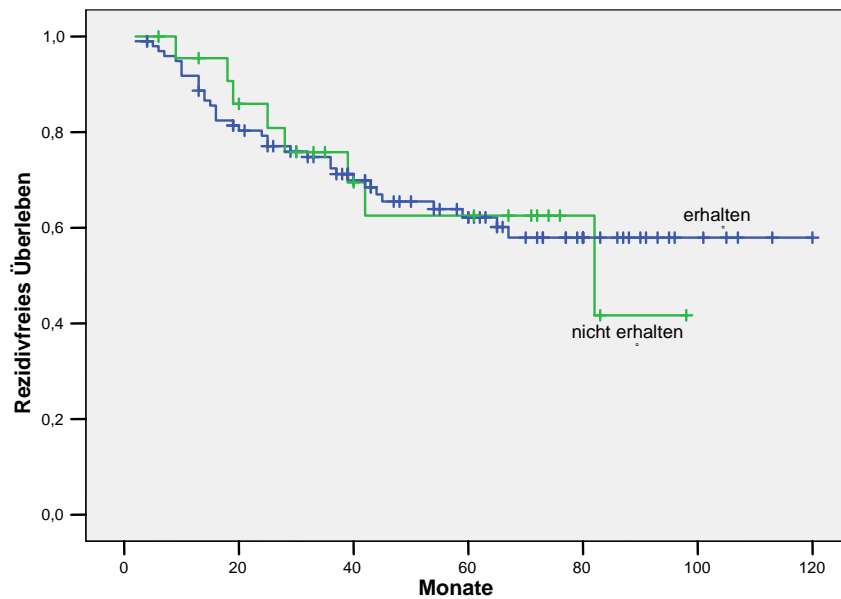


Abbildung 10: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Erhalt einer adjuvanten Therapie, n=125, p=0,99



3.2. Immunhistochemische Analyse

Der immunhistochemische Nachweis des Tumorsuppressorgens p53 erfolgte an 114, der der Mismatch Repair Gene MLH1 und MSH2 an 116 Gewebeschnitten. Die mikroskopische Auswertung der Proteinexpression wurde bei den Mismatch Repair Genen qualitativ (positive/ fehlende Expression) vorgenommen, bei p53 anhand eines festgelegten Scores (Tabelle 11).

Bei der Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 wurden 63,2% der Tumoren als positiv gewertet, 36,8% als negativ (Tabelle 14).

Gradeinteilung	Proteinexpression von p53 im Tumor n (%)	Beurteilung
I	22 (19,3)	negativ
II	8 (7,0)	
III	12 (10,5)	
IV	35 (30,7)	positiv
V	37 (32,5)	

Tabelle 14: Expression von p53 (n=114)

Die immunhistochemische Untersuchung zeigte für die MMRG in 11 Tumoren eine fehlende MLH1-Expression und in 5 Fällen eine fehlende MSH2-Expression (Tabelle 15).

	Fehlende Proteinexpression n (%)	Positive Proteinexpression n (%)
MLH1	11 (9,5%)	105 (90,5%)
MSH2	5 (4,3%)	111 (95,7%)

Tabelle 15: Expression von MLH1 und MSH2 (n=116)

3.3. Tumorsuppressorgen p53

3.3.1. Expressionsstatus des Tumorsuppressorgens p53

Die Überprüfung der statistischen Beziehung zwischen der Expression von p53 und bestimmten klinisch-pathologischen Eigenschaften führte zu keiner Korrelation (Tabelle 16).

	p53 negativ (n=42)	p53 positiv (n=72)	p-Wert
Geschlecht			
männlich	26	40	0,508
weiblich	16	32	
Alter			
<60 Jahre	14	30	0,378
>60 Jahre	28	42	
Lokalisation			
Kolon	14	23	0,879
Rektum	28	49	
T-Kategorie			
T1+T2	1	7	0,139
T3+T4	41	65	
Nodalstatus			
pN0	11	23	0,517
pN1+pN2	31	49	
Metastasen			
-	23	45	0,417
+	19	27	
Grading			
G1 und G2	22	31	0,336
G3	20	41	
UICC			
II	11	23	0,517
III	31	49	

Tabelle 16: Beziehung zwischen p53-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen (n=114)

Die Proteinexpression von p53 erwies sich bezogen auf das Gesamtüberleben des Kollektivs als signifikant ($p=0,048$), Patienten mit fehlender Proteinexpression von p53 verstarben frühzeitiger als Patienten mit positiver Proteinexpression ($60,0 \pm 5,1$ vs. $83,4 \pm 4,9$ Monaten) (Abbildung 11).

Das rezidivfreie Überleben der p53-positiven Patienten ergab $80,9 \pm 5,4$ Monate, das der p53-negativen $59,0 \pm 5,5$ Monate, wobei der Unterschied nicht signifikant war ($p=0,161$) (Abbildung 12).

Abbildung 11: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des p53-Expressionsstatus, n=114, p=0,048

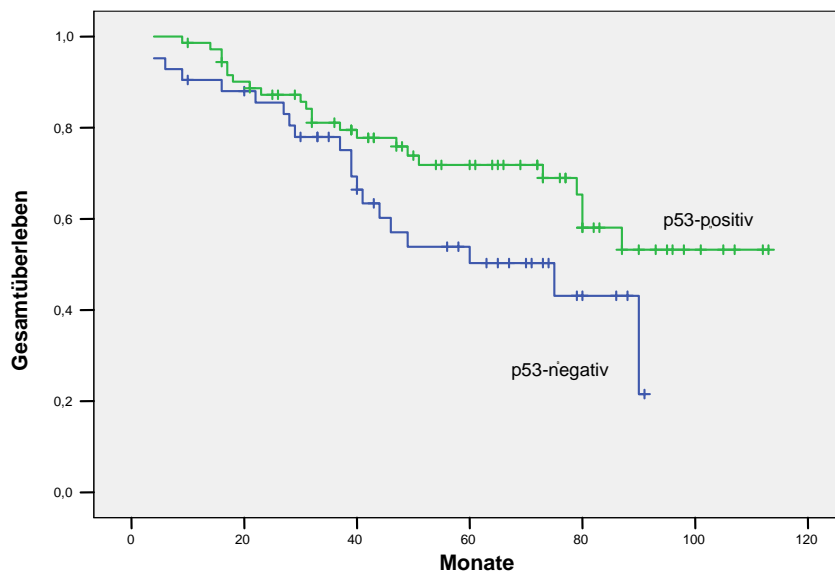
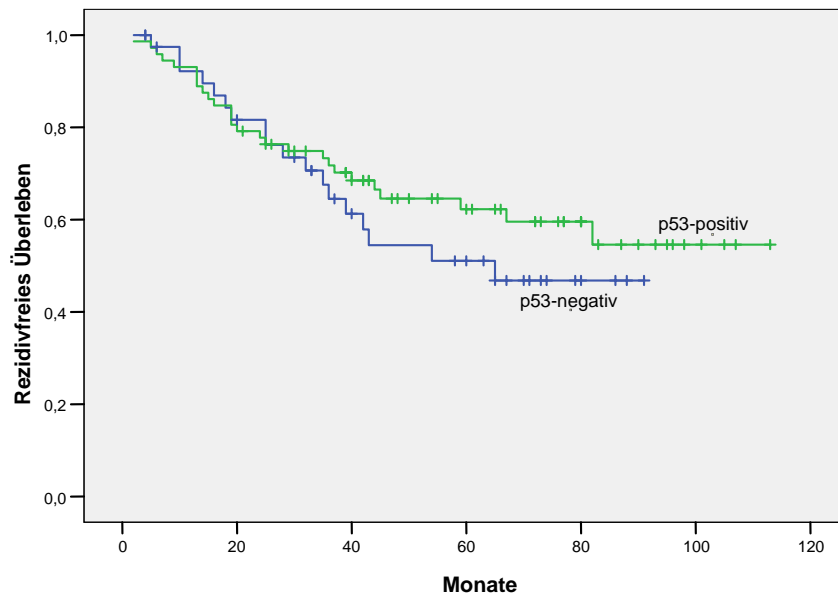


Abbildung 12: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom p53-Expressionstatus, n=114, p=0,161



Gesamt- und rezidivfreies Überleben wurden unter Stratifizierung des Gesamtkollektivs in Kolon- und Rektumkarzinom-Patienten weiter untersucht. Hierbei zeigte sich für Patienten mit Rektumkarzinom und positiver p53-Expression ein signifikant besseres Gesamtüberleben (Tabelle 17).

	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
Kolon		
p53 positiv (n=23)	67,7 (±8,3)	60,7 (±9,1)
p53 negativ (n=14)	68 (±7,6)	61,6 (±9,5)
p-Wert	0,346	0,438
Rektum		
p53 positiv (n=49)	89,3 (±5,8)	81,1 (±6,4)
p53 negativ (n=28)	54,4 (±6,1)	53,9 (±6,5)
p-Wert	0,002	0,052

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardabweichung des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der p53-Expression stratifiziert nach Tumorlokalisation (n=114)

3.3.2. Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens p53

In einer Studie, die zuvor an demselben Kollektiv durchgeführt wurde, konnte mittels IHC der p21- und p53-Expressions-Status ermittelt werden [99]. Somit erscheint es möglich, bei Tumoren mit positiver p53-Expression (n=72) anhand des p21-Expressionsstatus auf den wahrscheinlichen p53-Mutationsstatus zu schließen. Bei positivem p21-Expressionsstatus kann von einem funktionstüchtigen p53 (also p53-Wildtyp=p53wt), bei fehlendem p21-Expressionsstatus von einem zwar überexprimierten, jedoch mutierten p53 (p53mut) ausgegangen werden.

In unserem Kollektiv zeigen 31,9% (n=23) der Tumoren sowohl eine positive p53- als auch eine positive p21-Expression, somit ist in diesen Fällen von einem p53-Wildtyp (p53wt) auszugehen. 68,1% (n=49) der Tumoren zeigten eine positive p53-Expression mit gleichzeitig fehlender p21-Expression, in diesen Fällen ist daher das Vorliegen einer p53-Mutation (p53mut) anzunehmen.

Tumoren mit p53mut zeigten eine signifikant häufigere Lokalisation im Rektum (p=0,009) (Tabelle 18).

	p53wt (n=23)	p53mut (n=49)	p-Wert
Geschlecht			
männlich	13	27	0,749
weiblich	10	22	
Alter			
<60 Jahre	7	23	0,222
>60 Jahre	16	26	
Lokalisation			
Kolon	13	10	0,009
Rektum	10	39	
T-Kategorie			
T1+T2	3	4	0,551
T3+T4	20	45	
Nodalstatus			
pN0	5	18	0,344
pN1+pN2	18	31	
Metastasen			
-	10	35	0,063
+	13	14	
Grading			
G1 und G2	10	21	0,745
G3	13	28	
UICC			
II	5	18	0,344
III	18	31	

Tabelle 18: Beziehung zwischen p53-Mutationsstatus und klinisch-pathologischen Merkmalen (n=72)

Im Gesamtüberleben fand sich ein signifikanter Vorteil für Tumoren mit p53mut, das Überleben lag bei ihnen bei $94,5 \pm 5,0$ Monaten, bei Tumoren mit p53wt bei nur $58,2 \pm 8,7$ Monaten ($p < 0,0001$) (Abbildung 13). Auch beim rezidivfreien Überleben zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil für p53mut ($86,5 \pm 6$ Monaten vs. $51,5 \pm 8,5$ Monaten, $p = 0,003$) (Abbildung 14). Betrachtete man das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben unter Stratifizierung des Gesamtkollektivs in Rektum- und Kolonkarzinom-Patienten in Bezug auf den p53-Mutationsstatus, so zeigten Patienten mit Tumorlokalisierung im Kolon und p53mut ein signifikant besseres Gesamtüberleben als Patienten mit p53wt und im Kolon lokalisiertem Tumor ($p = 0,006$) (Abbildung 15). Beim rezidivfreien Überleben ergaben sich keine Korrelationen (Tabelle 19).

Abbildung 13: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des p53-Mutationsstatus, n=72, p<0,0001

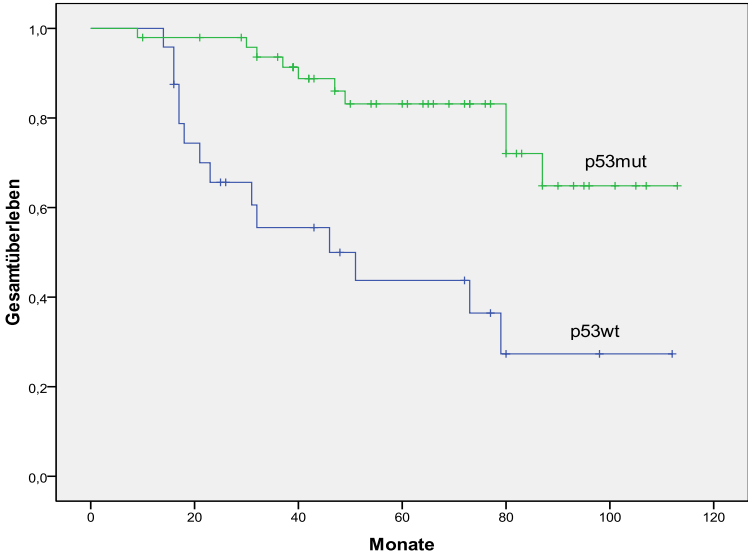


Abbildung 14: Rezidivfreies Überleben unter Berücksichtigung des p53-Mutationsstatus, n=72, p=0,003

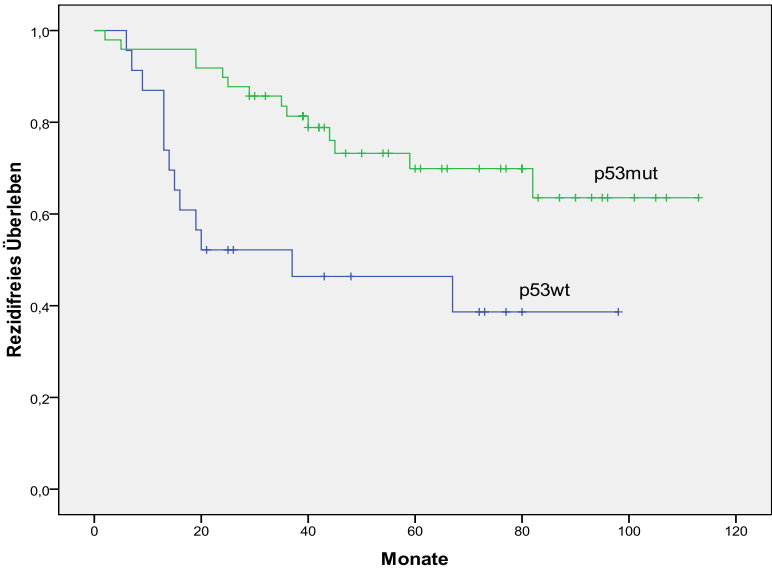
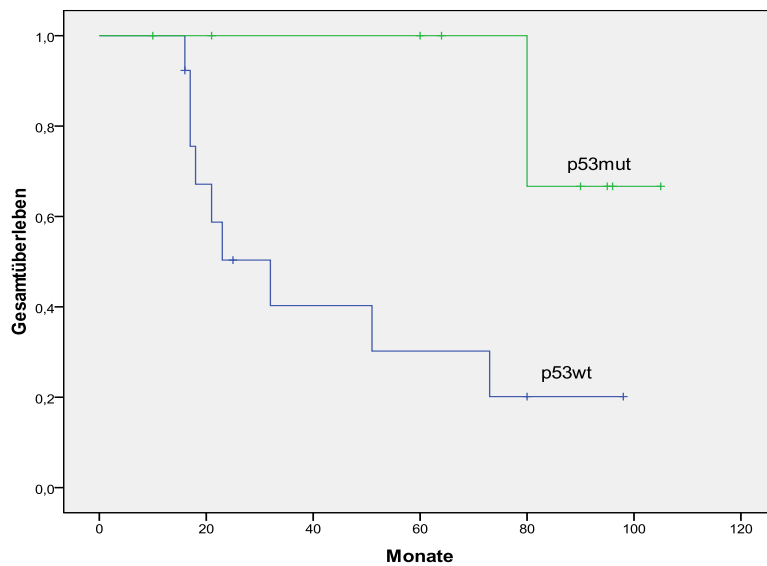


Abbildung 15: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des p53-Mutationsstatus bei Tumorlokalisierung im Kolon, n=26, p=0,006



	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
Kolon		
p53-Wildtyp (n=13)	44,7(±9,5)	45,7(±11,5)
p53-Mut.-Typ (n=10)	96,7(±4,8)	80,0(±12,4)
p-Wert	0,006	0,102
Rektum		
p53-Wildtyp (n=10)	72,0(±12,8)	51,4(±8,9)
p53-Mut.-Typ (n=39)	93,4(±6,1)	86(±6,8)
p-Wert	0,134	0,107

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus stratifiziert nach der Tumorlokalisierung (n=72)

3.4. Mismatch Repair Gene

3.4.1. Expressionsstatus von MLH1 und MSH2

Die Analyse des MLH1-Status ergab bei 90,5% der 116 Patienten eine positive Expression. Ein Vergleich der Expressionsdaten mit klinisch-pathologischen Parametern ist in Tabelle 20 wiedergegeben. Es fällt auf, dass MLH1-positive Tumoren häufiger im Rektum lokalisiert sind,

die MLH1-negativen Tumoren häufiger im Kolon (p=0,002). MLH1-negative Karzinome waren in allen Fällen schlecht differenziert (p=0,004).

	MLH1 positiv (n=105)	MLH1 negativ (n=11)	p-Wert
Geschlecht			
männlich	62	6	0,773
weiblich	43	5	
Alter			
<60	41	3	0,444
>60	64	8	
Lokalisation			
Kolon	29	8	0,002
Rektum	76	3	
T-Kategorie			
T1+T2	8	0	0,343
T3+T4	97	11	
Nodalstatus			
pN0	34	2	0,333
pN1+N2	71	9	
Metastasen			
-	66	4	0,087
+	39	7	
Grading			
G1 und G2	55	0	0,004
G3	50	11	
UICC			
II	34	2	0,333
III	71	9	

Tabelle 20: Beziehung zwischen MLH1-Status und klinisch-pathologischen Merkmalen (n=116)

Bei der Untersuchung des MSH2-Status an 116 Tumorblöcken zeigte sich bei 95,7% eine positive, bei 4,3% eine fehlende Expression. In der Analyse der klinisch-pathologischen Merkmale abhängig vom MSH2-Status ergaben sich keine Zusammenhänge (Tabelle 21).

	MSH2 positiv (n=111)	MSH2 negativ (n=5)	p-Wert
Geschlecht			
männlich	65	3	0,949
weiblich	46	2	
Alter			
<60	42	2	0,922
>60	69	3	
Lokalisation			
Kolon	35	2	0,691
Rektum	76	3	
T-Kategorie			
T1+T2	8	0	0,534
T3+T4	103	5	
Nodalstatus			
pN0	34	2	0,658
pN1+pN2	77	3	
Metastasen			
-	65	5	0,064
+	46	0	
Grading			
G1 und G2	53	2	0,929
G3	58	3	
UICC			
II	34	2	0,658
III	77	3	

Tabelle 21: Beziehung zwischen MSH2-Status und klinisch-pathologischen Merkmalen (n=116)

Im Laufe der Nachbeobachtungszeit verstarben 37 MLH1-positive und 6 MLH1-negative Patienten. Beim Gesamtüberleben fand sich ein Trend zugunsten der MLH1-positiven Patienten (MLH1-positiv $79,7 \pm 4,2$ Monate, MLH1-negativ $51,4 \pm 9,7$ Monate, $p=0,078$). Die Untersuchung des rezidivfreien Überlebens ergab einen signifikanten Unterschied (MLH1-positiv $77,2 \pm 4,5$ Monate vs. MLH1-negativ $40,6 \pm 10,8$ Monate, $p=0,02$) (Abbildungen 16 und 17). Überlebensanalysen wurden bei MSH2 nicht durchgeführt, da diese bei einer Fallzahl von nur 5 MSH2-negativen Tumoren nicht sinnvoll erschienen.

Abbildung 16: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des MLH1-Status, n=116, p=0,078

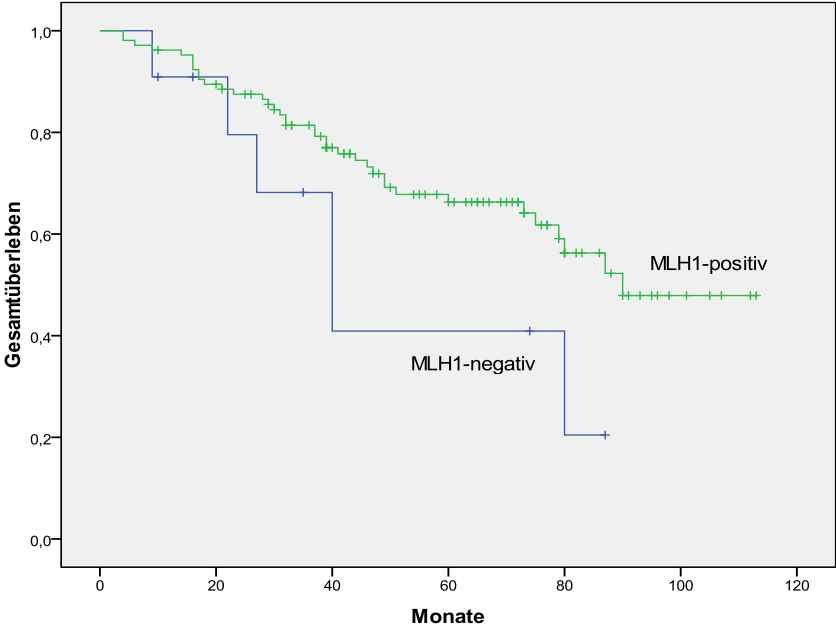
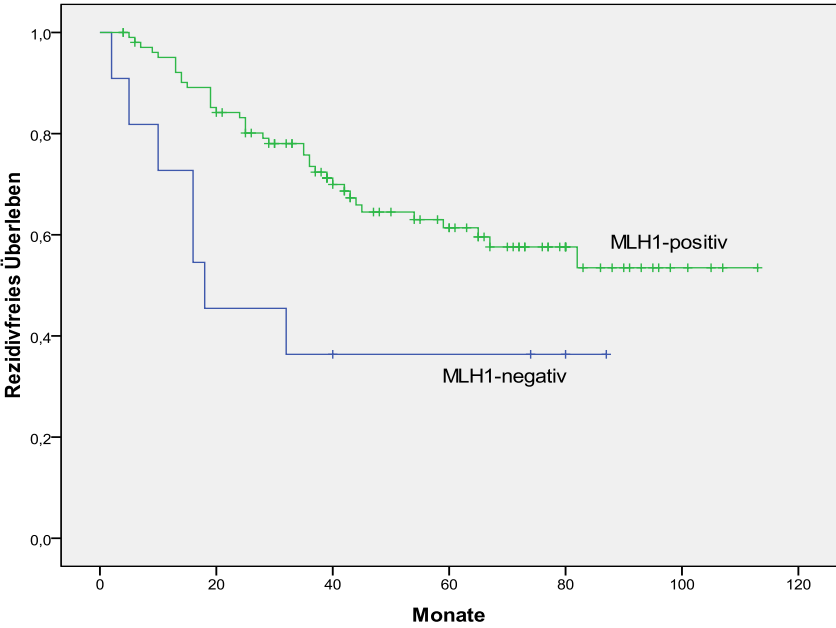


Abbildung 17: Rezidivfreies Überleben unter Berücksichtigung des MLH1-Status, n=116, p=0,02



3.4.2. Mismatch Repair Gen-Expressionsstatus

Zusammengefasst hatten 100 Patienten einen positiven und 16 Patienten (18,6%) einen negativen Mismatch Repair Gen-Status.

Tumoren mit positiver MMRG-Expression zeigten eine signifikant häufigere Lokalisation im Rektum ($p=0,005$) und ein signifikant häufiger gutes bis mäßiges Tumorigradung ($p=0,003$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt.

	MMRG-positiv (n=100)	MMRG-negativ (n=16)	p-Wert
Geschlecht			
männlich	59	9	0,836
weiblich	41	7	
Alter			
<60 Jahre	39	5	0,553
> 60 Jahre	61	11	
Lokalisation			
Kolon	27	10	0,005
Rektum	73	6	
T-Kategorie			
T1+T2	8	0	0,241
T3+T4	92	16	
Nodalstatus			
pN0	32	4	0,574
pN1+N2	68	12	
Metastasen			
-	61	9	0,718
+	39	7	
Grading			
G1 und G2	53	2	0,003
G3	47	14	
UICC			
II	32	4	0,574
III	68	12	

Tabelle 22: Beziehung zwischen MMRG-Status und klinisch-pathologischen Merkmalen (n=116)

Zwischen den beiden Gruppen gab es hinsichtlich des Überlebens keine Unterschiede. Das Gesamtüberleben lag bei MMRG-positiven Patienten bei $78,4 \pm 4,3$ Monate und bei MMRG-negativen bei $62,4 \pm 8,0$ Monaten ($p=0,648$) (Abbildung 18). Patienten mit einem positiven MMRG-Status hatten ein rezidivfreies Überleben von $75,5 \pm 4,6$ Monaten, solche mit negativem Status von $55,1 \pm 9,1$ Monaten ($p=0,484$) (Abbildung 19). Bei der Stratifizierung hinsichtlich der Tumorlokalisierung zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede (Tabelle 23).

Abbildung 18: Gesamtüberleben unter Berücksichtigung des MMRG-Status, n=116, p=0,648

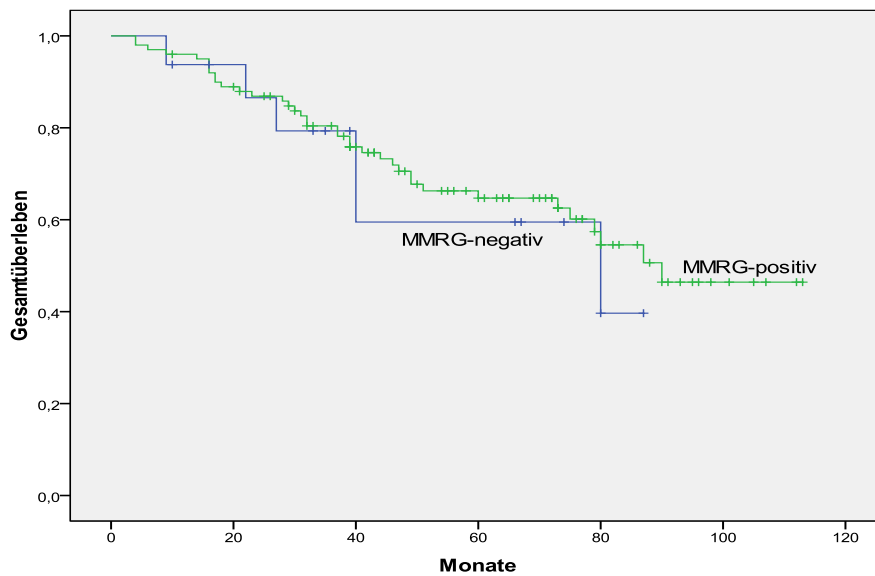
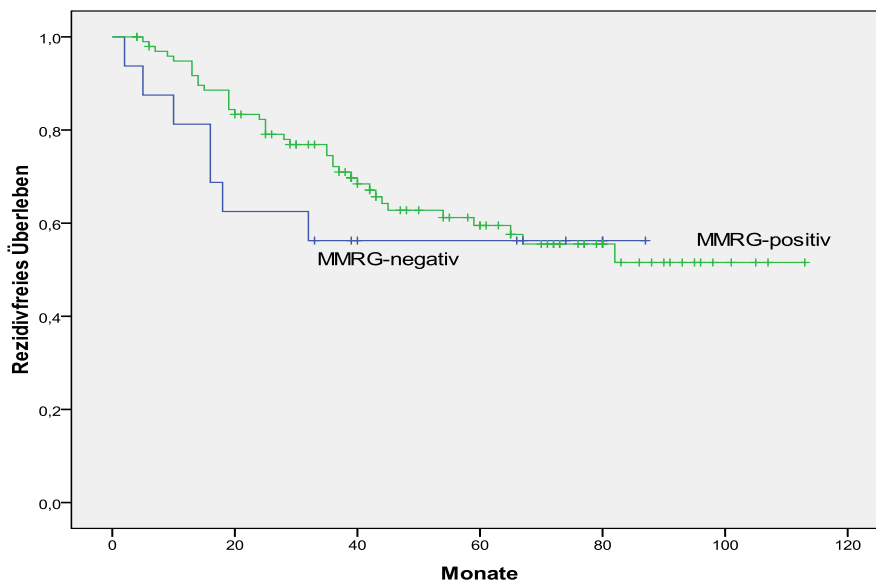


Abbildung 19: Rezidivfreies Überleben unter Berücksichtigung des MMRG-Status, n=116, p=0,484



	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
Kolon		
MMRG-positiv (n=27)	73,6±7,4	71,8±8,3
MMRG-negativ (n=10)	59,3±11,2	40,1±10,6
p-Wert	0,69	0,165
Rektum		
MMRG-positiv (n=73)	78,2±5,1	73,8±5,5
MMRG-negativ (n=6)	63,9±12,6	75,5±10,5
p-Wert	0,95	0,38

Tabelle 23: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom MMRG-Status stratifiziert nach der Tumorlokalisation (n=116)

3.5. Koinzidenz zwischen p53 und den Mismatch Repair Genen

Wie in der Einleitung aufgeführt, scheint die Prognose von der Zusammensetzung der molekularen Läsionen des jeweiligen Tumors abzuhängen. Läsionen von p53 und den MMRG MLH1 und MSH2 sind beim CRC sehr häufig beschrieben, wobei bei den bisherigen Untersuchungen nur selten der p53-Mutationsstatus mitberücksichtigt wurde. Die Untersuchung der Koinzidenz zwischen den einzelnen Genexpressionen erschien daher von großer Bedeutung zu sein. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Koinzidenz zwischen dem MMRG-Status und dem p53-Expressionsstatus ($p=0,046$), wobei sich am häufigsten die Kombination p53+/MMRG+ fand (57,9%) (Tabelle 24).

Koinzidenz	p-Wert
MLH1/p53-Expressionsstatus	0,2
MLH1/p53-Mutationsstatus	0,553
MSH2/p53-Expressionsstatus	0,107
MSH2/p53-Mutationsstatus	0,49
MMRG/p53-Expressionsstatus	0,046
MMRG/p53-Mutationsstatus	0,402

Tabelle 24: Koinzidenz zwischen den einzelnen Genexpressionen

Aufgrund der signifikanten Koinzidenz zwischen dem MMRG-Status und dem p53-Expressionsstatus wurde im Weiteren untersucht, welche Bedeutung die Kombination dieser Gene auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben hat. Dazu wurden die möglichen Kombinationen (MMRG+/p53+, MMRG+/p53-, MMRG-/p53+, MMRG-/p53-) miteinander verglichen. Die Gruppe MMRG+/p53+ zeigte im Vergleich zu den anderen Gruppen einen Trend zum längeren Gesamtüberleben ($83,7 \pm 5,1$ vs. $61,6 \pm 4,7$ Monate; $p=0,066$), für das rezidivfreie Überleben ergab sich keine Signifikanz ($76,6 \pm 5,7$ vs. $59,8 \pm 5,2$ Monate; $p=0,447$) (Abbildungen 20 und 21).

Abbildung 20: Gesamtüberleben von Patienten mit MMRG+/p53+ im Vergleich zu Patienten mit MMRG+/p53- bzw. MMRG-/p53+ bzw. MMRG-/p53-, n=114, p=0,066

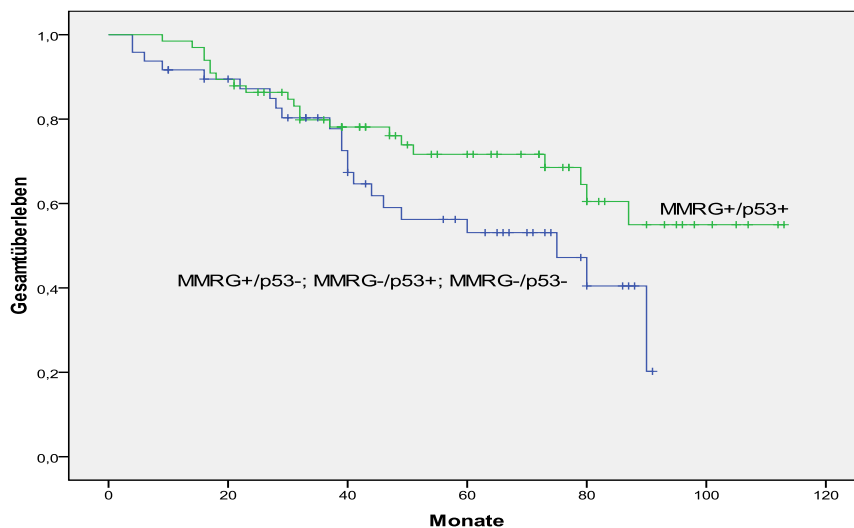
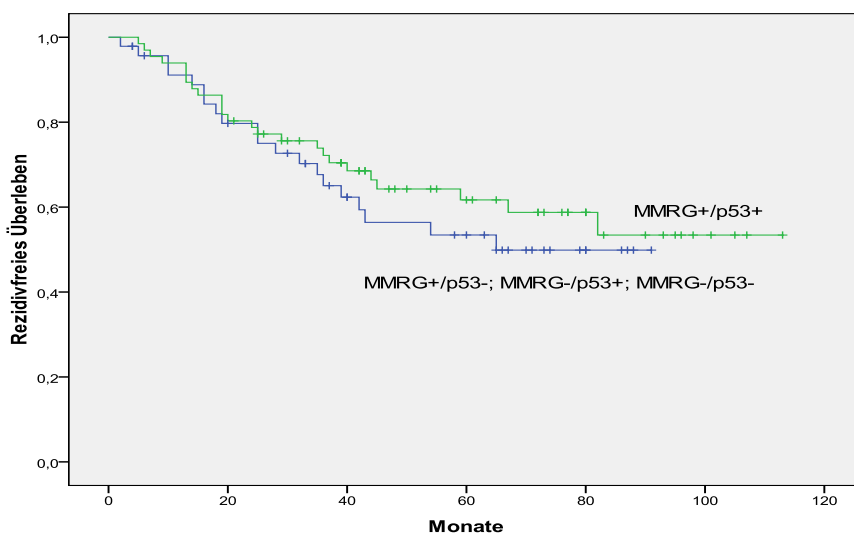


Abbildung 21: Rezidivfreies Überleben von Patienten mit MMRG+/p53+ im Vergleich zu Patienten mit MMRG+/p53- bzw. MMRG-/p53+ bzw. MMRG-/p53-, n=114, p=0,447



3.6. Adjuvante Therapie

3.6.1. p53-Expressionsstatus und adjuvante Therapie

Im Weiteren schien eine getrennte Betrachtung von Kolon- und Rektumpatienten aufgrund der zu gering werdenden Fallzahlen nicht sinnvoll zu sein. Insgesamt konnten bei 112 Patienten Daten über die adjuvante Therapie erhoben werden. Signifikante Unterschiede im Überleben unter Berücksichtigung des p53-Status in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie ergaben sich nicht (Tabelle 25).

	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
p53-positiv		
mit adjuvanter Therapie (n=61)	84,8±5,3	77,6±6,0
ohne adjuvante Therapie (n=10)	74,8±9,5	73,0±10,2
p-Wert	0,870	0,824
p53-negativ		
mit adjuvanter Therapie (n=30)	63,5±6,1	61,1±6,6
ohne adjuvante Therapie (n=11)	48,2±7,2	48,5±7,7
p-Wert	0,348	0,712

Tabelle 25: Mittelwerte mit Standardabweichungen des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens nach Stratifizierung des p53-Status in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=112)

3.6.2. p53-Mutationsstatus und adjuvante Therapie

Insgesamt konnten bei 71 Patienten (98,6%) Daten über die adjuvante Therapie erhoben werden. Es zeigte sich weder für das Gesamtüberleben noch für das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit p53wt oder p53mut eine Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (Tabelle 26).

	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
p53wt		
mit adjuvanter Therapie (n=21)	57,6±9,3	44,4±7,0
ohne adjuvante Therapie (n=2)	58,0±28,3	53,0±31,5
p-Wert	0,691	0,969
p53mut		
mit adjuvanter Therapie (n=39)	99,4±4,8	89,3±6,4
ohne adjuvante Therapie (n=9)	68,6±7,0	70,1±7,7
p-Wert	0,177	0,698

Tabelle 26: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtüberlebens sowie des rezidivfreien Überlebens nach Stratifizierung des p53-Mutationsstatus in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=71)

3.6.3. Mismatch Repair Gen-Status und adjuvante Therapie

Von den 114 untersuchten Fällen erhielten 80 (81,6%) MMRG-positive und 11 (68,8%) MMRG-negative Patienten eine adjuvante Therapie. Ein Zusammenhang zwischen MMRG-Status und dem Gesamtüberleben bzw. dem rezidivfreien Überleben in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie ließ sich nicht nachweisen (Tabelle 27).

	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
MMRG-positiv		
mit adjuvanter Therapie (n=80)	81,3±4,7	78,8±5,1
ohne adjuvante Therapie (n=18)	66,1±8,4	61,9±8,9
p-Wert	0,349	0,399
MMRG-negativ		
mit adjuvanter Therapie (n=11)	63,6±10,1	46,9±11,3
ohne adjuvante Therapie (n=5)	55,5±9,8	62,8±10,0
p-Wert	0,896	0,197

Tabelle 27: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamt- sowie des rezidivfreien Überlebens nach Stratifizierung des MMRG-Status in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=114)

3.6.4. p53, Mismatch Repair Gene und adjuvante Therapie

Entsprechend der Fragestellung wurde die Koinzidenz zwischen Expressions- bzw. Mutationsstatus von p53 und den MMRG in Hinblick auf das Ansprechen einer adjuvanten Therapie analysiert. Für die Subgruppe MMRG+/p53- zeigte sich bei Erhalt einer adjuvanten Therapie sowohl ein Trend zum längeren Gesamt- als auch zum rezidivfreien Überleben ($p=0,058$ bzw. $p=0,095$) (Tabelle 28).

	Gesamtüberleben (Monate)	Rezidivfreies Überleben (Monate)
MMRG+/p53+		
mit adjuvanter Therapie (n=55)	84,3±5,6	77,9±6,2
ohne adjuvante Therapie (n=10)	78,3±9,8	70,9±11,0
p-Wert	0,812	0,955
MMRG+/p53-		
mit adjuvanter Therapie (n=24)	67,0±6,4	67,8±6,6
ohne adjuvante Therapie (n=8)	40,3±7,7	40,7±7,7
p-Wert	0,058	0,095
MMRG-/p53+		
mit adjuvanter Therapie (n=5)	nicht möglich	nicht möglich
ohne adjuvante Therapie (n=1)		
MMRG-/p53-		
mit adjuvanter Therapie (n=5)	42,2±13,1	28,6±12,2
ohne adjuvante Therapie (n=4)	62,3±10,2	60,0±12,1
p-Wert	0,308	0,104
MMRG+/p53wt		
mit adjuvanter Therapie (n=20)	57,3±9,3	45,8±7,2
ohne adjuvante Therapie (n=2)	58,0±28,3	53,5±31,5
p-Wert	0,684	0,999
MMRG+/p53mut		
mit adjuvanter Therapie (n=35)	100,2±5,1	89,3±6,7
ohne adjuvante Therapie (n=8)	72,1±6,9	68,4±8,6
p-Wert	0,422	0,611
MMRG-/p53wt		
mit adjuvanter Therapie (n=1)	nicht möglich	nicht möglich
ohne adjuvante Therapie (n=0)		
MMRG-/p53mut		
mit adjuvanter Therapie (n=4)	nicht möglich	nicht möglich
ohne adjuvante Therapie (n=1)		

Tabelle 28: Zusammenhang zwischen p53-Expressions-, p53-Mutations-, MMRG-Status und des Gesamt- sowie des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie, (bei Analysen mit dem p53-Expressionsstatus n=112, mit dem p53-Mutationsstatus n=71)

4. Diskussion

4.1. Einführung

Mit dem Fortschritt der Forschung auf genetischer Ebene erlangt neben der klinischen Diagnostik des CRCs die Ermittlung von Gendefekten zunehmend an Bedeutung. Zum einen, um Patienten mit erhöhtem Erkrankungsrisiko frühzeitig zu detektieren, und zum anderen, um bereits Erkrankten ein individuelles Behandlungsschema zukommen zu lassen.

Die Entstehung von Tumoren ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem es durch Veränderung von zellzyklus-regulierenden Genen zu einer Dysregulation von Zellproliferation oder Apoptose kommt. Das Ansprechen auf eine (neo-)adjuvante Therapie hängt von der Zusammensetzung der molekularen Läsionen des jeweiligen Tumors ab. Die therapeutische Entscheidung ist bei heutigem Kenntnisstand nicht mehr nur abhängig von Tumorstadium, Progressionskinetik, Metastasenentwicklung und Symptomatik der Erkrankung. Vielmehr führen derzeitige Therapiestudien zu einer neuen Entscheidungsebene auf dem Boden molekulargenetischer Tumorcharakteristika, ein mögliches Ansprechen auf die Chemotherapie zeigt sich abhängig von bestimmten molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors [104]. Ziel der aktuellen Forschung ist es, über die Kombination einzelner molekularer Marker Aussagen über die Prognose zu treffen und mögliche Risikopatienten zu identifizieren sowie die Responserate auf eine (neo-)adjuvante Therapie abzuschätzen.

In dieser Arbeit wurde sowohl die prognostische Relevanz von p53 und den MMRG als auch deren Bedeutung für den Benefit einer adjuvanten Therapie untersucht. In bisherigen Arbeiten wurde der über IHC ermittelte p53-Expressionsstatus oftmals dem p53-Mutationsstatus gleichgesetzt. Davon kann jedoch nicht immer ausgegangen werden [94, 95]. Die bisherigen, sich oftmals widersprechenden Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen p53-Expressions- und p53-Mutationsstatus sowie dem MMRG-Status sind möglicherweise eine Konsequenz dessen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur bisher kontrovers diskutierte Rolle von p53 und den MMRG und deren Einfluss auf die adjuvante Therapie beim CRC zu evaluieren. Dabei stand im Interessenmittelpunkt die getrennte Betrachtung vom p53-Expressionsstatus und vom p53-Mutationsstatus.

4.2. Material und Methoden

Neben der DNA-Analyse mittels PCR stellt die Immunhistochemie die zweite Standardtechnik zur Detektion von Mutationen im p53-Gen und in den Mismatch Repair Genen dar. In vorliegender Arbeit wurden die Tumoren mittels IHC hinsichtlich der Genexpression von p53, MLH1 und MSH2 untersucht.

Eine Überexpression bei der immunhistochemischen Untersuchung kann nicht zwangsläufig als Mutation gewertet werden. Das Mutationsspektrum umfasst sowohl Deletionen, Einzelbasenverluste, Nonsense- und Missense-Mutationen, wobei nicht alle zu einer fehlenden Proteinexpression führen. So zeigten sich beispielsweise bei Missense-Mutationen funktionslose aber normal exprimierte Proteine [18, 105]. Ebenso muss die fehlende Expression nicht durch eine Mutation verursacht sein, sondern kann beispielsweise auch durch Promotormethylation erklärt werden [106]. Der mittels Immunhistochemie ermittelte Expressionsstatus ist folglich nicht mit dem Mutationsstatus gleichzusetzen.

Die Proteinexpression in der normalen Darmmukosa diente in unserer Untersuchung als positive Kontrolle. Tumorzellen, in denen keine Kernfärbung erkennbar war, wurden bei Anwesenheit von kerngefärbten nicht-neoplastischen Zellen als negativ gewertet. Bei Vorliegen einer Heterogenität der Kernfärbung in den Tumorabschnitten wurden repräsentative Ausschnitte aus der Tumormitte zur Auswertung verwendet. Als Ursache für die Heterogenität können die Vorbehandlungen des Gewebematerials, das Fixierungsmittel (Formalin), die Entwässerung, die Paraffineinbettung und die Entparaffinierung genannt werden. All diese Punkte können zur Beeinträchtigung der Antigenität führen, da es bei diesen Prozeduren zur Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Proteinen kommt, wodurch sich die dreidimensionale Struktur der Proteine verändert. Mittels der hitzeinduzierten Antigendemaskierung durch den Citratpuffer kann nur ein Teil dieser Veränderungen wieder rückgängig gemacht werden. Auch durch minimale zeitliche Verzögerungen und unterschiedliche Chromogen-Einwirkzeiten kann es zu unterschiedlich starken Färbeergebnissen kommen.

Die Gradeinteilung der Expression des Tumorsuppressorgens p53 erfolgte in zugrunde liegender Arbeit semiquantitativ mit eigener Gradeinteilung und Negativ-Grenze (Tabelle 11) in Anlehnung an andere Studien [66, 100-103].

Der Zusammenhang von p53-Überexpression und -Mutation wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Gerade bei p53 konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein positiver

Expressionsstatus zwar häufig, aber nicht immer mit einer p53-Mutation gleichzusetzen ist. Eine positive Immunhistochemie kann sich auch in Abwesenheit von Mutationen zeigen. Laut Metaanalysen wird die Konkordanz zwischen der erhöhten p53-Expression und p53mut bei etwa 70% gesehen [97, 107]. In der Arbeit von Bazan et al. wurde die Expression von p53 mittels IHC und der Mutations-Status mittels PCR ermittelt. In 57% der Fälle konnte eine Übereinstimmung gezeigt werden [94]. Auch in einer anderen Arbeit zeigte sich eine vergleichbare Übereinstimmung [95].

Die Mutation von p53 kann aber nicht immer mit einem kompletten Funktionsverlust gleichgesetzt werden. Iacopetta et al. untersuchten in einer großen Multicenter-Studie die transkriptionelle Aktivität von 3583 CRCs, bei denen eine p53-Mutation bestand. Hierbei zeigte sich, dass trotz Mutation in 71% der Fälle die transkriptionelle Aktivität beibehalten wurde, in nur 29% konnte eine vollständige Inaktivität nachgewiesen werden.

Daher sind auch bei dem vorliegenden Patientenkollektiv und der Ergebnisinterpretation die verschiedenen Ursachen der unterschiedlichen Proteinexpression zu berücksichtigen.

Die Einteilung der immunhistochemischen Ergebnisse für die Mismatch Repair Gene erfolgte in vorliegender Arbeit in positive und fehlende Expression. Bei fehlender nukleärer Färbung der Tumorzellen wurde die Expression als negativ gewertet, während eine positive Wertung bei erkennbarer Kernfärbung der neoplastischen Zellen, ungeachtet ihrer Färbeintensität, vorgenommen wurde.

Für den Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität wird die PCR-Technik genutzt. Eine alleinige MSI-Analyse ist allerdings nicht ausreichend, da keine Aussage darüber getroffen werden kann, welches Gen mutiert ist. Deshalb ist die immunhistochemische Expressionsanalyse nützlich. Bleibt die Proteinexpression des zu untersuchenden Tumors aus, liefert dies einen präzisen Hinweis auf das betroffene Genprodukt. Eine MSI-H geht in über 80% [108] teilweise sogar mit >99% [109] mit einer fehlenden Proteinexpression von MLH1 und MSH2 einher. In einer anderen Studie zeigte sich, dass die Immunhistochemie von MHL1 und MSH2 mit einer Sensitivität von 97% und mit einer Spezifität von 100% eine MSI identifizieren kann [110].

Bei positiver Proteinexpression kann jedoch nicht zwangsläufig auf ein voll funktionstüchtiges Protein geschlossen werden. Missense-Mutationen führen beispielsweise zu funktionslosen Proteinen, die normale Proteinexpression bleibt jedoch erhalten. Ebenso muss die fehlende Expression nicht durch eine Mutation verursacht sein, sondern kann beispielsweise auch durch

Promotormethylation erklärt werden [106]. Daher muss auch in vorliegendem Kollektiv mit nicht detektierten Gendefekten gerechnet werden.

Zusammenfassend ist die Aussagekraft der Immunhistochemie von mehreren Faktoren wie Art und Dauer der Gewebefixation, Dicke der Tumorschnitte, verwendete Antikörper, posttranslationale Modifikation der Proteine sowie subjektive Beurteilung des Untersuchers abhängig. Dennoch gilt die immunhistochemische Expressionsanalyse als eine wichtige und zuverlässige Methode in der pathologischen Diagnostik, um neben der histologischen Auswertung ausführlichere Informationen über die Tumore zu liefern.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Zusammensetzung des Patientengutes

In die Studie wurden 116 Patienten eingeschlossen. In den bisherigen Untersuchungen variiert die Größe des Patientenkollektives stark zwischen 34 und 891 Patienten [97, 111], wobei in einem Großteil der Studien die Patientenzahlen vergleichbar mit unserer sind [70, 103, 112-114].

Aus verschiedenen Gründen, beispielsweise persönliche Entscheidung, hohes Alter, Komorbidität, erhielten 21% unserer Patienten keine adjuvante Therapie. In vergleichbaren Studien lag die Anzahl bedeutend höher, bei einigen bis 70% [97, 115].

In unsere Arbeit wurden nur Patienten der UICC-Klassifikation Stadium II (29,6%) und III (70,4%) eingeschlossen, die entsprechend den damaligen Leitlinien zur Durchführung einer adjuvanten Therapie behandelt wurden [93]. Auch hier zeigen sich in anderen Studien große Unterschiede, teils wurden Patienten von Stadium I-IV bzw. Dukes A-D untersucht [86, 103, 116, 117], teils wurden nur Patienten des Stadiums II oder III bzw. Duke C in die Studie aufgenommen [97, 113, 118].

4.3.2. p53-Status

4.3.2.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika

Zur Bedeutung von p53 für das kolorektale Karzinom gibt es zahlreiche Studien, die jedoch oftmals diskordante Ergebnisse liefern. Größtenteils wurde die Expression von p53 mithilfe der IHC untersucht.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung wurde in der hier präsentierten Studie in 72 von 114 (63,2%) Tumorproben eine positive Expression von p53 nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man auch in anderen Studien [119] (61%), [120] (57%), andere Arbeitsgruppen wichen in ihren Angaben zur p53-Expression jedoch teilweise erheblich ab (Tabelle 29). Diese Diskrepanzen lassen sich durch unterschiedliche Definition der cut-off-Punkte und der Negativ-Grenze, unterschiedliche Anzahl der untersuchten Tumorblöcke, unterschiedliche Tumorstadien und beispielsweise unterschiedliche Labortechniken (wie verschiedene AK, Einwirkzeiten etc.) erklären.

In 50% aller Tumoren kann das p53-Gen entweder als mutiert oder überhaupt nicht nachgewiesen werden. Die mutierte Form kann eine onkogene Wirkung aufweisen, welche auch als „gain of function“ bezeichnet wird. In den restlichen 50% der Fälle kann vom Erhalt des p53-Wildtyps ausgegangen werden, aber auch hier werden fast immer Mutationen der Signalwege gefunden, die so zum indirekten Ausfall des Proteins führen können [50, 121]. Die Annahme, dass ein Tumor mit völlig intaktem Pfad von p53 existiert, scheint demnach eher unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Tumorlokalisation im Rektum bei Tumoren mit p53-Mutation.

Im Jahr 2000 wurde in einer großen Studie der p53-Mutationsstatus in 995 Fällen des CRCs untersucht. Dabei war p53mut signifikant häufiger in linksseitigen Kolontumoren als in rechtsseitigen Kolontumoren nachzuweisen. Korrelationen zwischen Tumorstadium, Grading, Alter des Patienten oder Geschlecht konnten genauso wenig wie ein prognostischer Zusammenhang festgestellt werden. Insgesamt wurde in 39% der Fälle eine p53-Mutation nachgewiesen [122]. Auch in anderen Arbeiten zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von p53-Mutationen in Tumoren des distalen Kolons und Rektums [115, 123-126].

Lebe et al., die den Status von p53, p21 und p27 untersuchten, konnten weder eine Korrelation der Gene untereinander noch einen statistisch signifikanten Zusammenhang der einzelnen Gene bezogen auf klinisch-pathologische Merkmale oder die Prognose für den Patienten nachweisen [127]. Auch in anderen Arbeiten konnte kein Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Daten und der p53-Expression [101, 103, 114, 120, 128, 129] bzw. des p53-Mutationsstatus nachgewiesen werden [130].

Im Gegensatz dazu korrelierte bei McKay et al. eine positive p53-Expression mit jüngerem Patientenalter ($p < 0,001$) und distaler Tumoralage ($p = 0,01$) [131]. Auch in anderen Studien korrelierte eine positive p53-Expression mit distaler Tumorlokalisation [132-135]. Bei Rau et al.

zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen verringerter p53-Expression und der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,05$) [71].

4.3.2.2. Einfluss der p53-Expression auf die Prognose

Statistisch signifikant war in unserer Untersuchung der Zusammenhang der erhöhten p53-Expression mit einer längeren Gesamtüberlebenszeit ($p = 0,048$), welcher auch von Lan et al. gezeigt wurde [135]. Im Allgemeinen ist die Studienlage bezüglich der prognostischen Relevanz des p53-Expressionsstatus jedoch sehr heterogen. Bei Moore et al. korrelierte eine positive p53-Expression signifikant mit einem längeren rezidivfreien Überleben ($p = 0,05$) [119]. Garrity et al. konnten in ihrer Arbeit aufzeigen, dass eine normale p53-Expression signifikant mit dem längeren Gesamtüberleben ($p < 0,001$) und dem längeren rezidivfreien Überleben ($p < 0,003$) korreliert [66]. In einer anderen Studie korrelierte in der univariaten Analyse die erhöhte p53-Expression mit einem Überlebensnachteil ($p = 0,02$), mit Metastasen ($p = 0,027$) und Rezidiventwicklung ($p = 0,001$). Auch in der multivariaten Analyse fand sich eine Korrelation zwischen erhöhter p53-Expression und kürzerem Überleben ($p = 0,02$), zudem wurde die erhöhte p53-Expression als unabhängiger Vorhersagewert für eine höhere Rückfallwahrscheinlichkeit identifiziert ($p = 0,04$) [113]. In anderen Studien korrelierte die positive p53-Expression ebenso mit einer schlechteren Prognose [103, 132]. Weitere Forschungsgruppen zeigten andererseits eine signifikante Korrelation zwischen fehlender p53-Expression und der besseren Prognose für den Patienten [70, 136]. Häufig fand sich auch keine prognostische Relevanz für die p53-Expression [71, 100, 101, 120, 127, 128, 137, 138]. Die relevanten Studien der letzten 10 Jahre sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	Method e	p53- Expression (%)	Prognostischer Marker (Statistik)
Galizia et al. 2004 [103]	104	Dukes A–D	36	IHC	52	ja ² (M)
Gafa et al. 2000 [86]	216	UICC I–IV	75	IHC	48	ja ² (U)
Elsaleh et al. 2001 [97]	891	UICC III	78	IHC	40	ja ¹ (U)
Schwandner et al. 2002 [70]	160	UICC I–III	38	IHC	39	ja ² (U)
Resnick et al. 2004 [113]	134	UICC II	96	IHC	54	ja ² (U)
Smyth et al. 2004 [139]	111	UICC I–II	42	IHC	39	ja ² (U)
Zhao et al. 2005 [140]	93	Dukes A–C	60	IHC	43	ja ² (U)
Lyall et al. 2006 [118]	90	Dukes C	>60	IHC	19	ja ¹ (U)
Moore et al. 2004 [119]	51	UICC III–II	69	IHC	61	ja ¹ (U)
Garrity et al. 2004 [66]	366	Dukes B–C	>96	IHC	76	ja ¹ (U)
Nasif et al. 2006 [136]	50	Dukes A–C	40	IHC	54	ja ² (M)
Klump et al. 2004 [141]	371	UICC I–III	43	IHC	36–42	nein (M)
Watanabe et al. 2001 [142]	516	Dukes B–C	>56	IHC	46	nein (U)
Fernebro et al. 2004 [116]	269	Dukes A–D	35–42	IHC	81	nein (U)
Hilska et al. 2005 [117]	363	Dukes A–D	>60	IHC	74	nein (U)
Saw et al. 2003 [138]	60	Dukes B–C	47	IHC	55	nein (U)
Allal et al. 2004 [120]	98	UICC I–III	124	IHC	57	nein (U)
Rau et al. 2003 [71]	66	UICC I–III	39	IHC	78	nein (U)
Morgan et al. 2003 [128]	171	Dukes A–C	>52	IHC	59	nein (U)
Bhatavdekar et al. 2001 [100]	98	Dukes B–C	60	IHC	25	nein (U)
Qiu et al. 2003 [137]	72	UICC II–III	50	IHC	69	nein (U)
Broll et al. 2005 [101]	120	UICC I–IV	60	IHC	51	nein (M)
Eigene Studie	114	UICC II–III	58	IHC	63	ja¹ (U)

Tabelle 29: Prognostische Relevanz der p53-Expression

IHC: Immunhistochemie, M: multivariate Analyse, U: univariate Analyse, ¹: Vorteil für p53+, ²: Vorteil für p53-

4.3.2.3. Einfluss der p53-Mutation auf die Prognose

Sowohl das Gesamt- als auch das rezidivfreie Überleben waren in der vorliegenden Studie für Tumoren mit p53mut im Vergleich zu Tumoren mit p53wt signifikant verbessert. Der von uns aufgezeigte Überlebensbenefit bei Patienten mit p53-Mutation wurde bislang nicht beschrieben, wobei jedoch die Heterogenität der Kollektive zu berücksichtigen ist. Die Arbeiten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Bei Goh et al. korrelierte p53mut signifikant mit einer schlechteren Prognose [123]. Eine weiterführende Mutationsanalyse zeigte zudem, dass die verschiedenen Mutationen von p53

unterschiedlichen Einfluss auf die prognostische Bedeutung nehmen [143]. Auch in der Arbeit von Bazan et al. zeigte p53mut ein signifikant schlechteres Gesamt- als auch rezidivfreies Überleben gegenüber p53wt [144]. Ein signifikant besseres Überleben für p53wt beim kolorektalen Karzinom zeigte sich in anderen Studien [115, 125, 145-148]. Es gibt aber auch Arbeiten, die keine prognostische Relevanz für den p53-Mutationsstatus beim CRC nachweisen konnten [71, 122, 138, 149]. Eine Übersicht der relevanten Studien der letzten Jahre ist in Tabelle 30 zusammengefasst.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	Methode	p53- Mutation (%)	Prognostischer Marker (Statistik)
Bazan et al. 2005 [144]	160	Dukes A–D	71	PCR, Sequenzierung	43	ja ¹ (M)
Russo et al. 2005 [115]	3583	Dukes A–D	58–61	PCR	42	ja ¹ (M)
Kandioler et al. 2002 [148]	64	UICC I–III	37	Sequenzierung	45	ja ¹ (U)
Rebischung et al. 2002 [147]	86	UICC I–III	48	PCR, DGGE, Sequenzierung	51	ja ¹ (U)
Chang et al. 2006 [146]	213	UICC I–IV	48	PCR	45	ja ¹ (U)
Elsaleh et al. 2001 [97]	891	UICC III	78	SSCP	38	ja ¹ (U)
Goh et al. 1995 [143]	192	Dukes A–D	24	PCR	57	ja ¹ (U)
Soong et al. 2000 [122]	995	Dukes B–C	102	PCR	39	nein (U)
Saw et al. 2003 [138]	60	Dukes B–C	47	PCR	42	nein (U)
Rau et al. 2003 [71]	51	UICC I–III	39	PCR	16	nein (U)
Schelwies et al. 2002 [149]	116	UICC III–IV	17	PCR	40	nein (U)
Eigene Studie	73	UICC II–III	58	IHC	67	ja² (U)

Tabelle 30: Prognostische Relevanz der p53-Mutation

IHC: Immunhistochemie, SSCP: single strand confirmation polymorphism, PCR: Polymerase chain reaction, DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis, M: multivariate Analyse, U: univariate Analyse, ¹: Vorteil für p53wt, ²: Vorteil für p53mut

4.3.3. Mismatch Repair Gen-Expressionsstatus

4.3.3.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika

Im eigenen Untersuchungsgut konnte bei 116 Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom in 13,8% eine fehlende Expression sowohl von MLH1 als auch von MSH2 nachgewiesen werden. Ebenso in anderen Studien lagen die Werte beim sporadischen CRC zwischen 12–16% [108, 150]. Andere Studien untersuchten zumeist den Zusammenhang von MSI-Status und MMRG-Expression. Hierbei wurde gezeigt, dass MSI-H-Tumoren mit sehr hoher Korrelation (80–95%) mit einem Verlust der Expression von MLH1 und/oder MSH2 einhergehen [109, 151, 152]. Diese Studien ergaben Inzidenzen von MSI-H-Tumoren von 18,4%, 12,5% und 11%. Bei fehlender Expression von MLH1 und/oder MSH2 kann nach heutiger Studienlage also von einem mikrosatelliteninstabilen Tumor ausgegangen werden, die IHC ist zur Detektion der MSI ausreichend [153-157].

MMRG-positive Tumoren waren in unserer Untersuchung signifikant häufiger im Rektum lokalisiert, die MMRG-negativen im Kolon. Tumoren mit positiver MMRG-Expression zeigten signifikant häufiger ein gutes bis mäßiges Tumorigradung als die MMRG-negativen Tumoren. Auch in anderen Studien fanden sich Tumoren mit fehlender MMRG-Expression signifikant häufiger proximal lokalisiert [158, 159]. Verschiedene Studien belegen, vergleichbar mit unseren Ergebnissen, einen signifikanten Zusammenhang zwischen mikrosatelliteninstabilen CRC und schlechter Differenzierung [87, 160].

Auch die getrennte Betrachtung von MLH1- und MSH2-Expression führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Tumoren mit positiver Expression von MLH1 waren signifikant häufiger im Rektum als im Kolon lokalisiert und signifikant häufiger gut bis mäßig als schlecht differenziert. Tumoren mit fehlender MLH1-Expression fanden sich signifikant häufiger im Kolon als im Rektum. Unsere Ergebnisse werden von bisher vorliegenden Studien untermauert. MSI-positive Tumoren sind beim CRC häufiger proximal lokalisiert [21, 87, 161, 162]. Auch bei Gafa et al. zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen MSI-H und proximaler Tumorlokalisierung sowie schlechter Tumordifferenzierung [86]. Bei Kruschewski et al. befanden sich die Tumoren mit fehlender MLH1-Expression ebenso signifikant häufiger im proximalen Kolon [150]. Bei Wright und Stewart fanden sich MSH1-negative Tumoren signifikant häufiger proximal lokalisiert und waren gering differenziert [163].

Hinsichtlich des MSH2-Expressionsstatus ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zu klinisch-pathologischen Merkmalen.

4.3.3.2. Einfluss der Mismatch Repair Gene auf die Prognose

Die prognostische Relevanz der MSI bzw. des MMRG-Expressionsstatus ist ein häufig untersuchtes Merkmal. Allerdings ist die Datenlage hierzu widersprüchlich.

In der zugrunde liegenden Studie war das rezidivfreie Überleben der MLH1-exprimierenden Patienten besser als das der MLH1-negativen Patienten (77 vs. 41 Monate, $p=0,02$). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigte sich ein Trend zugunsten der Tumoren mit positiver MLH1-Expression (78 vs. 51 Monate, $p=0,078$). Auch in der Arbeit von Bendardaf et al. zeigte sich ein Nachteil für Patienten mit schwacher bzw. fehlender Expression von MLH1 und MSH2. Die Patienten wiesen eine höhere Metastasenrate bei Erstdiagnose und ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben auf [164].

Einige Studien zeigten, dass MSI-positive Tumoren bzw. solche mit einer fehlenden Reparaturgenexpression mit einem besseren Gesamtüberleben [67, 86, 87, 108, 165] und teilweise auch mit einer besseren rezidivfreien Überlebensrate einhergehen [142, 166]. Auch bei Ribic et al. zeigte sich ein signifikant längeres rezidivfreies Überleben bei MSI [89]. In anderen Untersuchungen konnte keine prognostische Bedeutung für die Mismatch Repair Gene nachgewiesen werden [109, 146, 150, 167].

Der Stellenwert der Mismatch Repair Gene als Prognoseparameter des sporadischen CRCs bleibt für die Klinik bei der oben angeführten teils widersprüchlichen derzeitigen Studienlage nach wie vor offen. In vorliegender Studie wurden nur Tumoren des sporadischen kolorektalen Karzinoms in die Untersuchung eingeschlossen, andere Patientenkollektive beinhalteten auch HNPCC-Fälle und syn- und metachrone CRC [110] [154, 166]. Teils wurden nur bestimmte Subgruppen (beispielsweise ausschließlich rechtsseitig lokalisierte CRC oder Patientenalter <50 Jahre) in die Studie eingeschlossen [87]. Auch Unterschiede in der Patientenzahl, dem Einschluss der Stadien und der Länge der Nachbeobachtungszeit etc. führen zu selektionsbedingten Ergebnissen, was bei der Interpretation der Studienlage bedacht werden sollte.

Die Ergebnisse der relevanten Studien der letzten Jahre sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	Methode	MSI/ neg. MMRG (%)	Prognostischer Marker (Statistik)
Elsaleh et al. 2000 [67]	656	Dukes C	54	PCR	9	ja ¹ (M)
Gryfe et al. 2000 [87]	607	UICC I–IV	86	PCR	17	ja ¹ (M)
Colombino et al. 2002 [166]	91	Dukes A–D	45	PCR	19	ja ¹ (U)
Ribic et al. 2003 [89]	570	UICC I–IV	89	PCR	17	ja ¹ (U)
Lanza et a. 2006 [108]	718 363	UICC II–III	93	IHC PCR	16 21	ja ¹ (U)
Gafa et al. 2000 [86]	216	UICC I–IV	75	PCR, IHC	20	ja ¹ (M)
Watanabe et al. 2001 [142]	516	Dukes B–C	>56	MSA	20	ja ¹ (M)
Bendardaf et al. 2007 [164]	86	Duke B–D	33	IHC	70	ja ² (U)
Kruschewski et al. 2002 [150]	127	UICC I–III	62	IHC	12	nein (U)
Jover et al. 2006 [167]	754	UICC I–IV	24	MSA, IHC	9	nein (U)
Chang et al. 2006 [146]	213	UICC I–IV	48	MSA	9	nein (U)
Ward et al. 2001 [109]	310	UICC I–IV	32	PCR	11	nein (M)
Eigene Ergebnisse	116	UICC II–III	58	IHC	18,6	nein (U)

Tabelle 31: Prognostische Relevanz der MSI bzw. fehlenden MMRG-Expression

IHC: Immunhistochemie, PCR: Polymerase chain reaction, MSA: Mikrosatellitenanalyse, M: multivariate Analyse, U: univariate Analyse, MSI: Mikrosatelliteninstabilität, ¹: Vorteil für MSI oder fehlender MMRG-Expression, ²: Vorteil für MSS oder positive MMRG-Expression

4.3.4. Koinzidenz zwischen p53 und den Mismatch Repair Genen

Es zeigte sich eine statistisch signifikante Koinzidenz zwischen dem MMRG- und dem p53-Expressionsstatus ($p=0,046$), wobei die Kombination p53+/MMRG+ am häufigsten war (57,9%). Andere Koinzidenzen zwischen Expressions- und Mutationsstatus des Tumorsuppressorgens p53 und den MMRG MLH1 und MSH2 traten nicht auf.

Unser Ergebnis wird in mehreren Arbeiten bestätigt. Lanza et al. wiesen eine signifikante Korrelation von p53+/MMRG+ und p53-/MMRG- nach [108]. Vergleichbar zeigte sich bei Edmonston et al. und Forster et al. ein signifikanter Zusammenhang von MSI und fehlender p53-Expression [102, 168]. Auch bei Elsaleh et al. zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen MSI und p53-Expression bzw. p53-Mutation, Tumoren mit MSS gingen signifikant häufiger mit p53+ bzw. mit p53mut einher als mit p53- oder p53wt [97]. Vergleichbar sind auch die Ergebnisse der Arbeiten von Gafa et al. und Popat et al. In erster konnte ein signifikanter Zusammenhang von MSI-H und p53- sowie von MSI-L bzw. MSS und p53+ nachgewiesen werden [86], in zweiter

zeigte sich eine inverse signifikante Beziehung zwischen p53-Expressions- und MSI-Status (MSI/p53- und MSS/p53+) [169].

Bei Breivik et al. korrelierte die MSI mit p53mut [170], im Gegensatz zu der Untersuchung von Elsaleh et al., hier trat die MSI dagegen häufiger mit p53wt als mit p53mut auf [67]. Vergleichbar ist dieses Ergebnis mit der Arbeit von Chang et al., in der sich MSS-aneuploide Tumoren signifikant häufiger mit p53mut zeigten, zudem war hier das Gesamtüberleben von Patienten mit MSS-diploiden Tumoren mit p53wt signifikant besser als bei Patienten mit MSS-diploiden Tumoren und p53mut [146]. In anderen Studien konnte wiederum keine Korrelation zwischen p53-Mutationsstatus und MSI [171] bzw. zwischen p53-Expression und MSH2 nachgewiesen werden [71].

Bei der Literaturrecherche fanden wir keine Studie, die nach möglichen Zusammenhängen zwischen MMRG-positiver und -fehlender Expression und p53 sucht und dabei den p53-Expressionsstatus vom p53-Mutationsstatus unterscheidet. Bisher wurde eine p53-Mutation meist einer fehlenden p53-Expression gleichgesetzt, was nach der Studienlage nicht mehr gerechtfertigt erscheint (s. Kapitel 4.2.). Somit ist es bedeutsam, den p53-Expressionsstatus und den p53-Mutationsstatus als zwei eigenständige mögliche prognostische Kriterien zu sehen, die eventuell in Zusammenhang mit dem MMRG-Expressionsstatus stehen.

4.3.5. Genstatus und Einfluss der adjuvanten Therapie auf die Prognose

4.3.5.1. p53-Expressionsstatus und adjuvante Therapie

In unserer Arbeit zeigte sich weder im Gesamt- noch im rezidivfreien Überleben ein Benefit für adjuvant therapierte Patienten in Abhängigkeit vom p53-Expressionstatus, vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien [67, 101, 138]. Auch die Arbeitsgruppen um Rau, Reerink und Lopez-Crapez wiesen keine prognostische Relevanz für den p53-Expressionsstatus beim Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Therapie nach [71, 107, 111].

Bei Elsaleh et al. und Ahnen et al. zeigten Patienten mit fehlender p53-Expression ein signifikant besseres Ansprechen auf die adjuvante Therapie als Patienten mit positiver p53-Expression [97, 172]. Fu et al. untersuchten unter anderem die prognostische Bedeutung von p53 für die Radiotherapie bei Patienten mit Rektumkarzinom. Tumoren mit fehlender p53-Expression zeigten sich signifikant häufiger strahlensensibel als Tumoren mit positiver p53-Expression [173].

Die Ergebnisse der relevanten Studien der letzten Jahre sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	p53- Expression (%)	Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie
Ahnen et al. 1998 [172]	129	UICC II–III	96	63	- (a)
Elsaleh et al. 2001 [97]	579	UICC III	78	40	- (a)
Ahnen et al. 1998 [173]	49	Dukes A–D	55	49	- (n)
Broll et al. 2005 [101]	120	UICC I–III	60	51	= (a)
Saw et al. 2003 [138]	60	Dukes B–C	47	55	= (a)
Elsaleh et al. 2000 [67]	388	Dukes C	60	28	= (a)
Rau et al. 2003 [71]	66	Dukes B	40	78 (vor Therapie)	= (n)
Reerink et al. 2004 [111]	34	k.A.	38	47	= (n)
Lopez-Crapez et al. 2005 [107]	70	UICC I–II	k.A.	56	= (n)
Eigene Studie	114	UICC II–III	58	62	= (a)

Tabelle 32: Positive p53-Expression und Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie

=: kein Unterschied zur Vergleichsgruppe, -: Vorteil für fehlende p53-Expression, n: neoadjuvant, a: adjuvant, k.A. keine Angaben

4.3.5.2. p53-Mutationsstatus und adjuvante Therapie

In vorliegender Studie zeigten sich bezogen auf den p53-Mutationsstatus und die Durchführung einer adjuvanten Therapie keine Unterschiede im Gesamtüberleben bzw. im rezidivfreien Überleben. Andere Arbeitsgruppen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen [67, 107, 122, 138].

Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit p53wt ein signifikant besseres Ansprechen auf die adjuvante Therapie auf als Patienten mit p53mut [97]. Auch Goh et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass Patienten mit p53wt ein signifikant besseres Gesamtüberleben sowohl unter adjuvanter als auch unter palliativer Therapie haben als Patienten mit p53mut [143]. In der Arbeit von Benhatter et al. sprachen Patienten mit p53mut schlecht bis gar nicht auf die adjuvante Therapie an [145]. Im Jahre 2006 erschien eine weitere interessante Arbeit, in welcher über 30 Studien miteinander verglichen wurden, die sich mit pathologischen und molekularen Markern und deren Einfluss auf die adjuvante Chemotherapie beim CRC befassen. Insgesamt konnte herausgearbeitet werden, dass weder mit der Ermittlung des p53-Expressionsstatus mittels IHC noch des p53-Mutationsstatus mittels PCR eine prädiktive Aussage über das Therapieansprechen gemacht werden kann [174]. Nur zwei der untersuchten Arbeiten, die den p53-Mutationsstatus mittels Gensequenzierung ermittelten, zeigten tatsächlich signifikante Ergebnisse. In beiden Studien wiesen Tumoren mit p53mut ein signifikant schlechteres bzw. gar kein Ansprechen auf die Radiotherapie im Vergleich zu Tumoren mit p53wt auf [147, 148]. Russo et al. zeigten in einer Multicenterstudie sowohl für p53wt als auch für p53mut einen

signifikanten Überlebensbenefit nach adjuvanter Therapie. Allerdings wurde in der Studie nicht das Überleben von Patienten mit p53wt mit dem von Patienten mit p53mut verglichen [115]. Eine Zusammenfassung der relevanten Studien der letzten Jahre, die prognostische Bedeutung des p53-Mutationsstatus betreffend, ist in Tabelle 33 dargestellt.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	Methode	p53-Mutation (%)	Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie
Goh et al. 1995 [143]	54	Dukes A–D	24	SSCP	54	- (a)
Elsaleh et al. 2001 [97]	765	UICC III	78	PCR	38	- (a)
Kandioler et al. 2002 [148]	64	UICC I–III	37	Sequenzierung	45	- (n)
Rebischung et al. 2002 [147]	86	UICC I–III	48	PCR, DGGE, Sequenzierung	51	- (n)
Saw et al. 2003 [138]	60	Dukes B–C	47	PCR	42	= (a)
Elsaleh et al. 2000 [67]	388	Dukes C	60	PCR	28	= (a)
Lopez-Crapez et al. 2005 [107]	70	UICC I–II	k.A.	PCR	50	= (n)
Soong et al. 2000 [122]	995	Dukes B–C	102	PCR	39	= (a)
Eigene Ergebnisse	72	UICC II–III	58	IHC	67	= (a)

Tabelle 33: Prognostische Bedeutung des p53-Mutationsstatus unter Berücksichtigung der (neo-) adjuvanten Therapie

IHC: Immunhistochemie, SSCP: single strand confirmation polymorphism, PCR: Polymerase chain reaction, DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis. =: kein Unterschied zur Vergleichsgruppe, -: Nachteil für p53mut, n: neoadjuvant, a: adjuvant

Viele der bisher durchgeführten Studien entsprechen in ihren Ergebnissen der Vorstellung der Funktion von p53 als „Wächter des Genoms“ (nur nicht-mutiertes p53 hat die Möglichkeit, auf DNA-Schäden mit einem G1-Arrest bzw. mit Apoptose zu reagieren).

Erste Ergebnisse von in-vitro-Studien geben Hinweise auf das mögliche Bestehen einer p53-unabhängigen Apoptose (sogenannte mitotische Katastrophe). Bhonde et al. behandelten sowohl p53wt-Zellen als auch p53mut-Zellen des CRCs mit Irinotecan (CPT-II). Dabei reagierten die p53wt-Zellen mit einem über Tage anhaltenden G2/M-Arrest, wohingegen die p53mut-Zellen nur für wenige Tage arretierten und es im Verlauf zu einer p53-unabhängigen mitotischen Katastrophe (Apoptose) über die unzureichende Unterdrückung der hMps1-Kinase-Expression kam [64]. In einer weiteren Studie von Magrini et al. wurden Zellreihen (p53wt/MLH1-, p53wt/MLH1+, p53mut/MLH1-) mit CPT-II behandelt. In der Gruppe p53wt/MLH1+ zeigte sich eine Verlängerung des Zell-Zyklus-Arrestes auf 12 Tage und keine Apoptose, in der

Zellreihe p53mut/MLH1- folgte auf einen nur 4-tägigen-G2/M-Arrest die mitotische Katastrophe. In der dritten Gruppe (p53wt/MLH1-) erhöhte sich die Dauer des Zell-Zyklus-Arrestes auf 6–9 Tage, zudem kam es zu Apoptosen. Auch hier konnte eine p53-unabhängige Apoptose, induziert durch CPT-II, gezeigt werden. Zudem scheint das mutierte MLH1 die CPT-II-induzierte Apoptose zu verstärken [65]. Möglicherweise trägt diese „mitotische Katastrophe“ zur schnellen Apoptose bei Tumorzellen unter adjuvanter Therapie bei.

4.3.5.3. Mismatch Repair Gen-Status und adjuvante Therapie

In der vorliegenden Studie ergab sich zwischen dem MMRG-Status und der Durchführung einer adjuvanten Therapie kein signifikanter Zusammenhang im Gesamtüberleben bzw. im rezidivfreien Überleben. Der fehlende Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und MMRG-Status zeigte sich auch in mehreren anderen Studien [71, 108, 137].

Im Gegensatz dazu konnten Jover et al. für Patienten mit MMRG-positiven Tumoren ein signifikant besseres Gesamt- und rezidivfreies Überleben nach adjuvanter Therapie feststellen als für Patienten, die keine Therapie erhielten. Patienten mit MMRG-negativen Tumoren profitierten nicht von der adjuvanten Therapie [167]. Das Ergebnis von Jover et al. widerspricht dem von Ide et al., welche ein signifikant besseres rezidivfreies Überleben für Patienten mit niedriger MLH1-Expression im Vergleich zu Patienten mit hoher MLH1-Expression nach Erhalt einer adjuvanten Therapie nachweisen konnten [175]. Auch Bendardaf et al. zeigten in ihrer Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem CRC und schwacher bzw. fehlender Expression von MLH1 und MSH2 ein besseres Ansprechen auf die adjuvante Therapie als bei Patienten mit positivem Expressionsstatus [164].

In anderen Untersuchungen wurde der Benefit einer adjuvanten Therapie bezogen auf den MSI-Status überprüft. Meist fand sich für die MSI-H-Patienten ein signifikanter Vorteil bezüglich der adjuvanten Therapie [85, 88, 97, 176, 177]. MSI-H-Patienten, die nicht adjuvant therapiert wurden, zeigten gegenüber den MSS-Patienten keinen Überlebensbenefit mehr [176].

Anders bei Carethers et al., hier zeigte sich ein signifikant besseres Überleben bei Patienten mit non-MSI-H-Tumoren nach adjuvanter Therapie, während Patienten mit MSI-H-Tumoren keinen Überlebensunterschied aufwiesen, unabhängig davon, ob sie eine adjuvante Therapie erhielten oder nicht [178]. Vergleichbar ist dieses Ergebnis mit der Studie von Ribic et al., in der Patienten mit MSS oder MSI-L ein signifikant besseres Gesamtüberleben nach adjuvanter Therapie aufwiesen, Patienten mit MSI-Tumoren jedoch nicht von einer adjuvanten Therapie profitierten [89]. Benatti et al. zeigten zumindest in einer Subgruppe von UICC-III-Tumoren für Patienten

mit MSS ein signifikant besseres Gesamtüberleben nach adjuvanter Therapie im Vergleich zu Patienten, die keine adjuvante Therapie erhalten hatten [179].

Eine Zusammenfassung der Arbeiten der letzten 10 Jahre zur prognostischen Bedeutung des MMRG-Status beim CRC findet sich in Tabelle 34.

Referenz	n	Stadium	Follow-Up (Monate)	MSI/ neg. MMRG (%)	Effekt der adjuvanten Therapie
Elsaleh et al. 2000 [67]	656	Dukes C	54	9	+ für MSI
Hemminki et al. 2001 [88]	95	Dukes C	31	12	+ für MSI
Elsaleh und Iacopetta 2001 [176]	876	UICC III	76	k.A.	+ für MSI
Elsaleh et al. 2001 [97]	732	UICC III	78	9	+ für MSI
Ribic et al. 2003 [89]	570	UICC I-IV	89	17	+ für MSS und MSI-L
Jover et al. 2006 [167]	754	UICC I-IV	24	9	+ für MMRG+
Bendardaf et al. 2007 [164]	86	Dukes BD	33	70	+ für MMRG-
Carethers et al. 2004 [178]	204	UICC II-III	k.A.	18	+ für non-MSI-H = für MSI-H
Lanza et al. 2006 [108]	718	UICC II-III	93	16	= für MMRG+/-
Eigene Ergebnisse	114	UICC II-III	58	14	= für MMRG+/-

Tabelle 34: MSI und Effekt der adjuvanten Therapie

=: kein Unterschied zur Vergleichsgruppe, +: Vorteil für MSI oder fehlende MMRG-Expression, k.A.: keine Angabe

4.3.6. p53, Mismatch Repair Gene und adjuvante Therapie

Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen Expressions- bzw. Mutationsstatus von p53, dem MMRG-Expressionsstatus und der adjuvanten Therapie auf das Gesamt- oder das rezidivfreie Überleben belegen.

Pocard et al. zeigten, dass eine p53-Mutation in MSI-positiven Tumoren die Sensitivität gegenüber 5-FU signifikant steigert [180]. Elsaleh et al. untersuchten in einer ihrer Studien die prognostische Bedeutung von p53-Expressionsstatus, p53-Mutationsstatus und MSI getrennt für Patienten, die eine adjuvante Therapie erhalten bzw. nicht erhalten hatten, unter Berücksichtigung des Geschlechts. In allen vier Subgruppen (p53mut/weiblich, p53wt/weiblich, p53mut/männlich, p53wt/männlich) zeigte sich bei MSI+ ein größerer Überlebensvorteil der adjuvant therapierten Patienten im Vergleich zu denen mit MSI-. Keinen Benefit von der adjuvanten Therapie zeigten lediglich männliche Patienten mit p53mut/MSI- [97]. Weitere Arbeiten, welche die prognostische Bedeutung der adjuvanten Therapie beim CRC für die einzelnen Subgruppenkombinationen von p53 und der MMRG untersucht haben, konnten wir

nicht finden. Garrity et al. beschäftigten sich zwar mit p53, den MMRG und weiteren prognostischen Markern beim CRC unter Berücksichtigung der adjuvanten Therapie, eine Subgruppenanalyse von p53 und den MMRG wurde aber nicht durchgeführt [66]. Ricciardiello et al. untersuchten mehrere molekulargenetische Marker (unter anderem p53) bezüglich deren Korrelation mit MSI, auf den Benefit einer adjuvanten Therapie wurde jedoch nicht eingegangen [151].

4.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Insgesamt erwiesen sich in unserer Arbeit ein positiver p53-Expressionsstatus, ein positiver p53-Mutationsstatus und ein positiver MLH1-Expressionsstatus als günstig für die Patienten. Zudem zeigte sich eine signifikante Koinzidenz zwischen dem MMRG-Status und dem p53-Expressionsstatus ($p=0,046$), wobei sich in 57,9% der Fälle die Kombination p53+/MMRG+ fand. Diese Genkombination zeigte im Vergleich zu den anderen möglichen auch den Trend zum längeren Gesamtüberleben ($p=0,066$).

Insgesamt sind die verschiedenen Studien, gerade den p53-Status betreffend, so widersprüchlich, dass ein baldiger Durchbruch hinsichtlich des prognostischen Vorhersagewertes unwahrscheinlich erscheint. Die European Group of Tumour Markers (EGTM) und die American Society of Clinical Oncology (ASCO) konnten sich aufgrund vorliegender Daten nicht für den Einsatz des p53-Mutationsstatus als Prognoseparameter aussprechen [181, 182]. Petersen et al. verglichen in ihrer Übersichtsarbeit 28 Studien zum Thema p53 und dessen prognostische Bedeutung für die Therapie. Insgesamt sahen sie die Bedeutung von p53 als prognostischen Parameter für das CRC als sehr unwahrscheinlich an [183]. Andere Arbeitsgruppen räumen für p53 als prognostischen Marker nur dann eine Perspektive ein, wenn es gelingt, die Komplexität der p53-Regulation und alle p53-Mutationen zu entschlüsseln [184].

Abgesehen von unserer Arbeit wurde der p53-Mutationsstatus in anderen Arbeiten mittels PCR ermittelt. Hierbei ist zu bedenken, dass das p53-Gen verschiedene Mutationen aufweisen kann, die nicht alle in ihrer Bedeutung gleichgesetzt werden dürfen. Verschiedene Mutationslokalisationen bedeuten möglicherweise verschiedene prognostische Vorhersagen. Russo et al. arbeiteten in ihrer Multicenterstudie heraus, dass die verschiedenen Mutationstypen von p53 genauso wie die unterschiedlichen Lokalisationstypen des CRCs einen jeweils unterschiedlichen prognostischen Wert einnehmen und daher gesondert betrachtet werden sollten [115].

5. Zusammenfassung

Einführung

Das Tumorsuppressorgen p53 und die MMRG werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Prognose und den Effekt einer adjuvanten Therapie beim kolorektalen Karzinom in der Literatur kontrovers diskutiert.

In vielen Studien wurde bei der Untersuchung des MMRG-Status beim CRC der p53-Mutationsstatus nicht berücksichtigt, die Zellpopulationen wurden lediglich auf ihre p53-Expression hin untersucht. Tumoren mit p53wt und p53mut wurden demnach stets zu einer Gruppe zusammengefasst und ausgewertet. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das p53-Gen verschiedene Mutationen aufweisen kann, die nicht in ihrer Bedeutung gleichgesetzt werden dürfen. Dies sind mögliche Erklärungen für die kontroversen Ergebnisse.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur bisher kontrovers diskutierte Rolle von p53 und den MMRG und ihren Einfluss auf die adjuvante Therapie beim CRC an eigenem Krankengut zu evaluieren.

Material und Methoden

Von 125 Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom im Stadium II–III nach UICC, die im Zeitraum von 1995–2001 in der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin kurativ operiert wurden, sind die Nachsorgedaten erhoben worden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit lag bei $51,8 \pm 2,5$ Monaten.

Die Proteinexpression der Gene erfolgte mittels immunhistochemischer Analyse an den Tumorblöcken der Patienten. Zur Berechnung der Überlebenszeit wurde die Kaplan Meier Methode verwendet. Der p53-Mutationsstatus wurde über die Kenntnis von p53- und p21-Expressionsstatus ermittelt.

Ergebnisse

Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 64%, die rezidivfreie Überlebensrate bei 62%. Eine positive Expression von p53 fand sich bei 63,2% (72/114) der Tumoren. Indirekt konnte bei 68,1% (49/72) der Tumoren auf eine p53-Mutation geschlossen werden, da bei diesen eine fehlende p21-Expression vorlag. 90,5% (105/116) der Tumoren zeigten eine positive Expression für MLH1, 95,7% (111/116) für MSH2.

Tumoren mit p53mut waren signifikant häufiger im Rektum lokalisiert als im Kolon ($p=0,009$). Ebenfalls zeigten die MLH1-positiven Tumoren eine signifikant häufigere Lokalisation im Rektum ($p=0,002$). Bei MLH1-negativen Tumoren fand sich ein signifikant schlechteres Tumorgrading als bei MLH1-positiven ($p=0,004$).

Patienten, deren Tumor eine positive p53-Expression aufwies, hatten ein signifikant besseres Gesamtüberleben als Patienten mit p53-negativem Tumor ($83,4\pm 4,9$ vs. $60,3\pm 5,1$ Monate, $p=0,048$). In der Subgruppe von Patienten mit Tumorlokalisation im Rektum wurde dieser Vorteil besonders deutlich ($89,3\pm 5,8$ Monate vs. $54,4\pm 6,1$ Monate, $p=0,002$).

Bei mutiertem p53 war das Gesamtüberleben signifikant besser als bei Tumoren mit dem p53-Wildtyp-Status ($94,5\pm 5,0$ Monate vs. $58,2\pm 8,7$ Monate, $p<0,0001$). Bei Tumorlokalisation im Kolon zeigten Patienten mit p53mut ein signifikant besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit p53wt ($96,7\pm 4,8$ Monate vs. $44,7\pm 9,5$ Monate, $p=0,006$). Das rezidivfreie Überleben war für MLH1-positive Patienten signifikant besser als für MLH1-negative Patienten ($77,2\pm 4,5$ Monate vs. $40,6\pm 10,8$ Monate, $p=0,02$).

Es zeigte sich eine signifikante Koinzidenz zwischen dem MMRG-Status und dem p53-Expressionsstatus, die Kombination MMRG+/p53+ lag mit 57,9% am häufigsten vor ($p=0,046$) und zeigte im Vergleich zu den anderen Gruppen einen Trend zum längeren Gesamtüberleben ($p=0,066$).

Der Expressions- bzw. Mutationsstatus von p53 und der Expressionsstatus der Mismatch Repair Gene MLH1 und MSH2 haben keine Bedeutung für das Ansprechen auf die adjuvante Therapie.

Schlussfolgerung

Als prognostisch günstig erweist sich beim kolorektalen Karzinom eine positive p53-Expression, eine p53-Mutation und ein MLH1-positiver Status.

Ein Zusammenhang zwischen dem Expressions- bzw. Mutationsstatus von p53 und dem Expressionsstatus der MMRG einerseits sowie dem Ansprechen auf die adjuvante Therapie andererseits besteht nicht.

6. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AK	Antikörper
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase
APC	adenomatous polyposis coli
ARO	Arbeitsgemeinschaft für Radiologische Onkologie
BB	Blutbild
CAO	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Onkologie
CDK	cyclin-dependent kinase
CEA	carcinoembryonales Antigen
CIMP	CpG-Insel-Methylierungstyp
CIN	chromosomale Instabilität
cm	Zentimeter
CRC	colorectal cancer
CT	Computertomographie
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FC	Flow cytometry
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
IHC	Immunhistochemie
IRS	immunreaktiver Score
JÜR	Jahresüberlebensrate
kDa	Kilodalton
m	männlich
Min.	Minute
MMRG	Mismatch Repair Gene
MSA	Mikrosatellitenanalyse
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	high level Mikrosatelliteninstabilität

MSI-L	low level Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
p53	Protein der Größe 53 kDa
p53mut	mutierte Form von p53
p53wt	p53-Wildtyp
p21	Protein der Größe 21 kDa
p16	Protein der Größe 16 kDa
PCR	polymerase chain reaction
Rb	retinoblastom
RC	rectal cancer
SPSS	Statistical Package for the Social Science
Std.	Stunde
TNM	tumor node metatasis
TS	thymidylate synthase
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
vs.	versus
w	weiblich

7. Literaturverzeichnis

1. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Potvin C, Gravel D, Bernard D, Boyle P: Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadians in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer* 1997; 80:858-864
2. Schmoll HJ HK, Possinger K et al (1997) Kolorektales Karzinom in: *Kompendium Internistischer Onkologie*, Heidelberg: Springer Verlag, 694-759. Springer Verlag
3. Wittekind C, Tannapfel A: [Regression grading of colorectal carcinoma after preoperative radiochemotherapy. An inventory]. *Pathologe* 2003; 24:61-65
4. ARO KdCA: Aktualisierter Konsensus der CAO / AIO / ARO zur adjuvanten Therapie bei Kolon- und Rektumkarzinom. *Onkologie* 1999; 22:154-156
5. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2343-2351
6. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R: Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:1731-1740
7. Antonino A, Formisano G, Guida F, Esposito D, Conte P, Di Maio V, Delli Carpini C, Donisi M, Salvati V, Aprea G, Avallone U: [Surgical treatment and prognostic factors in colorectal cancer]. *Minerva Chir* 2007; 62:161-166
8. Anwar MA, D'Souza F, Coulter R, Memon B, Khan IM, Memon MA: Outcome of acutely perforated colorectal cancers: experience of a single district general hospital. *Surg Oncol* 2006; 15:91-96
9. Hermanek P, Mansmann U, Staimmer DS, Riedl S: The German experience: the surgeon as a prognostic factor in colon and rectal cancer surgery. *Surg Oncol Clin N Am* 2000; 9:33-49, vi
10. Wray CM, Ziogas A, Hinojosa MW, Le H, Stamos MJ, Zell JA: Tumor subsite location within the colon is prognostic for survival after colon cancer diagnosis. *Dis Colon Rectum* 2009; 52:1359-1366
11. Zhou ZG, Pan ZZ, Wan DS, Li LR, Wu XJ, Ding PR, Lin JZ, Peng ZH: [Prognostic analysis of 443 cases of stage II colorectal cancer and the value of adjuvant chemotherapy.]. *Ai Zheng* 2009; 28:908-912
12. Baldus SE: [Clinical, pathological and molecular prognostic factors in colorectal carcinomas]. *Pathologe* 2003; 24:49-60
13. McHugh SM, O'Donnell J, Gillen P: Genomic and oncoproteomic advances in detection and treatment of colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 2009; 7:36
14. Fornaro R, Frascio M, Denegri A, Stabilini C, Impenatore M, Mandolino F, Lazzara F, Gianetta E: [Chron's disease and cancer]. *Ann Ital Chir* 2009; 80:119-125
15. Itzkowitz SH, Present DH: Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11:314-321
16. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767
17. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al.: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648

18. Ruschoff J, Dietmaier W, Bocker T, Wallinger S, Kullmann F, Beham A, Hofstadter F: [Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology?]. *Pathologe* 1998; 19:269-278
19. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561
20. Salahshor S, Kressner U, Fischer H, Lindmark G, Glimelius B, Pahlman L, Lindblom A: Microsatellite instability in sporadic colorectal cancer is not an independent prognostic factor. *Br J Cancer* 1999; 81:190-193
21. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819
22. Li A, Blow JJ: The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E182-184
23. Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; 58:1097-1105
24. Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ: mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 1996; 16:2445-2452
25. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH: Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58:1193-1198
26. DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnicka-Worms H, Huang CM, Livingston DM: The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; 58:1085-1095
27. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR: The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991; 65:1053-1061
28. Defeo-Jones D, Huang PS, Jones RE, Haskell KM, Vuocolo GA, Hanobik MG, Huber HE, Oliff A: Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; 352:251-254
29. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR: Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993; 365:349-352
30. Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC: Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 1992; 358:259-261
31. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408:307-310
32. Tao W, Levine AJ: P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6937-6941
33. Hengst (2003) Regulation der Zellproliferation. In: Max-Planck-Institut für Biochemie
34. Daniel PT, Ganten, Ruckpaul (2003) Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Springer Verlag: Heidelberg
35. Haupt Y, Barak Y, Oren M: Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J* 1996; 15:1596-1606
36. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69:1237-1245
37. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B: Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 1993; 362:857-860
38. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R: Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; 11:1974-1986
39. Wadgaonkar R, Collins T: Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274:13760-13767

40. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387:296-299
41. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387:299-303
42. Gustafsson B, Axelsson B, Christensson B, Winiarski J: MDM2 and p53 in childhood acute lymphoblastic leukemia: higher expression in childhood leukemias with poor prognosis compared to long-term survivors. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18:497-508
43. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ: Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; 54:794-799
44. Wurl P, Meye A, Schmidt H, Lautenschlager C, Kalthoff H, Rath FW, Taubert H: High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene* 1998; 16:1183-1185
45. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA: The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92:713-723
46. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G: The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 1998; 17:5001-5014
47. Li YJ, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R: Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene* 1995; 10:599-601
48. Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP: Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 84:3781-3784
49. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305
50. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53
51. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70:523-526
52. Harris CC: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1442-1455
53. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331
54. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, Lubin R, Delchier JC, Soussi T: Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 1997; 40:356-361
55. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532
56. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC: Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:3551-3555
57. Cunningham J, Lust JA, Schaid DJ, Bren GD, Carpenter HA, Rizza E, Kovach JS, Thibodeau SN: Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52:1974-1980
58. Forslund A, Lonnroth C, Andersson M, Brevinge H, Lundholm K: Mutations and allelic loss of p53 in primary tumor DNA from potentially cured patients with colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:2829-2836

59. Iacopetta B, DiGrandi S, Dix B, Haig C, Soong R, House A: Loss of heterozygosity of tumour suppressor gene loci in human colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 1994; 30A:664-670
60. Kahlenberg MS, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ: p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88:1814-1819
61. Russell P, Nurse P: cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 1986; 45:145-153
62. Gonczy P: Nuclear envelope: torn apart at mitosis. *Curr Biol* 2002; 12:R242-244
63. Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T: Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 1998; 282:487-490
64. Bhonde MR, Hanski ML, Budczies J, Cao M, Gillissen B, Moorthy D, Simonetta F, Scherubl H, Truss M, Hagemeyer C, Mewes HW, Daniel PT, Zeitz M, Hanski C: DNA damage-induced expression of p53 suppresses mitotic checkpoint kinase hMps1: the lack of this suppression in p53MUT cells contributes to apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281:8675-8685
65. Magrini R, Bhonde MR, Hanski ML, Notter M, Scherubl H, Boland CR, Zeitz M, Hanski C: Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status. *Int J Cancer* 2002; 101:23-31
66. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, Krook JE, Michalak JC, Goldberg RM, O'Connell MJ, Furth AF, Sargent DJ, Murphy LM, Hill E, Riehle DL, Meyers CH, Witzig TE: Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2004; 22:1572-1582
67. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N, Iacopetta B: p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* 2000; 58:52-59
68. Paradiso A, Rabinovich M, Vallejo C, Machiavelli M, Romero A, Perez J, Lacava J, Cuevas MA, Rodriguez R, Leone B, Sapia MG, Simone G, De Lena M: p53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: response to chemotherapy and long-term prognosis. *Int J Cancer* 1996; 69:437-441
69. Marks DI, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ, Lauer SJ, Carroll D, Brodsky I, Haines DS: Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1997; 15:1158-1162
70. Schwandner O, Bruch HP, Broll R: p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 2002; 17:11-19
71. Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dorken B, Daniel PT: Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21:3391-3401
72. Peltomaki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:1174-1179
73. Ruschoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G, Muders M, Blasenbren-Vogt S, Rummele P, Muller A, Buttner R: [Molecular pathology in hereditary colorectal cancer. Recommendations of the Collaborative German Study Group on hereditary colorectal cancer funded by the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe)]. *Pathologe* 2004; 25:178-192

74. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-816
75. Kullmann F, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J: [Microsatellite instability--a new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors]. *Z Gastroenterol* 1996; 34:813-822
76. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-174
77. Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, de La Chapelle A, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P: Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:12661-12666
78. Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF: Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10296-10301
79. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN: Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:3455-3460
80. Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, Wyllie AH: Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 1996; 12:2641-2649
81. Guillem JG, Puig-La Calle J, Jr., Cellini C, Murray M, Ng J, Fazzari M, Paty PB, Quan SH, Wong WD, Cohen AM: Varying features of early age-of-onset "sporadic" and hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1999; 42:36-42
82. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR: Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145:148-156
83. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104:1535-1549
84. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB: The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:201-212
85. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B: Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355:1745-1750
86. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G: Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000; 89:2025-2037
87. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69-77
88. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H: Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000; 119:921-928
89. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:247-257

90. Bhonde MR, Hanski ML, Magrini R, Moorthy D, Muller A, Sausville EA, Kohno K, Wiegand P, Daniel PT, Zeitz M, Hanski C: The broad-range cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 induces apoptosis in colon carcinoma cells through transcriptional suppression of the Bcl-x(L) protein. *Oncogene* 2005; 24:148-156
91. Hermanek P, Mansmann U, Altendorf-Hofmann A, Hermanek P, Jr., Riedl S, Staimmer D: [Comparative study of oncological outcome quality in colorectal carcinoma--ranking by surrogate endpoint?]. *Chirurg* 1999; 70:407-414
92. AWMF AdWMF (2004) Kolorektales Karzinom. In: Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.
93. Junginger TH, Dieter Kurt; Sauer, Rolf; Hermanek, Paul (1999) Adjuvante Therapie bei Kolon- und Rektumkarzinom, *Deutsches Ärzteblatt*, Ausgabe 11, 698-700. In: *Deutsches Ärzteblatt*. p 698-700
94. Bazan V, Migliavacca M, Tubiolo C, Macaluso M, Zanna I, Corsale S, Amato A, Calo V, Dardanoni G, Morello V, La Farina M, Albanese I, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A: Have p53 gene mutations and protein expression a different biological significance in colorectal cancer? *J Cell Physiol* 2002; 191:237-246
95. Curtin K, Slattery ML, Holubkov R, Edwards S, Holden JA, Samowitz WS: p53 alterations in colon tumors: a comparison of SSCP/sequencing and immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:380-386
96. Dix B, Robbins P, Carrello S, House A, Iacopetta B: Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1994; 70:585-590
97. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B: P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1343-1349
98. Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grieu F, Lim B, Knowles S, Williams KE, Turbett GR, House AK, Iacopetta BJ: Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27:1050-1055
99. Noske A, Lipka S, Budczies J, Muller K, Loddenkemper C, Buhr HJ, Kruschewski M: Combination of p53 expression and p21 loss has an independent prognostic impact on sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22:3-9
100. Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Shah NG, Vora HH, Ghosh N, Trivedi TI: Molecular markers are predictors of recurrence and survival in patients with Dukes B and Dukes C colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:523-533
101. Broll R, Busch P, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Farke S, Bruch HP, Windhovel U: Influence of thymidylate synthase and p53 protein expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20:94-102
102. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP: Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; 31:1506-1514
103. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C: Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3490-3499
104. Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N, Hiddemann W, Jung A, Kirchner T: The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106:202-206
105. Jass JR: Towards a molecular classification of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14:194-200

106. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR: Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001; 159:2107-2116
107. Lopez-Crapez E, Bibeau F, Thezenas S, Ychou M, Simony-Lafontaine J, Thirion A, Azria D, Grenier J, Senesse P: p53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: a prospective multilevel analysis. *Br J Cancer* 2005; 92:2114-2121
108. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L: Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2359-2367
109. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N: Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001; 48:821-829
110. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, Temple LK, Hsieh E, Hiruki T, Narod S, Bapat BV, Gallinger S, Redston M: Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1248-1255
111. Reerink O, Karrenbeld A, Plukker JT, Verschueren RC, Szabo BG, Sluiter WJ, Hospers GA, Mulder NH: Molecular prognostic factors in locally irresectable rectal cancer treated preoperatively by chemo-radiotherapy. *Anticancer Res* 2004; 24:1217-1221
112. Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M: Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004; 12:111-121
113. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE: Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3069-3075
114. Schwandner O, Bruch HP, Broll R: Prognostic significance of p21 and p27 protein, apoptosis, clinical and histologic factors in rectal cancer without lymph node metastases. *Eur Surg Res* 2002; 34:389-396
115. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N: The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23:7518-7528
116. Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M: Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 2004; 111:921-928
117. Hilska M, Collan YU, VJ OL, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, Roberts PJ: The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48:2197-2208
118. Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI: Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1184-1191
119. Moore HG, Shia J, Klimstra DS, Ruo L, Mazumdar M, Schwartz GK, Minsky BD, Saltz L, Guillem JG: Expression of p27 in residual rectal cancer after preoperative chemoradiation predicts long-term outcome. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:955-961
120. Allal AS, Gervaz P, Brundler MA: Cyclin D1, cyclin E, and p21 have no apparent prognostic value in anal carcinomas treated by radiotherapy with or without chemotherapy. *Br J Cancer* 2004; 91:1239-1244

121. Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-456
122. Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS, Joseph D, Iacopetta B: Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 2000; 36:2053-2060
123. Goh HS, Elnatan J, Low CH, Smith DR: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location. *Int J Oncol* 1999; 15:491-498
124. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G: Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106:42-48
125. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G: Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:593-599
126. Tortola S, Marcuello E, Gonzalez I, Reyes G, Arribas R, Aiza G, Sancho FJ, Peinado MA, Capella G: p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1375-1381
127. Lebe B, Sarioglu S, Sokmen S, Ellidokuz H, Fuzun M, Kupelioglu A: The clinical significance of p53, p21, and p27 expressions in rectal carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13:38-44
128. Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Newland R, Chapuis P, Solomon M: p53 and DCC immunohistochemistry in curative rectal cancer surgery. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18:188-195
129. Zhao P, Hu YC, Talbot IC: Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2202-2206
130. Hsieh JS, Lin SR, Chang MY, Chen FM, Lu CY, Huang TJ, Huang YS, Huang CJ, Wang JY: APC, K-ras, and p53 gene mutations in colorectal cancer patients: correlation to clinicopathologic features and postoperative surveillance. *Am Surg* 2005; 71:336-343
131. McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI: Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 2002; 196:386-393
132. Diez M, Medrano M, Mugerza JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, Martin A, Noguerales F, Ruiz A, Granell J: Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2000; 20:3907-3912
133. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B: Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:364-372; discussion 372-363
134. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH: Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 2001; 195:171-178
135. Lan YT, Chang SC, Li AF, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Lin JK: p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:499-506
136. Nasif WA, Lotfy M, El-Sayed IH, El-Kenawy Ael M, El-Shahat M, El-Hak NG: Implications of CEA and p53 overexpression in the poor prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol* 2006; 23:237-244

137. Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J: Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:451-459
138. Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, Clarke S, Chapuis P, Solomon MJ: p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:192-202
139. Smyth EF, Sharma A, Sivarajasingham N, Hartley J, Monson JR, Cawkwell L: Prognostic implications of hMLH1 and p53 immunohistochemical status in right-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:2086-2091; discussion 2091-2082
140. Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ: Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6:1163-1169
141. Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS, Sarbia M, Borchard F, Greschniok A, Gruenagel HH, Porschen R, Gregor M: Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data and review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:23-42
142. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR: Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1196-1206
143. Goh HS, Yao J, Smith DR: p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55:5217-5221
144. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calo V, Valerio MR, Latteri MA, Vieni S, Grassi N, Cicero G, Dardanoni G, Tomasino RM, Colucci G, Gebbia N, Russo A: Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16 Suppl 4:iv50-55
145. Benhattar J, Cerottini JP, Saraga E, Mettetz G, Givel JC: p53 mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69:190-192
146. Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chi CW: Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118:1721-1727
147. Rebischung C, Gerard JP, Gayet J, Thomas G, Hamelin R, Laurent-Puig P: Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 100:131-135
148. Kandioler D, Zwrtek R, Ludwig C, Janschek E, Ploner M, Hofbauer F, Kuhrer I, Kappel S, Wrba F, Horvath M, Karner J, Renner K, Bergmann M, Karner-Hanusch J, Potter R, Jakesz R, Teleky B, Herbst F: TP53 genotype but not p53 immunohistochemical result predicts response to preoperative short-term radiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235:493-498
149. Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, Scherubl H, Schindler I, Hermann S, Stein H, Buhr HJ, Riecken EO, Zeitz M, Dorken B, Daniel PT: Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer* 2002; 99:589-596
150. Kruschewski M, Noske A, Haier J, Runkel N, Anagnostopoulos Y, Buhr HJ: Is reduced expression of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 in patients with sporadic colorectal cancer related to their prognosis? *Clin Exp Metastasis* 2002; 19:71-77
151. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterini P, Biasco G, Martinelli GN, Roda E, Bazzoli F: High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2005; 11:4234-4240

152. Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L: Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 2002; 15:741-749
153. Caldes T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, Lopez Asenjo J, Saez C, Sanz J, Benito M, Ramon YCS, Diaz-Rubio E: Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004; 12:621-629
154. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Sutherland F, Haine L, Longfellow M, O'Loughlin S, Cross D, Kronborg O, Fenger C, Mapstone N, Dixon M, Quirke P: Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999; 45:409-415
155. 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* 2004; 444:135-141
156. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20:1043-1048
157. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH, Jr., O'Connell MJ: Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 1998; 58:1713-1718
158. Al-Kuraya KS, Bavi PP, Ezzat AA, Al-Dayel FA, Uddin S, Atizado VL, Al-Jomah NA, Amr SS, Sheikh SS, Sauter G, Simon R: Colorectal carcinoma from Saudi Arabia. Analysis of MLH-1, MSH-2 and p53 genes by immunohistochemistry and tissue microarray analysis. *Saudi Med J* 2006; 27:323-328
159. Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitao CN, Soares J: Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol* 2000; 191:355-360
160. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, et al.: Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-5852
161. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, Edwards S, Caan BJ, Samowitz W: A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Dis Colon Rectum* 2009; 52:1304-1311
162. Tou SI, Drye ER, Boulos PB, Hollingsworth SJ: Activity (transcription) of the genes for MLH1, MSH2 and p53 in sporadic colorectal tumours with micro-satellite instability. *Br J Cancer* 2004; 90:2006-2012
163. Wright CL, Stewart ID: Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:1393-1406
164. Bendardaf R, Lamlum H, Ristamaki R, Korkeila E, Syrjanen K, Pyrhonen S: Mismatch repair status is a predictive factor of tumour response to 5-fluorouracil and irinotecan chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Tumour Biol* 2007; 28:212-220
165. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA: Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000; 87:1197-1202

166. Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, Curci A, Avallone A, Comella G, Amoruso M, Margari A, Bonomo GM, Castriota M, Tanda F, Palmieri G: Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1447-1453
167. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Pinol V, Xicola RM, Bujanda L, Rene JM, Clofent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolas-Perez D, Paya A, Alenda C: Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006; 55:848-855
168. Forster S, Sattler HP, Hack M, Romanakis K, Rohde V, Seitz G, Wullich B: Microsatellite instability in sporadic carcinomas of the proximal colon: association with diploid DNA content, negative protein expression of p53, and distinct histomorphologic features. *Surgery* 1998; 123:13-18
169. Popat S, Wort R, Houlston RS: Inter-relationship between microsatellite instability, thymidylate synthase expression, and p53 status in colorectal cancer: implications for chemoresistance. *BMC Cancer* 2006; 6:150
170. Breivik J, Lothe RA, Meling GI, Rognum TO, Borresen-Dale AL, Gaudernack G: Different genetic pathways to proximal and distal colorectal cancer influenced by sex-related factors. *Int J Cancer* 1997; 74:664-669
171. Jeon CH, Lee HI, Shin IH, Park JW: Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:29-35
172. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Jr., Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL, Jr.: Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58:1149-1158
173. Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, Nita ME, Masaki T, Ishimaru G, Higuchi Y, Tsuruo T, Muto T: Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:68-74
174. Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ: Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:55-64
175. Ide T, Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, Nakafusa Y, Miyazaki K: Expression of the hMLH1 gene is a possible predictor for the clinical response to 5-fluorouracil after a surgical resection in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2008; 19:1571-1576
176. Elsaleh H, Iacopetta B: Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1:104-109
177. Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, Walters R, Anne P, Mitchell E, Fry R, Boman B, Rose D, Fishel R, Curran W, Palazzo J: Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 2004; 24:3161-3167
178. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR: Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126:394-401
179. Benatti P, Gafa R, Barana D, Marino M, Scarselli A, Pedroni M, Maestri I, Guerzoni L, Roncucci L, Menigatti M, Roncari B, Maffei S, Rossi G, Ponti G, Santini A, Losi L, Di Gregorio C, Oliani C, Ponz de Leon M, Lanza G: Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11:8332-8340
180. Pocard M, Bras-Goncalves R, Hamelin R, Northover J, Poupon MF: Response to 5-fluorouracil of orthotopically xenografted human colon cancers with a microsatellite instability: influence of P53 status. *Anticancer Res* 2000; 20:85-90

181. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC, Jr.: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5313-5327
182. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O: Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43:1348-1360
183. Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M: The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:322-333; discussion 333-324
184. Hall PA, McCluggage WG: Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol* 2006; 208:1-6

8. Danksagungen

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kruschewski (Chirurgische Klinik I, Charité Campus Benjamin Franklin, Direktor Prof. Dr. H. J. Buhr) für das Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben. Für die Einführung in die immunhistochemische Analyse, akribische Hilfe bei den mikroskopischen Untersuchungen und bei der Auswertung des untersuchten Materials danke ich Frau Dr. med. Aurelia Noske (Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Direktor Prof. Dr. M. Dietel) ganz herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Loddenkemper vom Institut für Pathologie, Charité Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. H. Stein) will ich mich für die Auswahl und Bereitstellung der Tumorblöcke bedanken.

Außerdem danke ich meiner Familie und Freunden ganz herzlich für wertvollen unterstützenden Beistand jeglicher Art.

9. Erklärung

„Ich, Kathrin Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Prognostische Relevanz von p53 und den Mismatch-Repair Genen MLH1 und MSH2 beim kolorektalen Karzinom und deren Bedeutung für den Benefit einer adjuvanten Therapie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationsliste

Zeitschriftenbeiträge:

- Lipka S, Noske A, **Müller K**, Buhr HJ, Kruschewski M:
Prognostische Relevanz von p21, p53 und deren Bedeutung als Response-Parameter für die adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms, Chirurgisches Forum 2008: 37, 113-115
- Noske A, Lipka S, Budczies J, **Müller K**, Loddenkemper C, Buhr HJ, Kruschewski M:
Combination of p53 expression and p21 loss has an independent prognostic impact on sporadic colorectal cancer, Oncol Rep, 2009. 22(1): p. 3-9.

Vorträge:

- Lipka S, Noske A, **Müller K**, Buhr HJ, Kruschewski M:
Prognostische Relevanz von p21, p53 und deren Bedeutung als Response-Parameter für die adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms, Chirurgisches Forum, 125. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, 22.4.-25.4.2008

Poster:

- Lipka S, Noske A, **Müller K**, Buhr HJ, Kruschewski M:
Prognostische Relevanz von p21, p53 und deren Bedeutung als Response-Parameter für die adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms, 14. Winterkurs der Arbeitsgemeinschaft Gastrointestinale Onkologie (AGIO) der DGVS, Berlin, 15.2.-16.2.2008