

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum prädiktiven Stellenwert von p21, p53 und  
Caspase-3 beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom:  
Eine immunhistochemische Expressionsanalyse und  
Korrelation mit klinischen Risikofaktoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alice Josephine Müller

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 05.06.2016

*Gewidmet meinen Großeltern, Franz und Marianne Müller*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abstrakt deutsch/englisch.....</b>	<b>S.1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>S.4</b>
2.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	S.4
2.2 Das Sporadische Kolorektale Karzinom.....	S.5
2.3 Klinik.....	S.6
2.4 Diagnostik.....	S.7
2.5 Therapie.....	S.11
2.6 Prognosefaktoren/oder prognostische Marker und prädiktive Marker.....	S.12
2.7 Fragestellung.....	S.14
<b>3. Material und Methode.....</b>	<b>S.16</b>
3.1 Untersuchungsmaterial.....	S.16
3.2 Patientenkollektiv.....	S.16
3.3 Patientenauswahl.....	S.18
3.4 Anfertigung der Schnittpräparate.....	S.18
3.5 Immunhistochemie	
3.5.1 Verwendete Geräte und Chemikalien.....	S.19
3.5.2 Färbung mittels p21-Antikörper.....	S.20
3.5.3 Färbung mittels p53-Antikörper.....	S.20
3.5.4 Färbung mittels Caspase-3-Antikörper.....	S.21
3.5.5 Durchführung.....	S.21
3.6 Mikroskopische Auswertung	
3.6.1 Biopsate.....	S.22
3.6.2 Expressionsgradeinteilung der Biopsate.....	S.25
3.6.3 Resektate.....	S.25
3.6.4 Expressionsgradeinteilung der Resektate.....	S.27
3.7 Statistische Auswertung.....	S.28

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>S.29</b>
4.1 Patientenkollektiv.....	S.29
4.2 Immunhistochemische Expressionsanalyse.....	S.33
4.2.1 Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien.....	S.34
4.2.2 Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response).....	S.35
4.2.3 Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien und geeignete Cut Off's.....	S.40
4.2.4 Expressionsstatus der p21-gefärbten Resektate.....	S.43
4.2.5 Entwicklung des Expressionsstatus von p21 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie.....	S.45
4.2.6 Expressionsstatus der p53-gefärbten Biopsien.....	S.46
4.2.7 Expressionsstatus der p53-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response).....	S.48
4.2.8 Expressionsstatus der p53-gefärbten Resektate.....	S.49
4.2.9 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Biopsien.....	S.50
4.2.10 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response).....	S.52
4.2.11 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Resektate.....	S.54
4.2.12 Entwicklung des Expressionsstatus der Caspase-3 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie.....	S.56
4.3 Zusammenhang zwischen klinischen und pathohistologischen Parametern.....	S.58
4.4 Binäre logistische Regressionsanalyse (Multivariate Analyse).....	S.59
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	S.63
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>S.64</b>
5.1 Hintergrund.....	S.64
5.2 Neoadjuvante Radiochemotherapie.....	S.65
5.3 Klinische Daten und das TNM-Stadium.....	S.65
5.4 Diskussion der prädiktiven Marker.....	S.66
5.4.1 Prädiktive Relevanz des p21-Expressionsstatus.....	S.67
5.4.2 Prädiktive Relevanz des p53-Expressionsstatus.....	S.71
5.4.3 Prädiktive Relevanz des Caspase-3-Expressionsstatus.....	S.76

5.5 Zusammenfassende Diskussion.....	S.78
5.6 Schlussfolgerung.....	S.79
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S.80</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>S.88</b>
<b>8. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>S.89</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>S.90</b>
<b>10. Publikationsliste.....</b>	<b>S.91</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>S.92</b>

## 1. Abstrakt

### *Hintergrund*

Ziel dieser Arbeit war es, die prädiktive Relevanz von p53, p21 und der Caspase-3 in verschiedenen Zellkompartimenten hinsichtlich des Ansprechens von Rektumkarzinomen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie (Response) zu untersuchen. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen klinischen und pathohistologischen Parametern und der Response untersucht.

### *Material und Methode*

Insgesamt konnte an 104/105 Patienten eine immunhistochemische Expressionsanalyse der präoperativen Biopsate durchgeführt werden, sowie klinische und pathohistologische Daten und die Tumorresponse von 128 Patienten erhoben werden.

Die Berechnung der Korrelation zwischen Immunexpression und Response erfolgte mittels Mann-Whitney- und Chi-Quadrat-Test, die Berechnung der Entwicklung der Expression unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie erfolgte mittels Wilcoxon-Rank-Test. Eine multivariate Analyse wurde mittels binärer logistischer Regression durchgeführt, um die Unabhängigkeit der einzelnen Faktoren zu testen.

### *Ergebnisse*

Innerhalb des Patientenkollektivs reagierten 32% der Patienten als „Responder“ und 68% als „Non-Responder“ auf die neoadjuvante Radiochemotherapie. Der nukleäre Expressionsgrad der p21-gefärbten Biopsien korrelierte signifikant mit der Response ( $p < 0,0005$ ). Bei der Bildung eines Cut Off's von 1% bei der Auswertung der nukleären p21-Expression ergab sich eine Sensitivität von 91,4% und eine Spezifität von 30,4% bei einer signifikanten Korrelation mit der Response ( $p = 0,013$ ). Setzt man den Cut Off bei 5% ergab sich eine Spezifität von 82,6% bei einer signifikanten Korrelation mit der Response ( $p < 0,0005$ ). Die Kombination beider und die Bildung dreier Subgruppen führte zu einem monotonen Anstieg innerhalb der Gruppen: Gruppe eins (0%): 8,6% an Respondern, Gruppe zwei (1-4%): 34,3% an Respondern, Gruppe drei (5% und >): 57,1% an Respondern bei signifikanter Korrelation ( $p < 0,0005$ ).

Insgesamt vergrößerte sich der Expressionsgrad der zytoplasmatischen p21-Expression signifikant unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie ( $p < 0,0005$ ), die Anzahl an Caspase-3-gefärbten intakten Zellen und die Anzahl der Schmutznekrosen stieg signifikant an ( $p < 0,0005/p = 0,028$ ).

Die yp-T-Kategorie, die yp-N-Kategorie und der Nikotinabusus korrelierten signifikant mit der Response ( $p < 0,0005/p = 0,002/p = 0,015$ ).

In der multivariaten Analyse stellten sich die Faktoren p21 mit einem Cut Off bei 5% und p21 nukleär in drei Gruppen (0%, 1-4%, 5% und  $>$ ) als unabhängige Prädiktoren bezüglich der Response dar ( $p = 0,002/p = 0,006$ ).

### *Schlussfolgerung*

Eine nukleäre p21-Expression in der Biopsie fungiert als prädiktiver Marker bezüglich der Response auf die neoadjuvante Radiochemotherapie mit geeigneten Cut Off's bei 1% und bei 5%.

## **Abstract**

### *Background*

The predictive relevance of p21, p53 and caspase-3 regarding the response of rectal carcinomas to the preoperative radiochemotherapy was analysed. Additionally the relation of clinical and pathohistological parameters to the response was tested.

### *Material and Methods*

104/105 preoperative biopsies were immunohistochemically stained and analysed and clinical and pathohistological data as well as the tumor response of 128 patients were collected. The correlation between the immunexpression and the tumor response was statistically tested using the Mann-Whitney-Test and the Chi-Quadrat-Test. The calculation of the development of the immunexpression during the preoperativ radiochemotherapy was performed by the Wilcoxon-Rank-Test. A multivariate analysis was done using the logistic regression, to test the independence of the single factors.

### *Results*

There were 32% therapy responders and 68% non-responders. The nuclear p21 expression in the biopsies performed before radiochemotherapy correlated significantly with the response to this treatment ( $p < 0,0005$ ). The analysis of p21 revealed a sensitivity of 91,4% and a specificity of 30,4% as well as a significant correlation, if referring to a cut off at 1% ( $p = 0,013$ ). A cut off at 5% resulted in a specificity of 82,6% and a significant correlation with the response ( $p < 0,0005$ ). The implementation of both cut off points generated three groups significantly correlating with the response ( $p < 0,0005$ ): group one (0% expression) in 8,6% of responders, group two (1-4% expression) in 34,3% of responders, group three (5% and  $>$ ) in 57,1% of the

responders. Furthermore after radiochemotherapy there was an increase of the cytoplasmatic p21 expression ( $p < 0,0005$ ), as well as of the number of caspase-3 stained cells and of caspase-3 stained dirty necrosis ( $p < 0,0005$ ,  $p = 0,028$ ). The yp-t-category and the yp-n-category as well as smoking correlated significantly with the treatment response ( $p < 0,0005$ ,  $p = 0,002$ ,  $p = 0,015$ ). The multivariate analysis showed that the nuclear p21-expression with a cut off point at 5% and p21 divided into three groups (0%, 1-4%, 5% and  $>$ ) are independent predictors regarding therapy response ( $p = 0,002/p = 0,006$ ).

### *Conclusion*

The nuclear expression of p21 with suitable cut off's at 1% and 5% can be seen as a predictive marker regarding the response to the preoperative radiotherapy of rectal carcinomas.



## 2. Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Pro Jahr erkrankten im Jahr 2012 weltweit knapp 1,4 Mio. Menschen an einem kolorektalen Karzinom (CRC)<sup>1</sup>. Für das Jahr 2015 wurde allein für die Europäische Union eine Mortalität von 172.600 vorhergesagt<sup>2</sup>, weltweit fast 700.000 Todesfälle<sup>1</sup>. Das CRC stellt bei Männern nach dem Lungenkarzinom und dem Prostatakarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die dritthäufigste/zweithäufigste Krebserkrankung weltweit dar, in Deutschland nach dem Prostatakarzinom und dem Mammakarzinom bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste<sup>1</sup>. Männer sind dabei häufiger betroffen mit einer Ratio von 1.2 : 1<sup>3</sup>.

Hinsichtlich des lokoregionalen Verteilungsmusters der Karzinome bestehen Unterschiede: Circa zwei Drittel entstehen im Kolon, 30% nehmen ihren Ursprung im Rektum<sup>3</sup>. Dies erklärt unter anderem die große Anzahl an Studien, die sich speziell mit dem Rektumkarzinom befassen<sup>3</sup>.

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an einem Adenokarzinom des Kolorektums zu erkranken, der Erkrankungsgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt<sup>3,4</sup>.

Den größten Anteil an Rektumkarzinomen machen die sporadischen Karzinome mit ca. 70%<sup>5</sup> aus. Die Adenom/Dysplasie-Karzinomsequenz nach Jackman et al. liefert bis heute ein allgemein anerkanntes Entstehungskonzept<sup>6</sup>. Es besagt, dass aus ca. 10-50% aller Adenome abhängig von der Größe und dem Schweregrad der Dysplasie Adenokarzinome entstehen können<sup>7</sup>. Ätiopathogenetisch begünstigende Faktoren sind hierbei der Verzehr von rotem Fleisch<sup>8,9</sup>, fett- und cholesterinreicher Ernährung<sup>9</sup>, sowie regelmäßiger Alkohol-<sup>10</sup> und Tabakkonsum<sup>11</sup> sowie ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI)<sup>12</sup>. Neben diesen exogenen Faktoren spielen fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht und Familiarität eine Rolle<sup>13,14</sup>: Sind Verwandte ersten Grades an einem Adenokarzinom oder Adenom des Rektums insbesondere vor dem sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt erkrankt, ist die Wahrscheinlichkeit ebenfalls an diesem zu erkranken erhöht: Von allen am CRC erkrankten Patienten sind ca. 15-20% erblich bedingt<sup>13,14</sup>. Auch chronische, entzündliche Darmerkrankungen wie die Colitis ulcerosa und die Colitis Crohn erhöhen das Risiko an einem CRC zu erkranken, wobei hier insbesondere Dauer und Ausdehnung der Entzündung im Darm eine Rolle spielen<sup>15</sup>. Weiterhin gibt es im Wesentlichen zwei autosomal dominant vererbte Tumorprädispositions-Erkrankungen: (a) das hereditäre nichtpolypöse kolorektale

Karzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom), welches ca. 2-4% aller kolorektalen Karzinome ausmacht<sup>16</sup>. Bei den Betroffenen manifestiert sich das Karzinom deutlich vor dem eigentlichen Erkrankungsgipfel, zu meist vor dem 45. Lebensjahr<sup>17</sup>, (b) die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) etwa 1% aller kolorektalen Karzinome ausmachend<sup>6</sup>. Ursächlich für das gehäufte und frühe Auftreten von Neoplasien sind verschiedene Genmutationen (zusammengefasst von Ponti et al.<sup>18</sup>), die mit fast 100%-iger Penetranz zur Bildung eines Karzinoms führen<sup>19</sup>.

## 2.2 Das Sporadische Kolorektale Karzinom

Die Entwicklung eines Kolorektalen Karzinoms kann bis zu zehn Jahre andauern, beginnend mit einem Adenom über eine Dysplasie bis hin zum Karzinom<sup>4,20</sup>. In ca. 70% spielt die Mutation des APC-Gens dabei eine Schlüsselrolle<sup>21</sup>.

Dabei wird eine Abfolge verschiedener Mutationen und somit resultierender Inaktivierungen von Protoonkogenen und Tumorsuppressoronkogenen, die ursächlich für die Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz sind, diskutiert<sup>22,23</sup>. Auf die frühe Mutation des APC-Gens folgen weitere Mutationen und Deletionen anderer Genabschnitte, unter anderem die Aktivierung des KRAS Onkogens<sup>24</sup>. Man nimmt an, dass auch die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 eine entscheidende Rolle einnimmt. Im Normalfall führt dieses bei einer Anhäufung von Zellschäden zur Arretierung des Zellzyklus und führt die Zelle gezielt in die Apoptose. So kann die Bildung fehlerhafter Zellen vermieden werden. Bei vielen Krebsarten kann das p53-Gen alteriert sein (wie z.B. beim Ovarialkarzinom) und somit die Proteinfunktion gestört<sup>25,26</sup>. Zellen können so ungehindert entarten, Karzinome entstehen<sup>26</sup>. Des Weiteren können in ca. 10-15%<sup>27</sup> die sogenannten Mismatch-Repair-Gene in ihrer Funktion gestört sein. Diese sind im Normalfall dafür zuständig Basenfehlpaarungen zu erkennen und zu beheben. Bei einer Fehlfunktion in Folge einer Keimbahnmutation häufen sich in der Zelle Mutationen an und können ebenfalls zu malignen Transformation führen<sup>28</sup>. Zu den betroffenen Genen gehören die MMR-Gene: MSH2, MSH6, MLH1 oder PMS2<sup>29</sup>. Zur Diagnostik wird eine Analyse der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) durchgeführt, da die Basenfehlpaarung auch auf bestimmten Marker-Abschnitten der DNA, den sogenannten Mikrosatelliten stattfindet<sup>30</sup>. Kolorektale Karzinome, die auf diesem Wege entstehen, sind eher im proximalen Kolon lokalisiert, können dabei mit der erblichen Form, dem Lynch-Syndrom (jüngere

Patienten) aber auch mit der sporadischen (meist ältere Patienten) assoziiert sein<sup>4,27</sup>. Man unterscheidet dabei zwischen einer MSI-H (hochfrequenten Mikrosatelliteninstabilität, wenn mehr als zwei Marker in der PCR beim Vergleich von Tumor- zu Normalgewebe zusätzliche Peaks zeigen) und einer MSI-L (niedrigfrequenten Mikrosatelliteninstabilität, wenn weniger als zwei Marker in der PCR beim Vergleich von Tumor- zu Normalgewebe zusätzliche Peaks zeigen)<sup>29</sup>.

### 2.3 Klinik

Das Rektumkarzinom wird als maligner, epithelialer Tumor mit Infiltration der Submucosa definiert<sup>31</sup>. Als Rektumkarzinome gelten in der Abgrenzung gegenüber Kolonkarzinomen solche, die bei starrer Rektosigmoidoskopie 16 cm oder weniger von der Linea anocutanea entfernt sind (orale Grenze)<sup>31</sup>. Hinsichtlich der Abgrenzung (aboral) gegenüber den plattenepithelialen Analkarzinomen orientiert man sich am Levatorring (ca. 2 cm proximal der Linea dentata). Ab hier spricht man von einem Rektumkarzinom, weiter distal vom Analkarzinom<sup>31</sup>.

### 2.4 Diagnostik

Das Rektumkarzinom kann lange Zeit keine Symptomatik aufweisen<sup>32</sup>. Erste Symptome können eine Änderung der Stuhlgewohnheit sowie Hämatochezie sein. Eine Stenose des Darmlumens tritt meist erst im fortgeschrittenen Stadium auf<sup>33</sup>. Zur Standarddiagnostik gehören primär die rektal digitale Untersuchung sowie eine Koloskopie. Bei auffälligem Befund wird eine Biopsie als endoskopische Zangenbiopsie oder Exzisionsbiopsie (z.B. Polypektomie) entnommen<sup>31</sup>. Die Biopsien werden anschließend histopathologisch hinsichtlich ihrer Dignität und Entität untersucht, Adenokarzinombefunde je nach Differenzierung bzw. Wuchsmuster gradet (G1-G4)<sup>34</sup> (Tab. 1, S. 7).

**Tabelle 1: Histopathologisches Grading des Kolorektalen Adenokarzinoms<sup>34</sup>**

<b>Grad</b>	<b>Beschreibung</b>
G1	Gut/hoch differenzierter Tumor, der >95% drüsig aufgebaut ist
G2	Mäßig differenzierter Tumor mit 50-95% drüsigem Aufbau
G3	Schlecht differenzierter Tumor mit >0%-49% drüsigen Anteilen
Variabel	Variable Differenzierung des Tumors, hohes Maß an Mikrosatelliteninstabilität
G4	Undifferenzierter Tumor, keine Drüsenformation, Mucinproduktion oder neuroendokrine, plattenepitheliale oder sarcomatoide Differenzierung

Zum weiteren zunächst klinischen Staging (Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus) gehören Endosonographie und/oder Beckenmagnetresonanztomographie, in Ausnahmefällen eine Computertomographie. Hinsichtlich einer etwaigen Metastasierung werden eine Sonographie des Abdomens sowie ein Röntgen-Thorax durchgeführt<sup>6</sup>. Der Tumor kann nach dem c (klinisch)-TNM Schema klassifiziert werden: Nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) werden Rektumkarzinome bezogen auf ihre klinische TNM-Klassifikation folgendermaßen eingeteilt<sup>35</sup> (Tab. 2, S. 8):

**Tabelle 2: Klinische Stadieneinteilung des Rektumkarzinoms nach der UICC<sup>35</sup>**

<b>Stadium</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Regionäre Lymphknotenmetastasen</b>	<b>Fernmetastasen</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Jedes T	N1, N2	M0
IIIA	T1, T2	N1a	M0
IIIA	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
IIIB	T2, T3	N2a	M0
IIIB	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
IIIC	T3, T4b	N2b	M0
IIIC	T4b	N1, N2	M0
IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

**Tabelle 3: Pathologische Stadieneinteilung des Rektumkarzinoms<sup>35</sup>**

<b>pT- Primärtumor</b>	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
pT1	Tumor infiltriert Submukosa
pT2	Tumor infiltriert Muscularis propria
pT3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perirektales Gewebe
pT4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen
pT4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum
pT4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
<b>pN- Regionäre Lymphknoten</b>	
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen (bei 12 untersuchten, tumorfreien Lymphknoten)
pN1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
pN1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
pN1b	Metastase in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
pN1c	Tumorknötchen bzw. Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
pN2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
pN2a	Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
pN2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

**Fortsetzung auf S. 10**

**Fortsetzung Tabelle 3:**

<b>pM- Fernmetastasen</b>	
pM0	Keine Fernmetastasen (nur bei Obduktion verwendbar)
pM1	Fernmetastasen
pM1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
pM1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Nach erfolgter Operation wird das Resektat vom Pathologen makroskopisch und mikroskopisch untersucht, dabei werden unter anderem Abstände des Tumors zu den Resektionsrändern berücksichtigt<sup>36</sup>. Histomorphologisch wird dann nach Einbettung des Präparates die yp-TNM Klassifikation bestimmt (Tab. 3, S. 9-10). Hierbei werden im Wesentlichen das T(umorstadium), sowie der N(odal)-Status (von mindestens 12 Lymphknoten) bestimmt<sup>36</sup>. Die Quantifizierung der (noch) vitalen Tumormasse erfolgt mittels des Regressionsgradings nach Dworak (Tab. 4<sup>37,38</sup>, S.10).

Das Regressionsgrading des primären Rektumkarzinoms nach Dworak wird folgendermaßen angewendet<sup>37,38</sup>:

**Tabelle 4: Tumorregressionsgrading nach Dworak<sup>37</sup>**

<b>Grad</b>	<b>Beschreibung</b>
Grad 0	Keine Regression
Grad 1	Prädominanz der Tumorzellen über die peritumorale Fibrose
Grad 2	Prädominanz der Fibrose über die Tumorzellen, diese jedoch in der Übersichtsvergrößerung mühelos erkennbar
Grad 3	Prädominanz der Fibrose mit nur wenigen nur in stärkerer Vergrößerung erkennbaren Tumorzellen
Grad 4	Kein vitaler Tumor, komplette Regression

## 2.5 Therapie

Nach erfolgtem Tumorstaging wird aktuell folgendermaßen verfahren: Patienten im UICC Stadium II und III, welches präoperativ klinisch ermittelt wurde (c-TNM), erhalten eine neoadjuvante Radiochemotherapie<sup>39,40</sup>. Auch Patienten im UICC Stadium IV mit resektablen Metastasen können bei kurativem Ansatz eine präoperative Radiochemotherapie erhalten, dies wird individuell entschieden. Ein Downstaging und/oder Downsizing wird eher durch eine konventionelle fünfwöchige Radiochemotherapie, als im Vergleich zur Behandlung mit einer Kurzzeitstrahlentherapie, erreicht<sup>41</sup>. Die neoadjuvante Radiochemotherapie umfasst eine fünfwöchige, werktägliche Bestrahlung der Tumorregion mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy mit 18 MeV Photonen am Linearbeschleuniger. Parallel erhalten die Patienten eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (FU) 225 mg/qcm als 24 Std. Dauerinfusion während des gesamten Bestrahlungszeitraums über einen venösen Port<sup>39</sup>. Bei dieser wird wie oben erwähnt 5-FU verabreicht, welches als Antimetabolit während der Replikation in die RNA aufgrund der Strukturähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen eingebaut wird und so aufgrund von entstandenen Strukturfehlern in dieser zur Hemmung der Proteinbiosynthese führt<sup>42</sup>. Daneben wirkt 5-Fluor-dUMP als Reaktionsprodukt von 5-FU hemmend auf die Thymidylat-Synthese, was in einer Inhibition der DNA-Synthese resultiert<sup>43</sup>. Zusätzlich wirkt 5-FU so auch als Radiosensitizer und verstärkt die Wirkung der Bestrahlung auf die Tumorzellen<sup>44</sup>. Das Chemotherapeutikum kann zusätzlich zur Strahlentherapie auch mikroskopische Tumorabsiedelungen wie Mikrometastasen in Lymphknoten beispielsweise zytotoxisch verändern und so eliminieren<sup>45</sup>. Die Strahlentherapie zielt weiterhin auf die Behandlung des soliden Tumors und gegebenenfalls des umliegenden Lymphabstromgebietes ab<sup>46</sup>. Ihre Wirkung beruht auf die durch Strahlen hervorgerufene Bildung freier Radikale, welche Strangbrüche der DNA der Tumorzellen induzieren. Diese gehen dann meist gezielt in die Apoptose, bzw. in andere Formen des Zelltods<sup>47</sup>. Generell ist die Zelle während der G2-Phase und der Mitose am empfindlichsten gegenüber der Strahlung<sup>48</sup>. Die Kombination von Radio- und Chemotherapie führt zu einer verminderten Reparaturfähigkeit, der im gesunden Gewebe ansteigenden Enzyme bei Replikationsschäden, womit die Strahlenempfindlichkeit noch zusätzlich gesteigert wird<sup>48</sup>. Vier bis sechs Wochen nach Beendigung der Therapie erfolgt die chirurgische Therapie mit kurativer Zielsetzung in

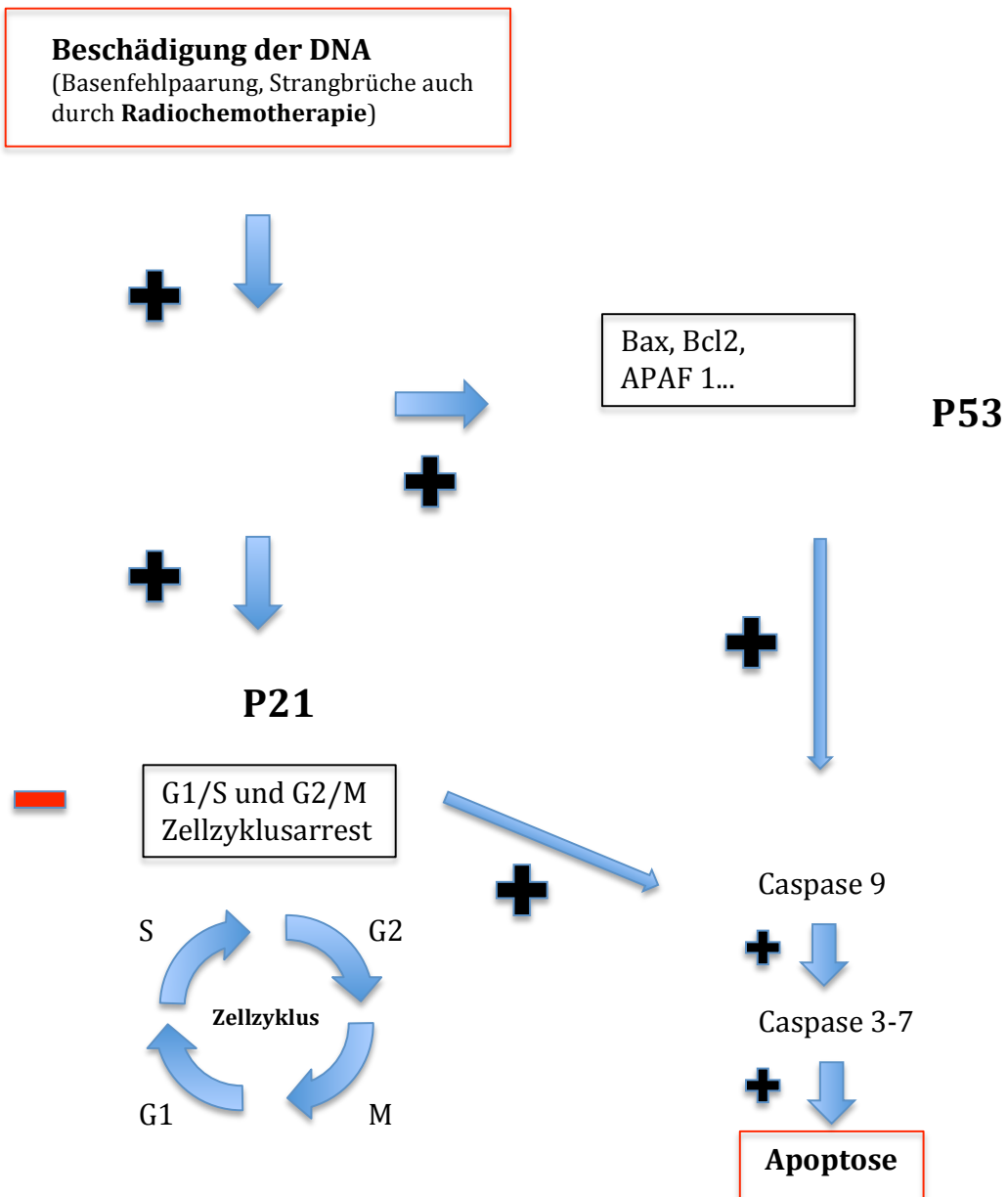


Form einer Rektumexstirpation oder einer anterioren Rektumresektion jeweils mit totaler mesorektaler Exzision<sup>39</sup>. Eine postoperative Chemotherapie wird derzeit unabhängig vom postoperativen Staging empfohlen<sup>39</sup>.

## 2.6 Prognosefaktoren/oder prognostische Marker und prädiktive Marker

Um Vorhersagen unter anderem hinsichtlich der Überlebensraten abschätzen zu können, werden verschiedene Prognosefaktoren berücksichtigt. So korreliert die Überlebensprognose mit dem Tumorregressionsgrading<sup>49,50</sup>, dem tumorfreien Resektionsrand<sup>51</sup> und dem yp-TNM-Stadium<sup>50</sup>. Zusätzlich spielt die Höhenlokalisierung des Rektumkarzinoms eine Rolle, da hiervon die Operationstechnik sowie die Qualität der Operation abhängen kann<sup>6,52</sup>. Der intra- und postoperative Verlauf der Operation trägt ebenfalls zur Prognose bei, hierbei sei die mögliche Anastomoseninsuffizienz erwähnt, welche die Prognose verschlechtern kann<sup>53</sup>.

Weiterhin können verschiedene Biomarker als prognostische Marker herangezogen werden: Hierzu gehören p53 und p21. Von diesen ist p53 ein sehr bekannter Marker und aufgrund seiner Funktion auch bekannt als „Wächter des Genoms“<sup>54</sup>. Das Gen liegt auf dem Chromosom 17 p13.1<sup>55</sup>. Das zugehörige p53 Protein besteht aus 393 Aminosäuren. Bei fehlerhafter DNA aufgrund von Doppelstrangbrüchen beispielsweise wird p53 stabilisiert und es kommt so zu einer Anhäufung des Proteins<sup>56</sup> (Abb. 1, S. 13). Diese führt zu einer Induktion von p21. Das p21-Gen liegt auf Chromosom 6 p21.2<sup>57</sup>. Sein zugehöriges Protein besteht aus 164 Aminosäuren<sup>58</sup>. Es initiiert den Zellzyklusarrest am Übergang von der G2 zur M-Phase und von der G1 zur S-Phase (Abb. 1, S. 13). p21 kann neben dieser auch andere Funktionen erfüllen. Währenddessen werden verschiedene Reparaturmechanismen in Gang gesetzt. Falls keine adäquate Reparatur möglich ist, wird über weitere Kaskaden die Apoptose der Zelle eingeleitet<sup>59,60</sup>. Die Caspase-3 wird als inaktive Pro-Caspase-3 von den vorgeschalteten Proteinen wie Caspase-8 und -9 durch proteolytische Spaltung aktiviert und reiht sich als aktive Form in die Kaskade ein und führt die Zelle schlussendlich ebenfalls in die Apoptose<sup>61-63</sup> (Abb. 1, S. 13).



**Abbildung 1: Zellzyklus, Checkpoints und Mechanismus der Apoptoseeinleitung (modifiziert nach <sup>64</sup>)**

Zu p53 gibt es viele, teils widersprüchliche Arbeiten. Seicean et al. fanden heraus, dass eine p53-Expression mit einer guten Prognose einhergeht, ebenso wie p21<sup>65</sup>. Kruschewski et al. schlagen vor, dass p53 vor allem in Abhängigkeit der p21-

Expression als prognostischer Marker herangezogen werden kann<sup>66</sup>. Dabei soll insbesondere die Kombination eines p53 positiven und p21 negativen Expressionsstatus eine positive Prognose voraussagen<sup>67</sup>. Dem gegenüber gehen andere davon aus, dass mittels p53-Expression keine Prognoseaussage getroffen werden kann<sup>68,69</sup>.

Neben diesen prognostischen Markern sind prädiktive Biomarker von Bedeutung. Im Unterschied zu den prognostischen Markern, welche am Resektat bestimmt werden, erfolgt die Untersuchung dieser präoperativ an der Biopsie und soll eine Vorhersage bezüglich des Ansprechens auf eine bestimmte Therapie<sup>70</sup> oder ein Medikament liefern. Im Rahmen des Rektumkarzinoms geht es hierbei um das Ansprechen auf die oben beschriebene neoadjuvante Radiochemotherapie. Hinsichtlich p53 gibt es auch hier widersprüchliche Studienergebnisse. Viele gehen von keiner Korrelation mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie aus<sup>71,72</sup>. Auch p21 wurde schon häufig in Studien als prädiktiver Marker getestet, ebenfalls mit diskrepanten Ergebnissen: Sim et al. halten eine hohe p21-Expression für einen schlechten Vorhersagewert bezüglich der neoadjuvanten Radiochemotherapie<sup>73</sup>, Kim et al. konnten keine Korrelation mit p21 feststellen<sup>74</sup> und Qiu et al. beschreiben eine positive Korrelation der p21-Expression mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie<sup>75</sup>. Wenn man die Expressionspattern der einzelnen Arbeiten betrachtet, werden hier unterschiedliche Muster beschrieben. So gilt das Augenmerk einerseits der Überexpression bzw. dem Fehlen des Proteins, andererseits wird oft nicht zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Expression unterschieden (Tab. 17, S. 74-76). Innerhalb einzelner Arbeiten werden diese unterschiedlichen Expressionspattern zumeist nicht miteinander hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Bedeutung verglichen bzw. nicht isoliert betrachtet. Weiterhin ist zu erwähnen, dass das Protein Caspase-3, dessen Regulation abhängig von p21 und p53 erscheint (Abb. 1, S. 13) bisher verhältnismäßig selten (insbesondere als prädiktiver Marker) untersucht wurde. Eine weitere Möglichkeit der Prädiktion ist die Verlaufskontrolle der Therapie mittels PET-CT. Sie verspricht eine bildgebende Möglichkeit der Vorhersage anhand des Tumorstoffwechsels<sup>76</sup>.

Die oben beschriebenen, teilweise widersprüchlichen Arbeiten liefern hinreichend Anlass dazu, systematisch zu untersuchen bzw. zu validieren, ob und in wie weit p21,

p53 und die Caspase-3 hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expressionsprofile als prädiktive Marker beim Rektumkarzinom geeignet sind.

## 2.7 Fragestellung

Eingebettet in klinische Daten wurde Tumormaterial von 128 Patienten konventionell-morphologisch und immunhistochemisch vor (Biopsie) und nach (Resektat) neoadjuvanter Radiochemotherapie vergleichend untersucht. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. In welchen Zellkompartimenten (zytoplasmatisch, nukleär, beide) lassen sich p21 und p53 beim Rektumkarzinom nachweisen?
2. Wo innerhalb des Tumors (intakte Zellen, Apoptosen, sog. „Schmutznekrosen“) lässt sich die Caspase-3 nachweisen?
3. Zeigen sich bei diesen Markern prä- und postoperative Unterschiede hinsichtlich der Expression in diesen Kompartimenten?
4. Lassen sich bei den genannten Markern (präoperative) Expressionspattern mit prädiktiver Relevanz nachweisen?
5. In wie weit korreliert die präoperative Expression von p21, p53 und der Caspase-3 mit der Tumorresponse, also dem Regressionsgrad nach Dworak?
6. Welchen Einfluss haben klinische Risikofaktoren wie Nikotinabusus und Adipositas auf das Ansprechen der neoadjuvanten Radiochemotherapie?
7. Inwiefern hängt das TNM-Stadium mit der Tumorresponse zusammen?

### **3. Material und Methode**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

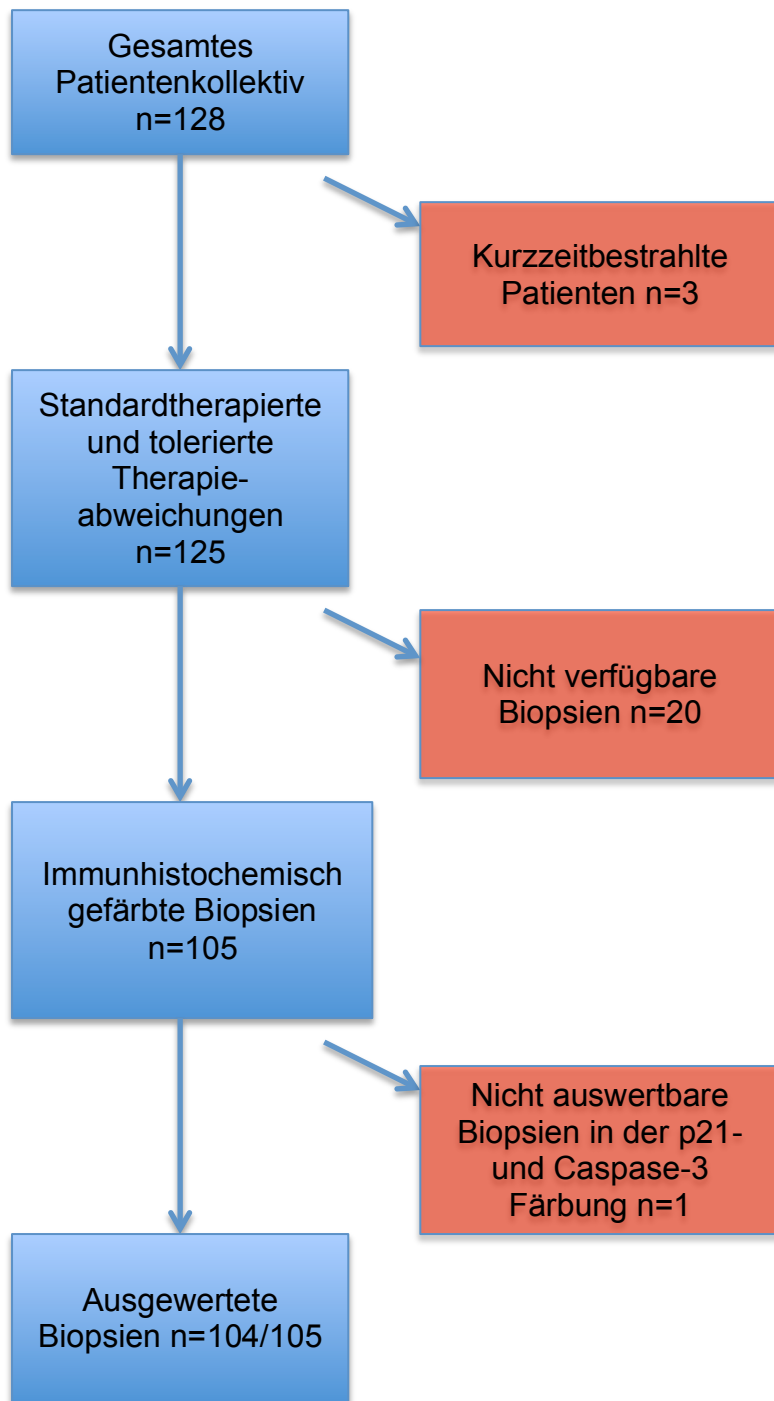
Die Analyse der präoperativen Biopsate wurde an Paraffinblöcken von Patienten durchgeführt, deren Biopsate im Jahr 2004 bis 2011 teils auf Stationen des Campus Benjamin Franklin (CBF), teils extern im Rahmen einer Rektoskopie entnommen wurden. Die Analyse der Resektate wurde an Paraffinblöcken von Patienten durchgeführt, deren Rektumkarzinome im Jahre 2004 bis 2011 in der Chirurgischen Klinik I des CBF reseziert wurden. Die Paraffin-Blöcke der präoperativen Biopsate wurden teils vom Institut für Pathologie des Campus Charité Mitte (CCM) sowie der Pathologie des CBF, als auch von externen pathologischen Praxen bereitgestellt.

Die Blöcke der Resektate wurden ausschließlich vom Institut für Pathologie des CCM und des CBF bereitgestellt. Von den präoperativen Biopsaten, sowie von den Resektaten wurden histologische Schnitte angefertigt, diese wurden mittels Hämatoxylin/Eosin (H&E) gefärbt. Die histologischen Schnitte der präoperativen Biopsate und der Resektate wurden weiterhin immunhistochemisch mittels anti-p53 und anti-p21 und anti-Caspase-3 gefärbt (Details siehe unten).

Anschließend erfolgte nach der mikroskopischen Auswertung die statistische Datenauswertung.

#### **3.2 Patientenkollektiv (Abb. 2, S. 17)**

Das Patientenkollektiv umfasst insgesamt 128 Patienten. Die immunhistochemische Expressionsanalyse erfolgte an Biopsaten und Rektumresektaten von 104 bzw. 105 Patienten, die im Zeitraum von 2004 bis 2011 in der Chirurgischen Klinik des CBF in Berlin operiert wurden.



**Abbildung 2: Darstellung der ausgewählten Patienten und auswertbaren Biopsien**

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden neoadjuvant mit einer Radiochemotherapie behandelt. Diese umfasste standardmäßig eine fünfwöchige, werktägliche Bestrahlung der Tumorregion mit einer Einzeldosis von 1,8 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy mit 18 MeV Photonen am Linearbeschleuniger. Parallel

erhielten die Patienten eine Chemotherapie mit 5-FU (5-Fluoruracil) 225 mg/qcm als 24 Std. Dauerinfusion während des gesamten Bestrahlungszeitraums über einen venösen Port. Ein Teil der Patienten erhielt eine geringfügig veränderte neoadjuvante Therapie. Toleriert wurden dabei kurze Therapieunterbrechungen wegen Infekten oder Unverträglichkeiten und geringfügige Abwandlungen der Chemo- und Strahlentherapie.

### 3.3 Patientenauswahl (Abb. 2, S. 17)

Ein- und Ausschlusskriterien: Vor der immunhistochemischen Untersuchung wurden bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt. In das Patientenkollektiv wurden Patienten aufgenommen, die eine neoadjuvante Radiochemotherapie erhielten. Diese Therapie erhielten Patienten, die präoperativ mittels MRT, Endosonographie und /oder CT als UICC Stadium II und III klassifiziert wurden. In Ausnahmefällen lag ein Stadium IV vor (n=11, siehe unten). Bei einem UICC Stadium IV wird die Therapie individuell bestimmt und eine präoperative Radiochemotherapie kann aufgrund der individuellen Situation durchgeführt werden. Im Anschluss an diese Therapie erfolgte 4-8 Wochen später die chirurgische Exzision.

Als Ausschlusskriterium wurde eine ausschließliche Kurzzeitbestrahlung festgelegt (n=3) (Abb. 2, S. 17).

### 3.4 Anfertigung der Schnittpräparate

Die Resektatgewebelöcke und Biopsatgewebelöcke wurden teils vom Institut für Pathologie des CCM sowie des CBF der Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt, einige Biopsatgewebelöcke wurden von externen Praxen zur Verfügung gestellt. Das Biopsatgewebe wurde zunächst in 4%-Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die in Formalin übersandten Rektumresektate wurden ebenfalls in 4%-Formalin fixiert, leitliniengerecht zugeschnitten und in Paraffin eingebettet. Pro Resektat wurden mehrere Tumorblöcke angefertigt. Von allen Blöcken wurden 3-5 µm breite histologische Schnitte angefertigt und mittels H&E gefärbt. Anhand dieser wurde der Block des Resektats mit dem größten Anteil an Tumorgewebe ermittelt. Von diesem Block, sowie von dem dazugehörigen tumorfreien Block mit unauffälliger Darmmucosa und den Biopsatgewebelöcken wurden weitere 3-5 µm breite histologische Schnitte angefertigt für die immunhistochemischen Färbungen. Das Schneiden der Blöcke

erfolgte mit dem Mikrotom, anschließend wurden die Schnitte auf einen gläsernen Objektträger appliziert, getrocknet, gefärbt und eingedeckelt.

### 3.5 Immunhistochemie

#### 3.5.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Geräte:

- Ventana Benchmark XT IHC/ISH Färbemodul (Ventana)
- Mikrotom Typen: Schlittenmikrotom pfm Slide 2003, Rotationsmikrotom Leica RM2235
- Eindeckmaschine DAKO coverslipper

Chemikalien/Reagenzien:

- Primäre Antikörper:
  - anti-p21WAF1 (Thermo Scientific CDS-60.2 # MAS-12764, monoklonal Ig2G2a der Maus)
  - anti-p53 (DAKO Clone DO-7 M 7001 monoklonal, IgG2b kappa der Maus)
  - anti-Caspase 3 (Zytomed Systems RBK009-05 polyklonal, Ig des Kaninchens)
- Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, (Dako K5005)
- Xylol (Carl Roth)
- Ethanol, vergällt (Carl Roth)
- Citronensäure Monohydrat (Carl Roth)
- Hämatoxylin (Carl Roth)
- Kaisers Glyceringelatine (Merck)
- EZPrep. Lösung (Ventana)



- Coverslip Lösung LCS (Ventana)
- Cell Conditioner Nr.1 (Ventana)
- Reaktionspuffer (Ventana)
- Ultraview Universal DAB Inhibitor (Ventana)
- Ultraview DAB (Ventana)
- Ultraview DAB H2O2 (Ventana)
- Ultraview COPPER (Ventana)
- Hematoxylin, Bluing Reagent (Ventana)
- Eindeckmedium PARAmount (ProTaqS)

### 3.5.2 Färbung mittels p21-Antikörper

Die Entparaffinierung der ungefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit Xylol, die Rehydratation in der Ethanol Verdünnungsreihe (Chemikalien von Carl Roth). Die Antigen-Demaskierung der Gewebeschnitte wurde 5 min lang im Schnellkochtopf mittels Citrat-Puffer (pH 6,0) vorgenommen. Anschließend wurde der primäre Antikörper anti-p21WAF1 (Thermo Scientific CDS-60.2 # MAS-12764 monoklonal Ig2G2a der Maus) mit der Verdünnung 1:50 für 1,5 h appliziert. Die rote Farbentwicklung erfolgte über das Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse. Abschließend wurde die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin (Carl Roth) vorgenommen und die Schnitte per Hand in Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

### 3.5.3 Färbung mittels p53-Antikörper

Die Färbung erfolgte im Ventana BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul unter Verwendung des XT ultraview DAB v3 Kits. Die Coverslip Lösung LCS (Ventana) wurde zur Isolation der wässrigen Reagenzien verwendet. Die Entparaffinierung wurde mit der EZPrep. Lösung (Ventana) bei max. 76 C° vorgenommen. Die Antigen-demaskierung erfolgte mit dem Cell Conditioner Nr.1 (Ventana) bei max. 100 °C über 60 min. Es folgte

ein Zwischenschritt mit Ultraview Universal DAB Inhibitor (Ventana). Der primäre Antikörper p53 (DAKO M 7001) (Clone DO-7 M 7001 monoklonal IgG2b kappa der Maus) wurde mit der Verdünnung 1:50 manuell appliziert und 32 min bei 37 °C inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte über das Ultraview Universal DAB (Diaminobenzidin) HRP Multimer (Ventana) mit Ultraview DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und COPPER (Ventana). Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin und Bluing reagent (Ventana). Die gefärbten Schnitte wurden im Dako Coverslipper eingedeckelt unter Verwendung des PARAmount Eindeckmediums.

#### 3.5.4 Färbung mittels Caspase-3-Antikörper

Die Färbung erfolgte im Ventana BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul Automaten unter Verwendung des XT ultraview DAB v3 Kits. Der primäre Antikörper anti-caspase-3 (Zytomed Systems RBK009-05 polyklonal, Ig des Kaninchen) wurde mit der Verdünnung 1:100 manuell appliziert und 32 min bei 37 °C inkubiert. Das Färbeprotokoll entspricht im Übrigen dem Färbeprotokoll für p53, im Unterschied dazu erfolgte die Antigendemaskierung bei max. 100 °C über 30 min.

#### 3.5.5 Durchführung

Nach Abschluss der Färbungen wurden zunächst alle Biopsate anhand der H&E Färbung auf das Vorliegen von invasivem Tumorwachstum überprüft und das Grading wurde anhand der aktuellen WHO Kriterien bestimmt<sup>34</sup>. Die Auswertung der p21- und p53-Färbungen der Biopsate erfolgte quantitativ und es wurde zwischen nukleärer und/oder zytoplasmatischer positiver Färbung unterschieden. Die Auswertung der mittels Caspase-3-gefärbten Biopsate erfolgte teilweise auch quantitativ. Hier wurden die gefärbten Apoptosen und die gefärbten intakten Zellen quantitativ ausgewertet. Zusätzlich wurden sogenannte „Schmutznekrosen“<sup>77</sup> semiquantitativ ausgewertet, d.h. Ansammlungen von apoptotischem Zelldebris in den neoplastischen Drüsenlumina. Die Einteilung erfolgte auf einer Skala von null bis zwei. Null bedeutete keine gefärbten „Schmutznekrosen“, eins bedeutete wenige gefärbte „Schmutznekrosen“ und zwei bedeutete viele gefärbte „Schmutznekrosen“.

Die Resektate wurden zunächst anhand der Hämatoxylin/Eosin Färbung auf den verbliebenen Anteil an Resttumor im Verhältnis zur Regression quantitativ bewertet. Zusätzlich wurde das übliche Regressionsgrading nach Dworak vorgenommen<sup>37</sup>. Anschließend wurden auch die Resektate wie die Biopsate auf ihre p21- und p53-Färbung hin quantitativ ausgewertet und es wurde ebenfalls zwischen nukleärer und zytoplasmatischer positiver Färbung unterschieden. Die Auswertung der mittels Caspase-3-gefärbten Resektate erfolgte teilweise auch quantitativ. Hier wurden die gefärbten Apoptosen und die gefärbten intakten Zellen ausgezählt. Zusätzlich wurden die gefärbten „Schmutznekrosen“ semiquantitativ in der Einteilung null bis zwei ausgewertet. Null bedeutete keine gefärbten „Schmutznekrosen“, eins bedeutete wenige gefärbte „Schmutznekrosen“ und zwei bedeutete viele gefärbte „Schmutznekrosen“.

Alle Auswertungen erfolgten ohne Kenntnis des klinischen Verlaufs. Alle Präparate wurden von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet, größere Abweichungen in der Auswertung wurden am Mehrbetrachtermikroskop diskutiert und ein Konsens gefunden.

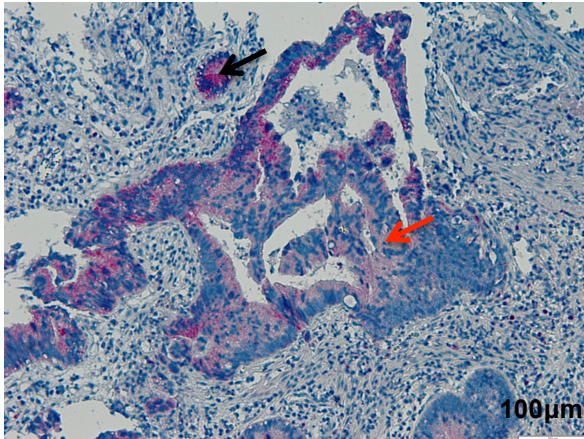
### 3.6 Mikroskopische Auswertung

#### 3.6.1 Biopsate

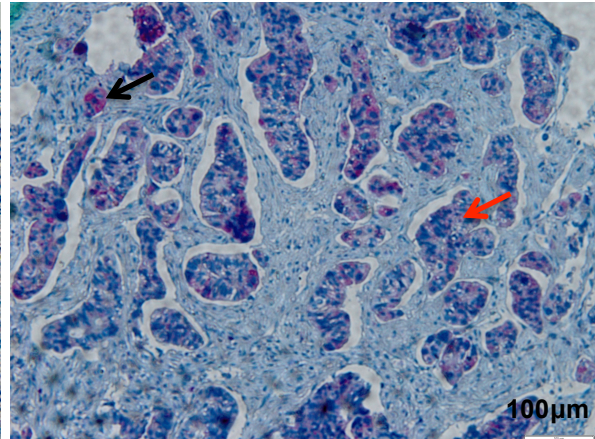
Alle Biopsate wurden zunächst anhand der H&E Färbung auf das Vorliegen eines invasiven Karzinoms überprüft. Anschließend wurde der Differenzierungsgrad des Karzinoms nach WHO Kriterien<sup>34</sup> bestimmt und mit einem Grading versehen wie folgt: Grad I beschreibt einen gut differenzierten Tumor, der zu >95% drüsig aufgebaut ist, Grad II beschreibt einen mäßig differenzierten Tumor mit 50-95% drüsigem Aufbau und Grad III entspricht einem schlecht differenzierten Tumor in welchem zu 0-49% drüsige Anteile vorliegen, Grad IV entspricht nach WHO einem undifferenzierten Tumor.

Daraufhin wurden die immunhistochemisch gefärbten Präparate ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Bei den beiden Färbungen mittels anti-p-21 und anti-p-53 wurde eine quantitative Auswertung auf einer Skala von 1-100% vorgenommen. Als positiv wurden alle deutlich gefärbten Tumorzellen gewertet, dabei wurde zwischen nukleärer (p21: Abb. 3c/3d S. 23, p53: Abb. 4a S. 24) und zytoplasmatischer (p21: Abb. 3a/3b S. 23, p53: Abb. 4b S. 24) Färbung unterschieden. Zum Vergleich wurde an

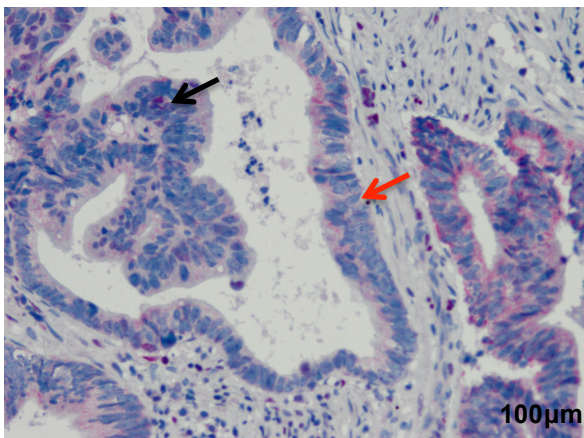
jedem Präparat gesunde Darmschleimhaut und deren Färbung begutachtet als interne Kontrolle. Die Anzahl an gefärbten Tumorzellen wurde ausgezählt: Dabei wurden, sofern vorhanden 3x 100 Tumorzellen und davon der Anteil an gefärbten Tumorzellen gezählt, bzw. geschätzt. Teilweise trat ein sogenannter Randeffect<sup>78</sup> auf, dieser wurde nicht bei der Zählung berücksichtigt, ebenso wie Artefakte im Präparat. Gewertet wurden nur homogen gefärbte Bereiche des invasiven Tumoranteils.



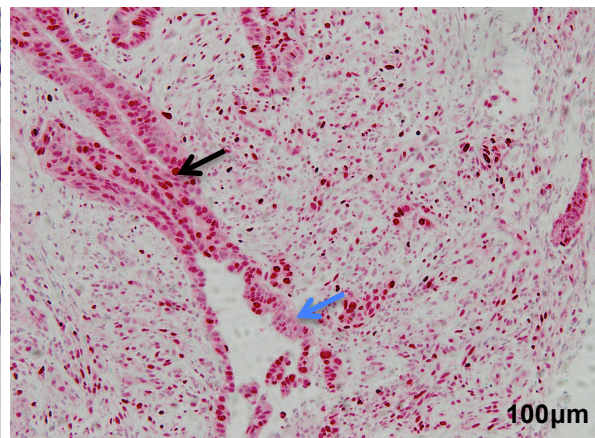
**Abbildung 3a: Invasiver Tumoranteil, viele zytoplasmatisch p21-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: gefärbtes Zytoplasma**



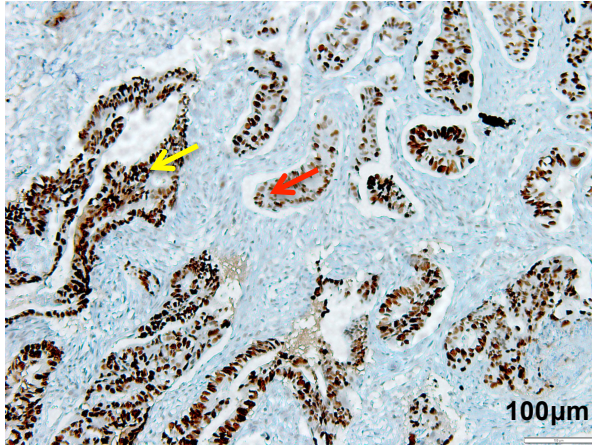
**Abbildung 3b: Invasiver Tumoranteil, wenige zytoplasmatisch p21-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: gefärbtes Zytoplasma**



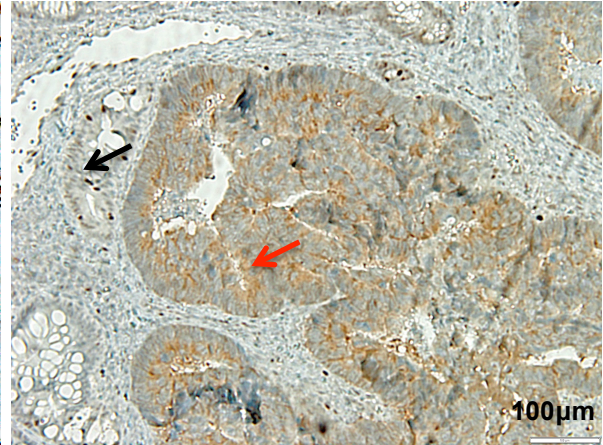
**Abbildung 3c: Invasiver Tumoranteil, wenige nukleär p21-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbte Nuklei, schwarzer Pfeil: gefärbte Nuklei**



**Abbildung 3d: Invasiver Tumoranteil, viele nukleär p21-gefärbte Tumorzellen, blauer Pfeil: ungefärbte Nuklei, schwarzer Pfeil: gefärbte Nuklei**

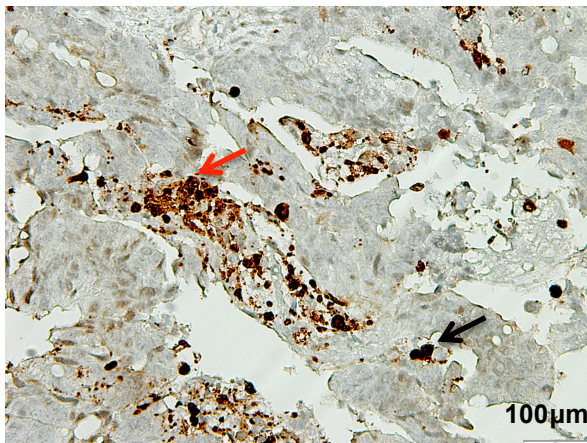


**Abbildung 4a: Invasiver Tumoranteil, viele nukleär p53-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbte Nuklei, gelber Pfeil: gefärbte Nuklei**

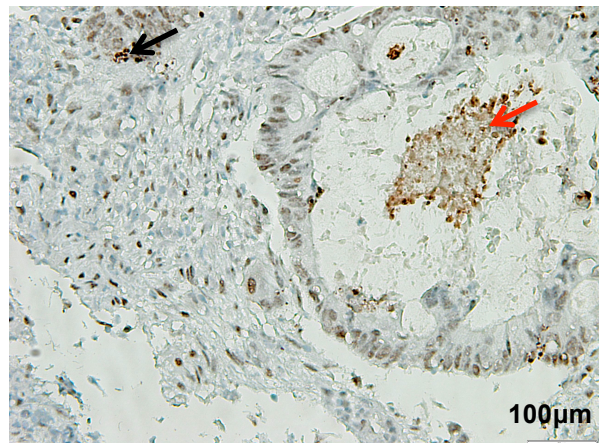


**Abbildung 4b: Invasiver Tumoranteil, viele zytoplasmatisch p53-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: gefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma**

Die mittels anti-Caspase-3-gefärbten Präparate wurden teils quantitativ, teils semiquantitativ ausgewertet. Die gefärbten Apoptosen (Abb. 5a/5b, S. 24) und intakten Zellen (Abb. 5a, S. 24) wurden quantitativ auf einer Skala von 1-100% ausgezählt, die Anzahl der „Schmutznekrosen“<sup>77</sup> wurde semiquantitativ geschätzt. Hierbei wurde von null bis zwei unterschieden, wobei null keine „Schmutznekrosen“, eins wenige „Schmutznekrosen“ und zwei viele „Schmutznekrosen“ im Präparat bedeutete (Abb. 5b, S. 24). Auch hier wurden nur gefärbte Bereiche des invasiven Tumoranteils gewertet.



**Abbildung 5a: Invasiver Tumoranteil, viele Caspase-3 gefärbte Apoptosen und intakte Zellen, roter Pfeil: gefärbte Apoptosen, schwarzer Pfeil: gefärbte intakte Zellen**



**Abbildung 5b: Invasiver Tumoranteil, wenige Caspase-3 gefärbte Apoptosen, viele gefärbte „Schmutznekrosen“, keine gefärbten intakten Zellen, schwarzer Pfeil: gefärbte Apoptosen, roter Pfeil: gefärbte „Schmutznekrosen“**

### 3.6.2 Expressionsgradeinteilung der Biopsate

Der Expressionsgrad der p53- und p21-gefärbten Biopsien wurde sowohl bei der zytoplasmatischen als auch bei der nukleären Auswertung quantitativ auf einer Skala von 1-100% bestimmt. Die Anzahl der intakten Zellen und der Apoptosen der Caspase-3-gefärbten Biopsien wurde ebenfalls quantitativ auf einer Skala von 1-100% bestimmt. Bei jedem Präparat wurden 3x 100 Tumorzellen (sofern vorhanden) ausgezählt und der Anteil an gefärbten Zellen davon ermittelt. Falls weniger Tumorzellen zu finden waren, wurden die gefärbten Tumorzellen anteilig geschätzt. Der Anteil an Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ wurde semiquantitativ im Intervall von null bis zwei geschätzt.

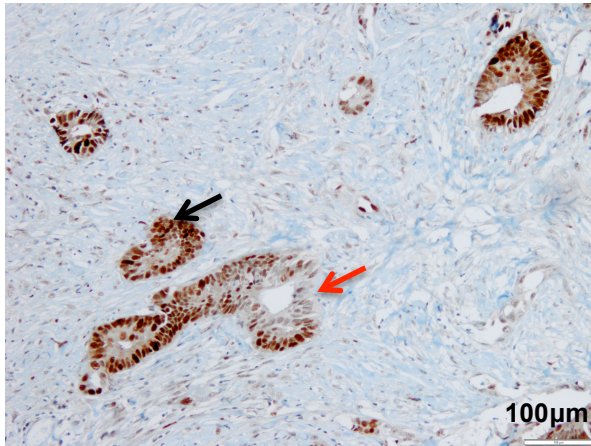
### 3.6.3 Resektate

Alle Resektate wurden zunächst mittels H&E gefärbt. Anhand dieser Färbung wurde ihr Regressionsgrad nach Dworak auf der Skala von eins bis vier bestimmt. Um statistische Prognosen erstellen zu können wurden alle Fälle, die nach Dworak mit eins und zwei bewertet wurden als „Non-Responder“ gewertet, alle Fälle die nach Dworak mit drei und vier bewertet wurden als „Responder“, in Anlehnung an diverse vorherige Arbeiten<sup>79-82</sup>.

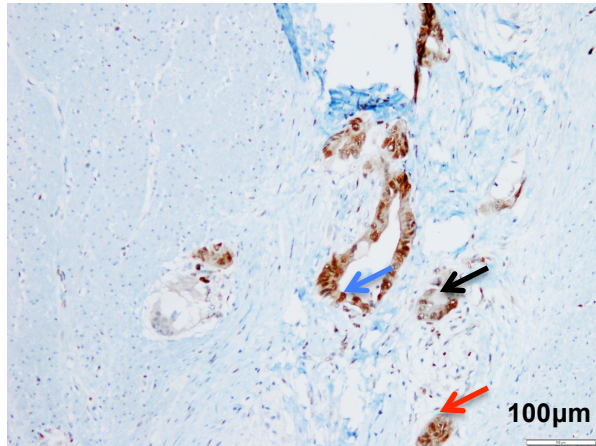
Außerdem wurden alle immunhistochemisch gefärbten Resektate, d.h. Resektate, die nach Dworak zwischen eins bis drei bewertet wurden, hinsichtlich ihres immunhistochemischen Expressionsgrades ausgewertet. Nicht immunhistochemisch gefärbt, wurden alle tumorfreien Resektate, die laut Dworak mit einer vier bewertet wurden, da diese keinen Tumor mehr enthalten.

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden ohne die Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Bei beiden Färbungen, p-21 wie p-53 wurde eine quantitative Auswertung auf einer Skala von 1-100% vorgenommen. Als positiv wurden alle deutlich gefärbten Tumorzellen gewertet, dabei wurde zwischen nukleärer (Abb. 5 a/b, 6 a/b, S. 26) und zytoplasmatischer (Abb. 5b, 6 a/b, S. 26) Färbung unterschieden. Zum Vergleich wurde an jedem Präparat gesunde Darmschleimhaut und deren Färbung begutachtet als interne Kontrolle. Bei jedem Präparat wurden 3x 100 Tumorzellen (sofern vorhanden) ausgezählt und der Anteil an gefärbten Zellen davon ermittelt. Falls weniger Tumorzellen zu finden waren, wurden die gefärbten Tumorzellen anteilig

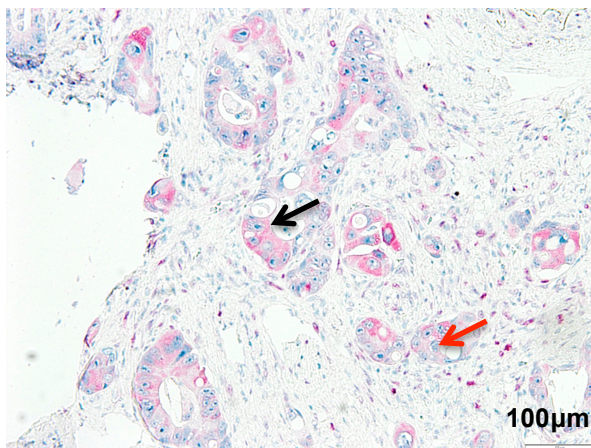
geschätzt. Teilweise trat ein sogenannter "Randeffekt"<sup>78</sup> auf, dieser wurde nicht bei der Zählung berücksichtigt, ebenso wie Artefakte im Präparat. Gewertet wurden nur homogen gefärbte Bereiche des invasiven Tumoranteils.



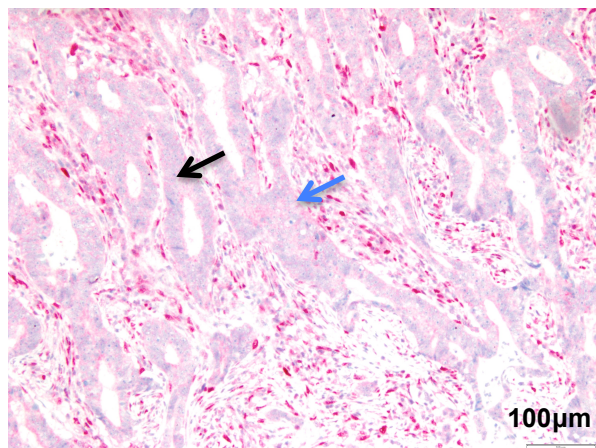
**Abbildung 5a:** Invasiver Tumoranteil, viele nukleär p53-gefärbte Tumorzellen, keine zytoplasmatisch p53-gefärbten Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbte Nuklei, schwarzer Pfeil: gefärbte Nuklei



**Abbildung 5b:** Invasiver Tumoranteil, viele zytoplasmatisch p53-gefärbte Tumorzellen, wenige nukleär p53-gefärbte Tumorzellen, roter Pfeil: gefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma, blauer Pfeil: gefärbte Nuklei



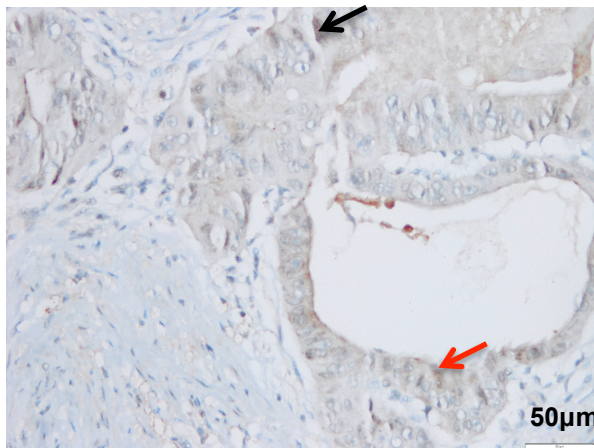
**Abbildung 6a:** Invasiver Tumoranteil, viele zytoplasmatisch p21- gefärbte Tumorzellen, keine nukleär p21-gefärbten Tumorzellen, roter Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: gefärbtes Zytoplasma



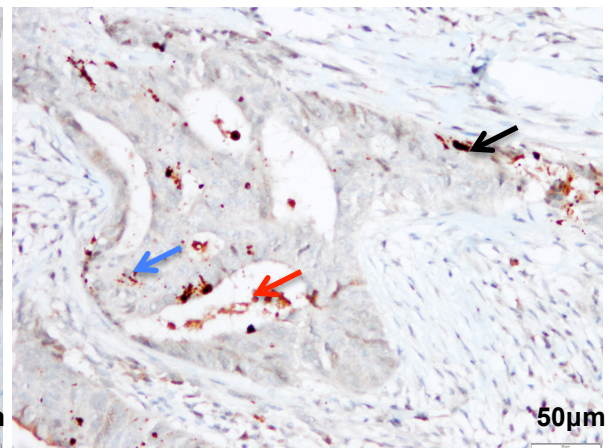
**Abbildung 6b:** Invasiver Tumoranteil, keine zytoplasmatisch p21-gefärbten Tumorzellen, keine nukleär p21-gefärbten Tumorzellen, blauer Pfeil: ungefärbtes Zytoplasma, schwarzer Pfeil: ungefärbte Nuklei

Die mittels Caspase-3 gefärbten Präparate wurden teils quantitativ, teils semiquantitativ ausgewertet. Die gefärbten Apoptosen (Abb. 7a/b, S. 27) und intakten Zellen (Abb.

7a/b, S. 27) wurden quantitativ auf einer Skala von 1-100% ausgezählt, die Anzahl der „Schmutznekrosen“<sup>77</sup> wurde semiquantitativ geschätzt (Abb. 7b, S. 27). Hierbei wurde von null bis zwei unterschieden, wobei null keine gefärbten „Schmutznekrosen“, eins wenige gefärbte „Schmutznekrosen“ und zwei viele gefärbte „Schmutznekrosen“ im Präparat bedeutete. Auch hier wurden nur gefärbte Bereiche des invasiven Tumoranteils gewertet.



**Abbildung 7a:** Invasiver Tumoranteil, keine Caspase-3 gefärbten Apoptosen und intakten Zellen, roter Pfeil: ungefärbte Apoptosen, schwarzer Pfeil: ungefärbte intakte Zellen



**Abbildung 7b:** Invasiver Tumoranteil, viele Caspase-3 gefärbte Apoptosen, intakte Zellen und „Schmutznekrosen“, blauer Pfeil: gefärbte Apoptosen, schwarzer Pfeil: gefärbte intakte Zellen, roter Pfeil: gefärbte „Schmutznekrosen“

### 3.6.4 Expressionsgradeinteilung der Resektate

Der Expressionsgrad der p53- und p21-gefärbten Biopsien wurde sowohl bei der zytoplasmatischen als auch bei der nukleären Auswertung quantitativ auf einer Skala von 1-100% bestimmt. Die Anzahl der intakten Zellen und der Apoptosen der Caspase-3-gefärbten Biopsien wurde ebenfalls quantitativ auf einer Skala von 1-100% bestimmt. Bei jedem Präparat wurden 3x 100 Tumorzellen (sofern vorhanden) ausgezählt und der Anteil an gefärbten Zellen davon ermittelt. Falls weniger Tumorzellen zu finden waren, wurden die gefärbten Tumorzellen anteilig geschätzt. Der Anteil an Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ wurde semiquantitativ im Intervall von null bis zwei geschätzt.



### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS-Programm. Der Chi-Quadrat-Test wurde angewendet um die standardtherapierten Patienten mit den leicht abweichend therapierten Patienten zu vergleichen. Um die Entwicklung des Expressionsstatus von p21 und der Caspase-3 unter neoadjuvanter Radiochemotherapie darzustellen, d.h. den Expressionsstatus jedes einzelnen Patienten zwischen der Biopsie und dem Resektat zu vergleichen wurde der Wilcoxon-Rank-Test angewendet. Eine mögliche Korrelation zwischen Expressionsstatus und Tumorresponse wurde mittels Mann-Whitney-Test berechnet. Das TNM-Stadium und klinische Parameter wurden mit der Tumorresponse mittels Chi-Quadrat-Test korreliert, ebenso wie die Cut Off's von 1% und 5% der nukleären p21-Färbung der Biopsien mittels Chi-Quadrat-Test mit der Tumorresponse korreliert wurden. Für die multivariate Analyse bezüglich der Response wurde die binäre logistische Regression angewendet. Das Signifikanzniveau wurde, wie üblich, bei  $p < 0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

Das gesamte Patientenkollektiv umfasst eine Patientenanzahl von n=128, davon 88 (69%) männliche und 40 (31%) weibliche Patienten. Der Altersmedian lag zu Beginn der neoadjuvanten Radiochemotherapie bei 65 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag zu Beginn der neoadjuvanten Radiochemotherapie bei 64 Jahren (Range: 33- 85 Jahre). Statistisch ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie zwischen Patienten, die eine Standardtherapie erhielten und Patienten mit modifiziertem Therapieschema, wobei kurzzeitbestrahlte Patienten (n=3) hierbei ausgeschlossen wurden (Tab. 6, S. 28):

**Tabelle 6: Vergleich zwischen der Standardtherapie und allen abweichenden Therapieformen in Bezug auf die Response (p=0,406) (n=125) (angewandter statistischer Test: Chi-Quadrat-Test)**

Therapieform	„Non-Responder“	„Responder“	p-Wert
Standardtherapie	53	28	p=0,406
abweichende Therapie	32	12	

Das prätherapeutische klinisch ermittelte TNM-Stadium der Patienten verhielt sich wie folgt (Tab. 7, S. 30):

**Tabelle 7: Verteilung der klinischen TNM-Stadieneinteilung innerhalb des Patientenkollektivs (n=128)**

TNM		Anzahl	Häufigkeit
T-Kategorie	2	6	4,7%
	2 bis 3	3	2,3%
	3	89	69,5%
	3 bis 4	8	6,3%
	4	20	15,6%
	keine Angaben	2	1,6%
N-Kategorie	0	18	14,1%
	1	91	71,1%
	2	14	10,9%
	3	1	0,8%
	keine Angaben	4	3,1%
M-Kategorie	0	116	90,6%
	1	11	8,6%
	keine Angaben	1	0,8%

Bei einem Patienten konnte kein TNM-Stadium der Akte entnommen werden, bei einem weiteren konnte die T-Kategorie nicht ermittelt werden, sowie bei drei weiteren Patienten die N-Kategorie. Aus dem prätherapeutischen TNM-Stadium ergibt sich folgende Verteilung der UICC-Klassifikation auf das Patientengut:

16 Patienten entsprechen dem UICC-Stadium II (negativer Lymphknotenbefund bei Stadium T3, T4). 96 Patienten entsprechen dem UICC-Stadium III (positiver

Lymphknotenbefund). 11 Patienten entsprechen dem UICC-Stadium IV (positiver Metastasenbefund). Bei fünf Patienten konnte keine UICC-Klassifizierung vorgenommen werden, aufgrund von nicht ermittelbaren bzw. nicht vorliegenden klinischen Daten.

Die entnommenen Biopsien der Patienten lassen sich hinsichtlich ihrer prätherapeutischen Differenzierung folgendermaßen klassifizieren (Tab. 8, S. 31):

**Tabelle 8: Verteilung des Gradings der prätherapeutischen Biopsien innerhalb des Patientenkollektivs (n=109)**

Differenzierungsgrad	Anzahl	Häufigkeit
1: gut	6	5,5%
2: mäßig	93	85,3%
3: schlecht	9	8,3%
4: entdifferenziert	1	0,9%

19 Biopsien konnten nicht mit einem prätherapeutischen Grading versehen werden, lagen nicht vor bzw. wurden von der Analyse ausgeschlossen. Nach erfolgter Operation wurden weitere histopathologische Klassifizierungen vorgenommen.

Alle Resektate wurden mittels Dworak-Grading hinsichtlich ihrer Tumorregression bewertet (Tab. 9, S. 31):

**Tabelle 9: Verteilung des Tumorregressionsgradings nach Dworak innerhalb des Patientenkollektivs (n=125)**

Regressionsgrad nach Dworak	Anzahl	Häufigkeit
1	17	13,6%
2	68	54,4%
3	19	15,2%
4	21	16,8%

Des Weiteren wurden alle Resektate nach der yp-TN-Kategorie und der posttherapeutischen M-Kategorie klassifiziert (Tab. 10, S. 32):

**Tabelle 10: Verteilung der postoperativen yp-TN-Kategorien und der M-Kategorie innerhalb des Patientenkollektivs (n=125)**

TNM		Anzahl	Häufigkeit
ypT-Kategorie	0	21	16,8%
	1	8	6,4%
	2	32	25,6%
	3	57	45,6%
	4	7	5,6%
yp N-Kategorie	0	84	67,2%
	1	31	24,8%
	2	10	8,0%
p/cM-Kategorie	0	113	90,4%
	1	12	9,6%

Klinische Daten wurden den Anamnesebögen der Patientenakten entnommen. Hierbei ergaben sich folgende Häufigkeiten hinsichtlich Nikotinabusus, in der Vergangenheit liegender Nikotinabusus, Alkoholabusus, Adipositas, Diabetes, koronarer Herzkrankheit, Niereninsuffizienz und Hypertonie (Tab. 11, S. 33):

**Tabelle 11: Verteilung der Patientendaten (Nebendiagnosen) innerhalb des Patientenkollektivs (n=128)**

Klinische Daten (Nebendiagnosen)	Anzahl	Häufigkeit
Nichtrauer	76	59,4%
<b>Nikotinabusus</b>	21	16,4%
<b>Vergangener Nikotinabusus</b>	28	21,9%
Keine Angaben	3	2,4%
Nichtalkoholiker	115	89,8%
<b>Früherer Alkoholabusus</b>	2	1,6%
<b>Alkoholabusus</b>	10	7,8%
Keine Angaben	1	0,8%
Nichtdiabetiker	110	85,9%
<b>Diabetiker</b>	17	13,3%
Keine Angaben	1	0,8%
Herzgesunde	115	89,8%
<b>Koronare Herzerkrankte</b>	11	8,6%
Keine Angaben	2	1,6%
Nierengesunde	118	92,2%
<b>Niereninsuffiziente</b>	9	7%
Keine Angaben	1	0,8%
Normaler Blutdruck	82	64,1%
<b>Hypertoniker</b>	45	35,2%
Keine Angaben	1	0,8%
Normalgewichtige	63	49,2%
Präadipöse	51	39,8%
<b>Adipöse</b>	13	10,2%
Keine Angaben	1	0,8%

#### 4.2 Immunhistochemische Expressionsanalyse

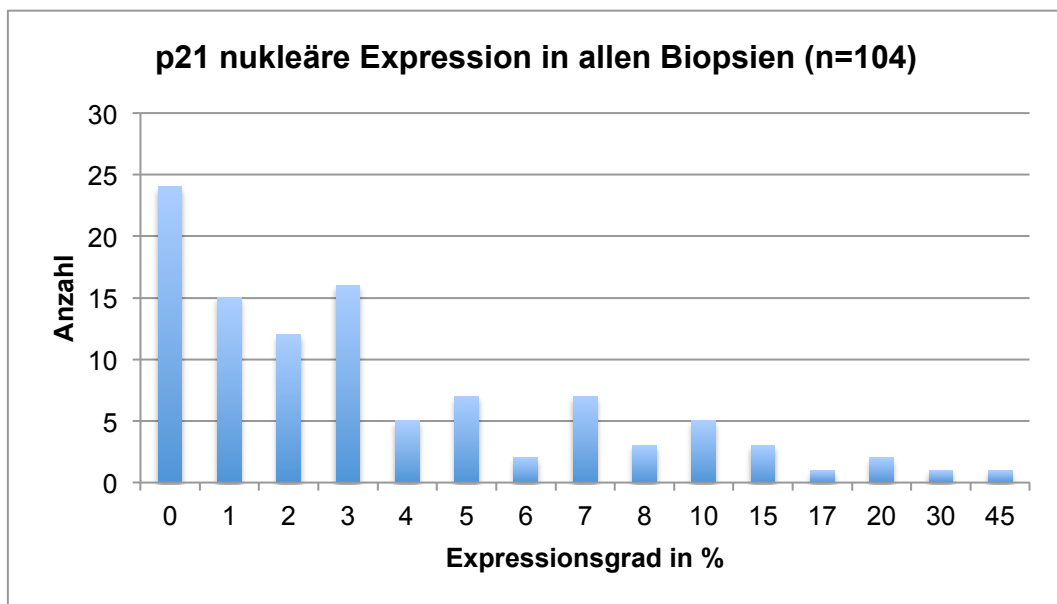
Die immunhistochemische Expressionsanalyse erfolgte an insgesamt 104 Biopsien (Färbung mittels p21 und der Caspase-3) und 105 Biopsien (Färbung mittels p53). Bei allen Patientenfällen wurden sowohl die Biopsie als auch das Resektat des

Rektumkarzinoms gefärbt und ausgewertet, sofern vorhanden und auswertbar. Bei den Resektaten traf dies für 94 Resektate (p21 und p53 Färbung) und 89 Resektate (Caspase-3 Färbung) zu. Die Auswertung der p53-, p21- (Unterscheidung zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Auswertung) und Caspase-3- (Unterscheidung zwischen intakten Zellen und Apoptosen) gefärbten Präparaten erfolgte quantitativ, die Auswertung der Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ semiquantitativ.

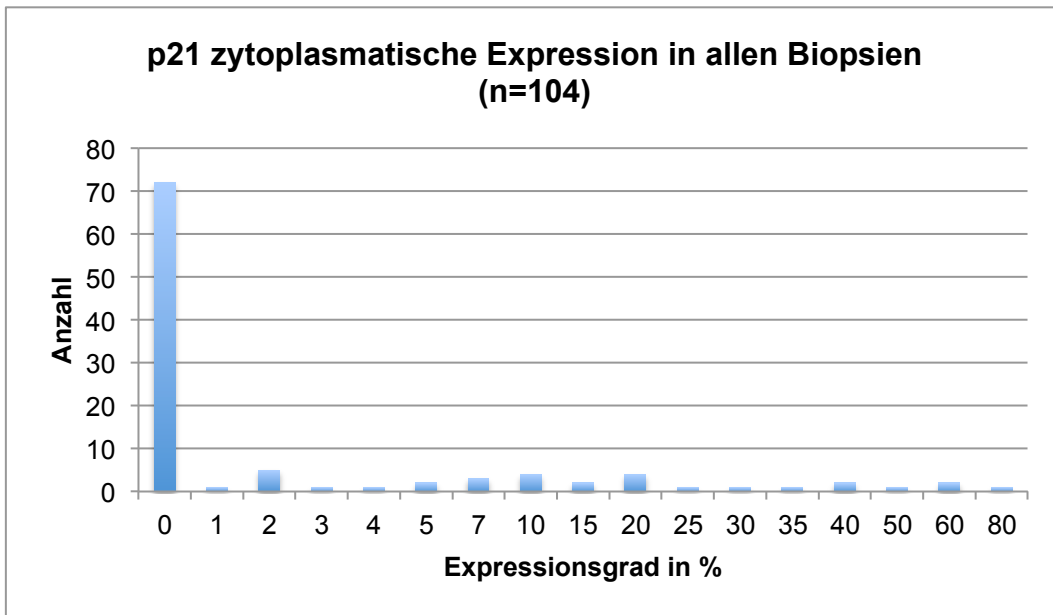
Bei der Auswertung der nukleären Färbung der p21-gefärbten Biopsien wurden zusätzlich zwei Cut off's bestimmt und so drei Gruppen gebildet: Gruppe eins (0%), Gruppe zwei (1-4%) und Gruppe drei (5% oder >) p21 nukleär-gefärbte Tumorzellen.

#### 4.2.1. Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien (Abb. 8 und 9, S. 34-35)

Bei der Auswertung der Biopsien bezüglich der Expression von p21 waren hinsichtlich der nukleären und der zytoplasmatischen Färbung 24 Präparate von 128 Patientenfällen nicht auswertbar bzw. es lag kein Untersuchungsmaterial vor.



**Abbildung 8: Darstellung der Verteilung der nukleären p21-Expression in allen Biopsien (n=104)**



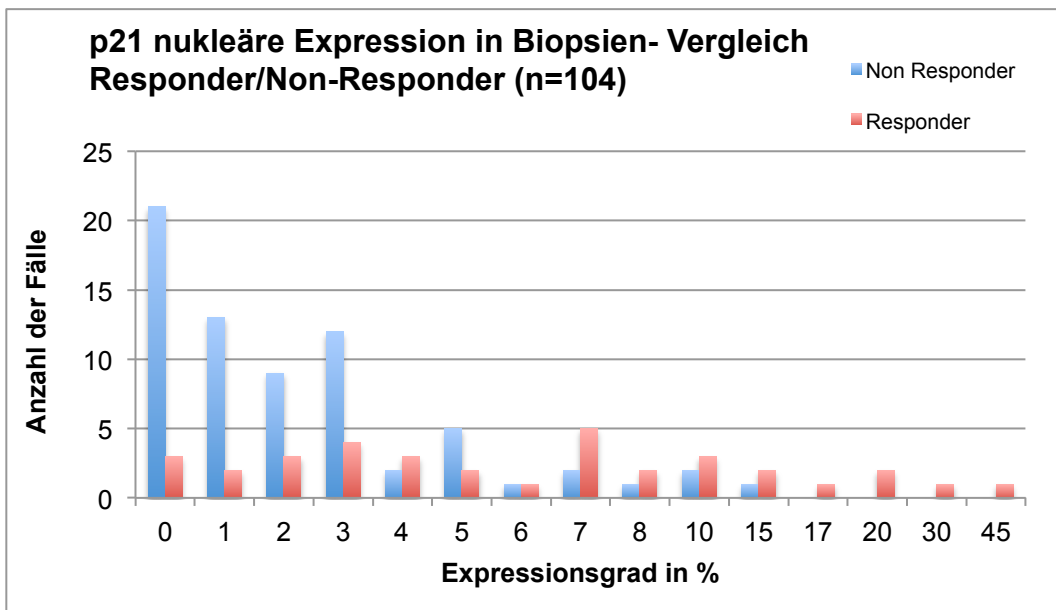
**Abbildung 9: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p21-Expression in allen Biopsien (n=104)**

Zunächst wurde kein Cut-off gebildet und die Auswertung erfolgte rein quantitativ in Prozent (Abb. 8 und 9, S. 34-35).

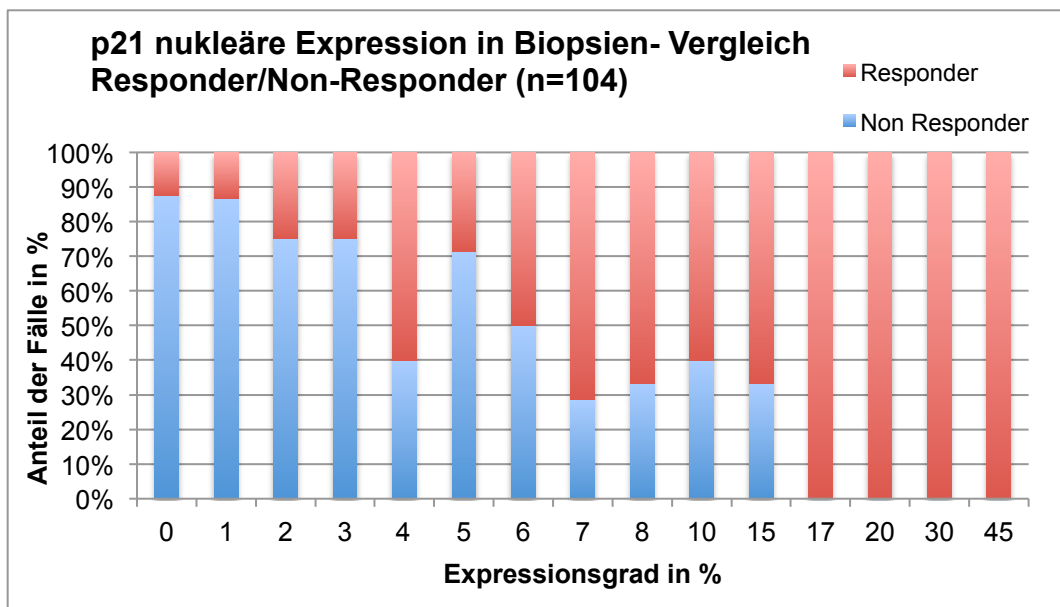
#### 4.2.2 Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response)

Der nukleäre Expressionsgrad der mittels p21-gefärbten Biopsien ergab eine signifikante Korrelation mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie (Abb. 10a und 10b, S. 36). Als „Responder“ wurden Patienten mit einem Regressionsgrad 3 und 4 nach Dworak gewertet. „Non-Responder“ waren somit Patienten mit einem Regressionsgrad 1 und 2 nach Dworak. Die nukleäre p21-Expression der Biopsien korrelierte signifikant mit der Response, bei einem p-Wert von  $<0,0005$ . Der zytoplasmatische Expressionsgrad der mittels p21-gefärbten Biopsien korrelierte nicht mit der Response (Abb. 13, S. 40). Der p-Wert betrug hier 0,456.





**Abbildung 10a: Darstellung der Verteilung der nukleären p21-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney Test,  $p < 0,0005$ ).**

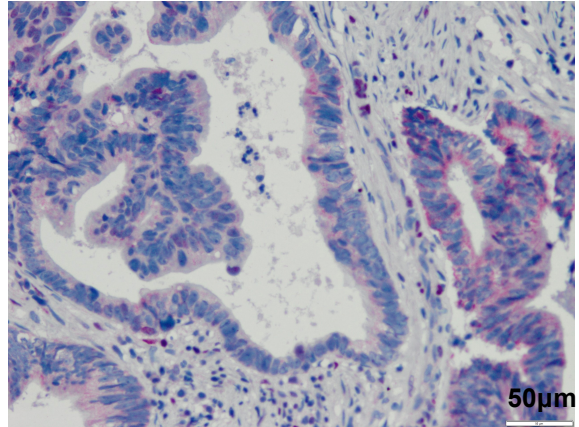
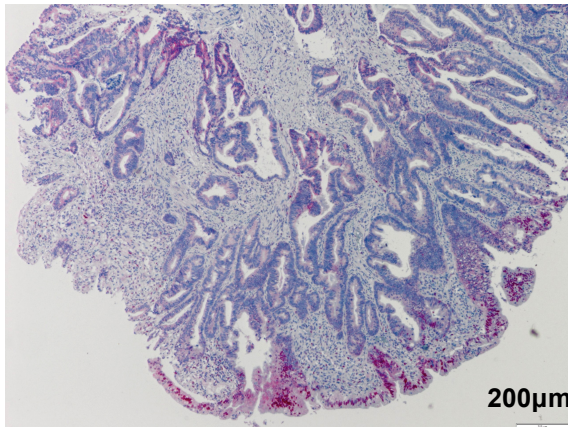


**Abbildung 10b: Darstellung des Anteil an Patienten mit prozentualer nukleärer p21-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney Test,  $p < 0,0005$ ).**

Beispielhaft für dieses Ergebnis sind Patient x und Patient y gezeigt (Abb. 11 und 12, S. 38-39). Patient x (Abb. 11, S. 38) hat mit einer geringen nukleären p21-Expression in der Biopsie als „Non-Responder“ mit einem Regressionsgrad nach Dworak von 1 auf die neoadjuvante Radiochemotherapie reagiert.

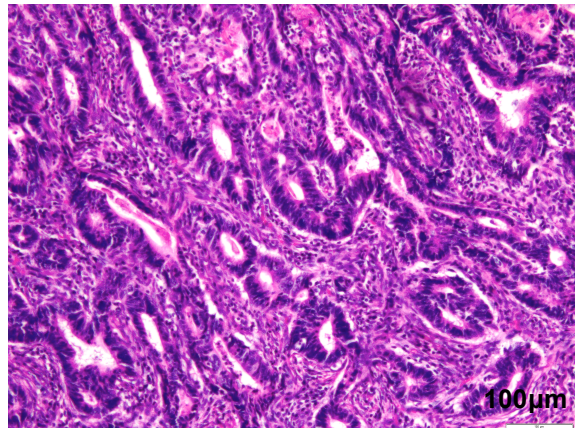
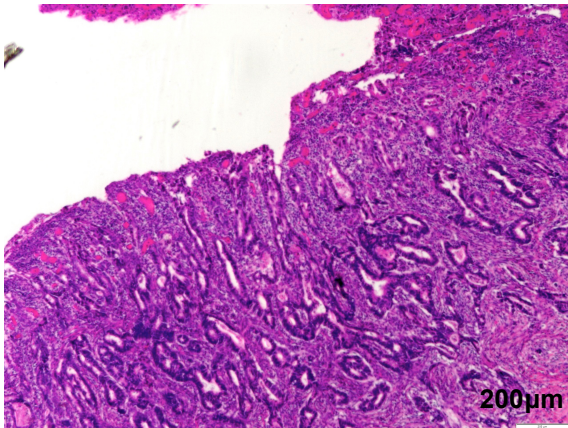
Patient y (Abb. 12, S. 39) hat hingegen mit einer hohen p21-Expression als „Responder“ mit einem Regressionsgrad nach Dworak von 4 auf die neoadjuvante Radiochemotherapie reagiert.

**Patient x**



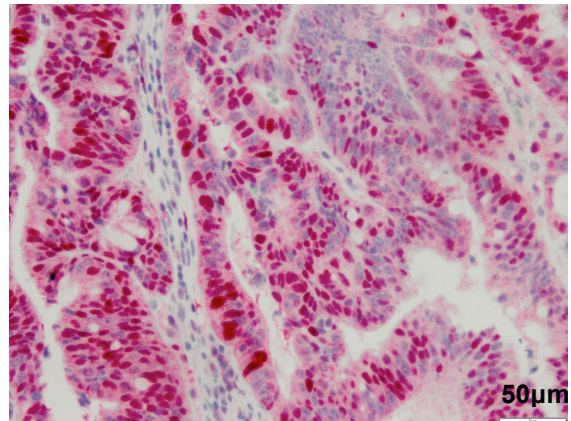
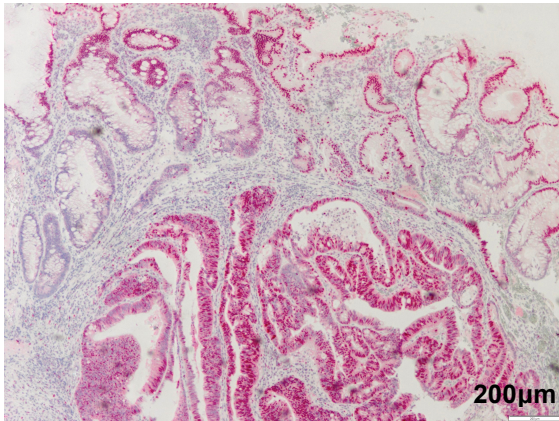
**Abbildung 11a/b: Invasiver Tumor in der prätherapeutischen Biopsie, wenige nukleär p21-gefärbte Tumorzellen**

**Neoadjuvante  
Radiochemotherapie**



**Abbildung 11c/d: Invasiver Tumor im Resektat nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie: Non-Responder (Dworak: 1)**

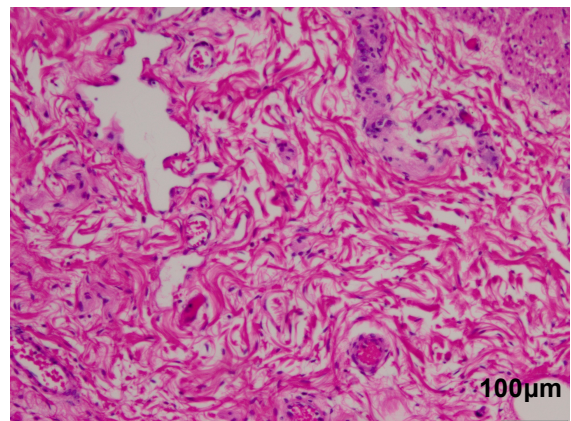
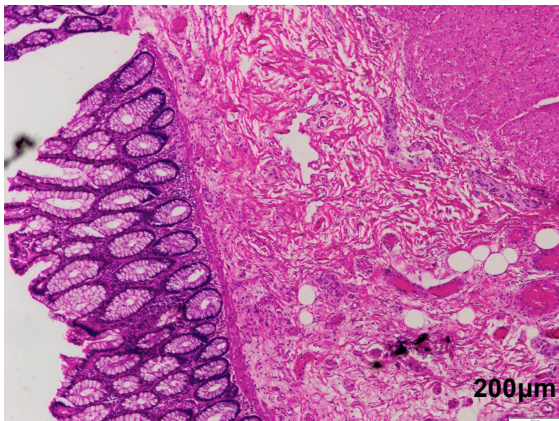
**Patient y**



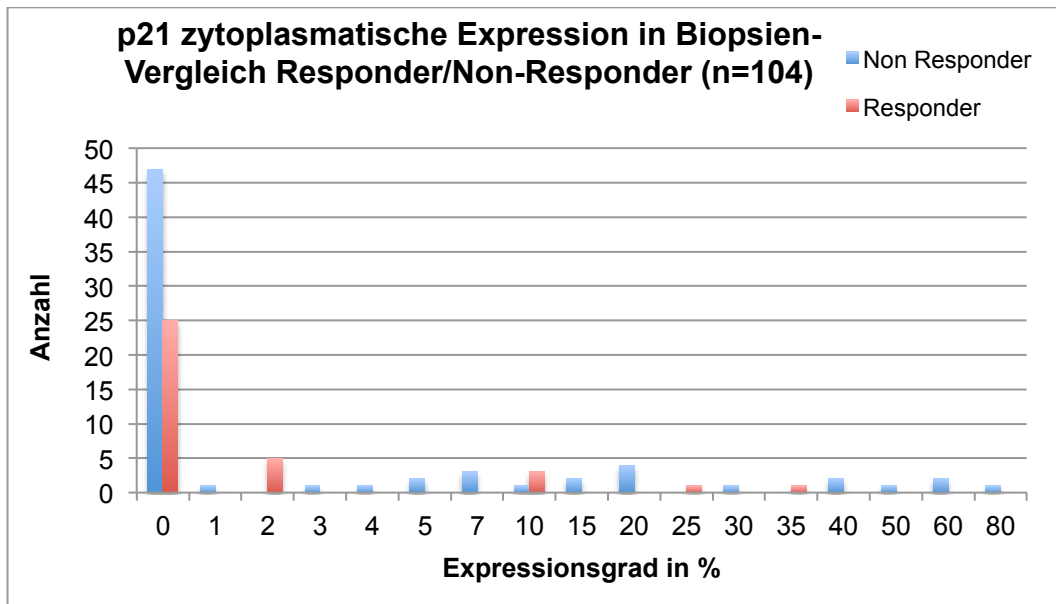
**Abbildung 12a/b: Invasiver Tumor in der prätherapeutischen Biopsie, viele nukleär p21-gefärbte Tumorzellen**



**Neoadjuvante  
Radiochemotherapie**



**Abbildung 12c/d: Kein Nachweis von vitalen Tumorzellen, Resektat nach erfolgter neoadjuvanter Radiochemotherapie: Responder (Dworak 4)**

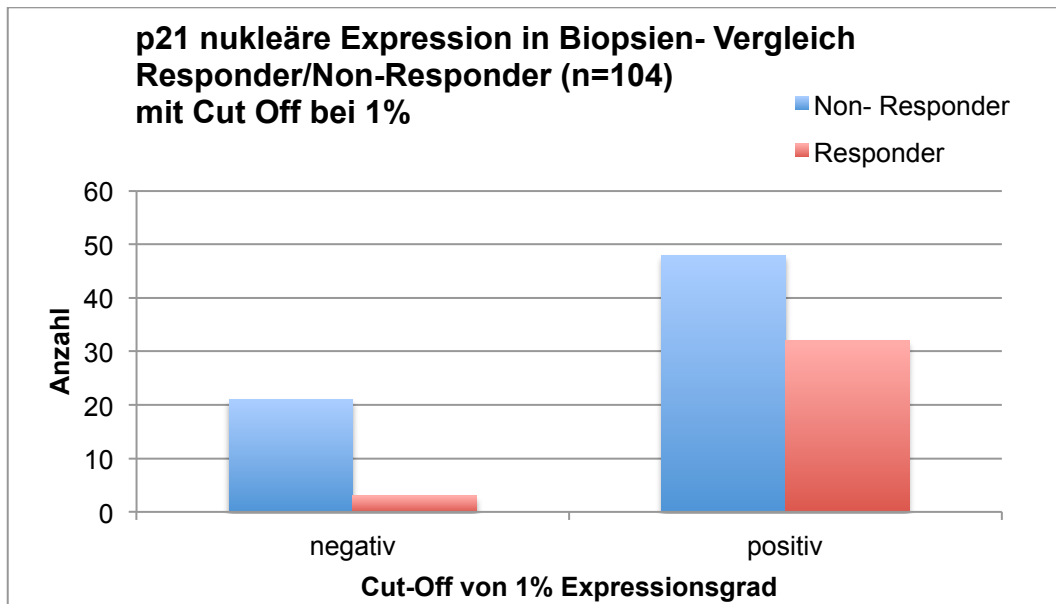


**Abbildung 13: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p21-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney Test,  $p=0,456$ ).**

#### 4.2.3 Expressionsstatus der p21-gefärbten Biopsien und geeignete Cut Off's

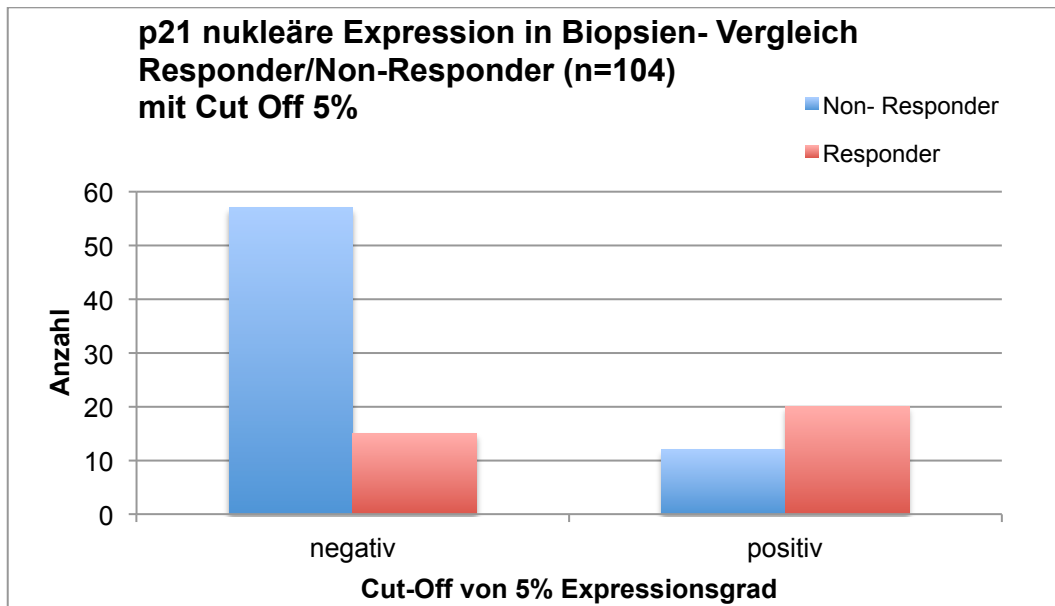
Zunächst wurde bei der Auswertung der nukleären Färbung der p21-gefärbten Biopsien ein Cut Off von 1% festgelegt (Abb. 14, S. 41). Dies ergab bei der Auswertung der nukleären Expression der „Non-Responder“ 21 als negativ und 48 als positiv zu wertende Biopsien. Bei den „Respondern“ ergab dies 3 als negativ und 32 als positiv zu wertende Biopsien.

Die Sensitivität lag hier bei 91,4%, die Spezifität bei 30,4%. Der positive prädiktive Wert lag hierbei bei 40%. Bei einem Cut Off von 1% korrelierte die nukleäre Expression signifikant mit der Response ( $p=0,013$ ).



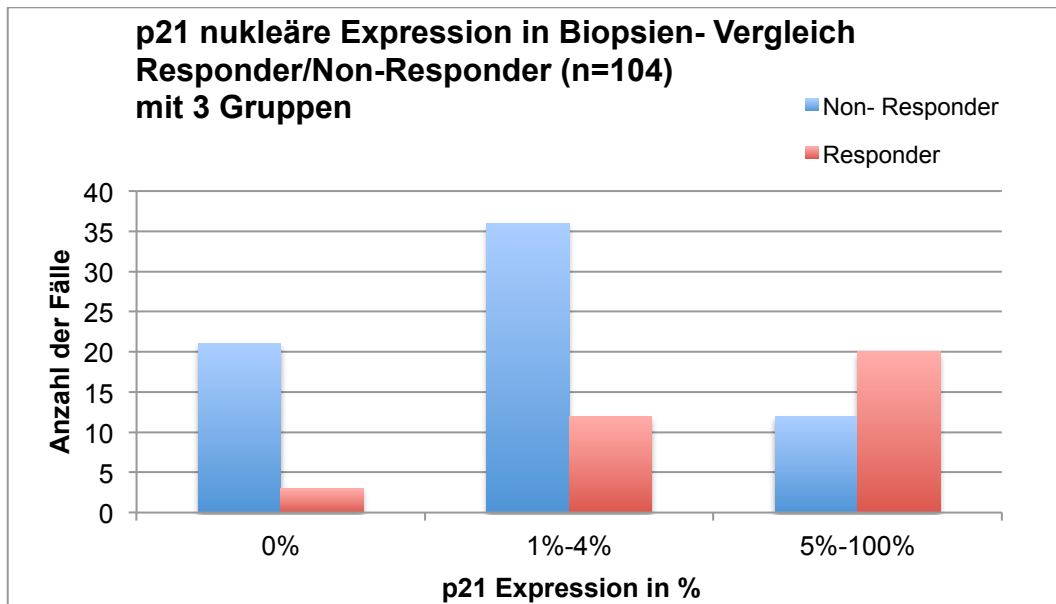
**Abbildung 14: Darstellung der Verteilung der nukleären p21 Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern bei einem Cut Off von 1% (n=104) (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,013$ )**

Ein Cut Off von 5% ergab im Vergleich dazu eine Sensitivität von 57,1% und eine Spezifität von 82,6% (Abb. 15, S. 42). Die Auswertung ergab bei den „Non-Respondern“ 57 als negativ und 12 als positiv zu wertende Biopsien. Bei den „Respondern“ ergab dies 15 als negativ und 20 als positiv zu wertende Biopsien. Der positive prädiktive Wert lag hierbei bei 62,5%. Bei einem Cut Off von 5% korrelierte die nukleäre Expression signifikant mit der Response ( $p<0,0005$ ).



**Abbildung 15: Darstellung der Verteilung der nukleären p21 Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern bei einem Cut Off von 5% (n=104) (Chi-Quadrat-Test,  $p < 0,0005$ )**

Zusätzlich wurden beide Cut Offs kombiniert und somit drei Gruppen gebildet (Abb. 16, S. 43). Als Gruppe eins wurden alle Biopsien mit einem Expressionsgrad von 0% gewertet, als Gruppe zwei alle zwischen einem Expressionsgrad von 1% - 4% und als Gruppe drei alle ab einem Expressionsgrad von 5%. Bei den „Non-Respondern“ ergab dies für Gruppe eins 21 Biopsien, für Gruppe zwei 36 Biopsien und für Gruppe drei 12 Biopsien. Bei den „Respondern“ ergab dies für Gruppe eins drei Biopsien, für Gruppe zwei 12 Biopsien und für Gruppe drei 20 Biopsien. Bei der Bildung dieser drei Gruppen wurde ein monotoner Anstieg der Responder von 8,6% zu 34,3% zu 57,1% festgestellt sowie eine Signifikanz von  $p < 0,0005$ .

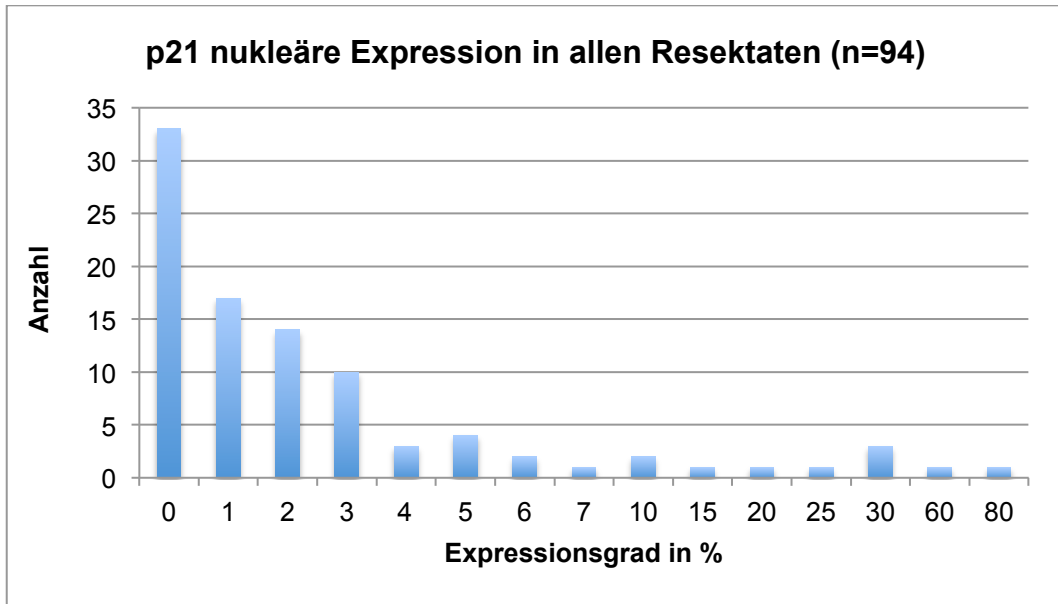


**Abbildung 16: Darstellung der Verteilung der nukleären p21-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern bei 3 Gruppen: 0%- Gruppe 1, 1-4% Gruppe 2, 5-100% Gruppe 3 (n=104) (Chi-Quadrat-Test,  $p < 0,0005$ )**

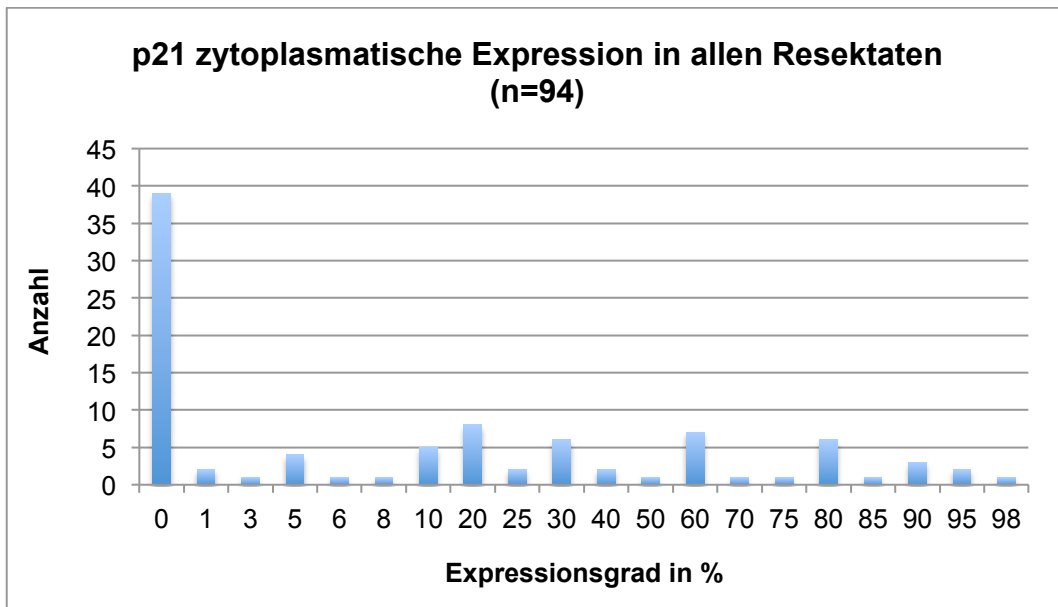
#### 4.2.4 Expressionsstatus der p21-gefärbten Resektate (Abb. 17 und 18, S. 44)

35 Präparate der Resektate wurden nicht gefärbt und ausgewertet, da diese posttherapeutisch keinen Tumor mehr aufwiesen und daher nicht auswertbar waren (z.B. Regressionsgrad 4 nach Dworak, d.h. kein Resttumor).





**Abbildung 17: Darstellung der Verteilung der nukleären p21-Expression in allen Resektaten (n=94)**



**Abbildung 18: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p21-Expression in allen Resektaten (n=94)**

#### 4.2.5 Entwicklung des Expressionsstatus von p21 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie (Tab. 12, S. 45)

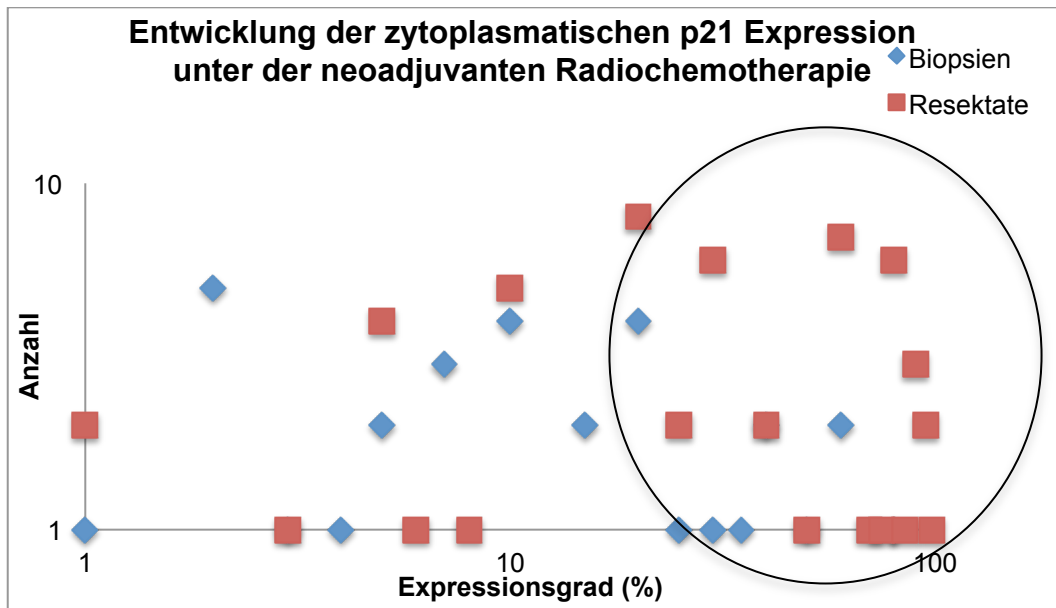
Es wurden die Expressionsgrade der Biopsien der einzelnen Patienten mit den korrespondierenden Resektaten verglichen.

Bei 30 Patienten war die nukleäre Expression von p21 der Biopsien geringer, weitere 32 wiesen eine höhere Expression der Biopsien im Vergleich zu den Resektaten auf. Bei 16 Patienten veränderte sich der nukleäre Expressionsstatus von p21 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie nicht. Die nukleäre Expression von p21 stieg damit nicht signifikant unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie ( $p=0,548$ ).

Bei 42 Patienten war die zytoplasmatische Expression von p21 der Biopsie geringer, weitere 11 Patienten wiesen eine höhere Expression der Biopsien im Vergleich zu den Resektaten auf. Bei 25 Patienten veränderte sich der zytoplasmatische Expressionsstatus von p21 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie nicht. Die zytoplasmatische Expression von p21 stieg damit signifikant an mit  $p < 0,0005$  (Abb. 19, S. 46).

**Tabelle 12: Darstellung der Entwicklung der nukleären und zytoplasmatischen p21-Expression unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie durch den Vergleich der Biopsien und Resektate (n=78) (Wilcoxon-Signed-Rank-Test)**

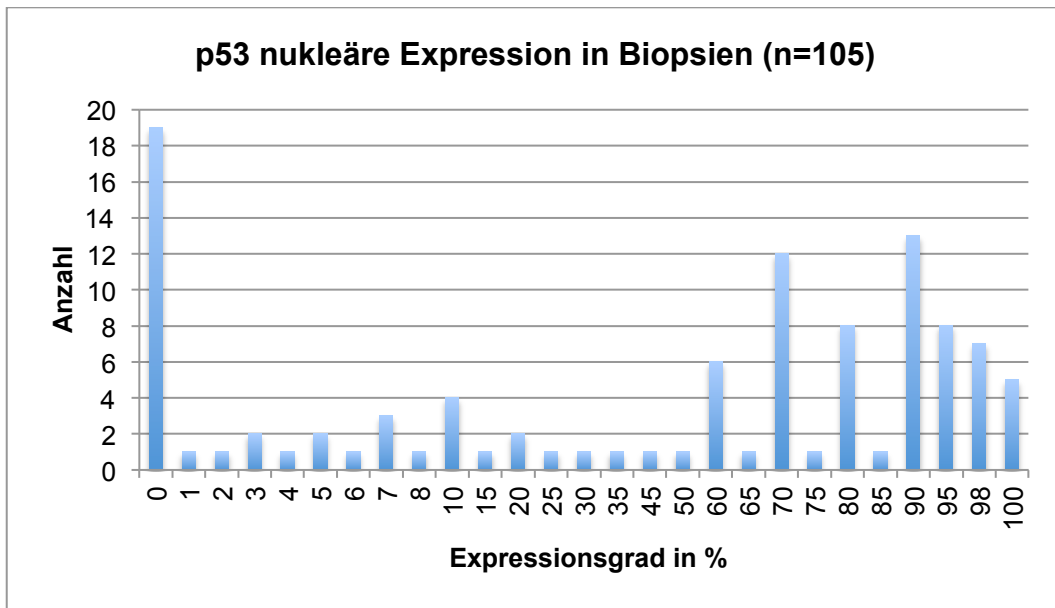
n=78	Nukleäre Expression (%)	Zytoplasmatische Expression (%)
Expr. PE < Expr. Res.	30	42
Expr. PE > Expr. Res.	32	11
gleichbleibend	16	25
p-Wert	0,548	<b>&lt; 0,0005</b>



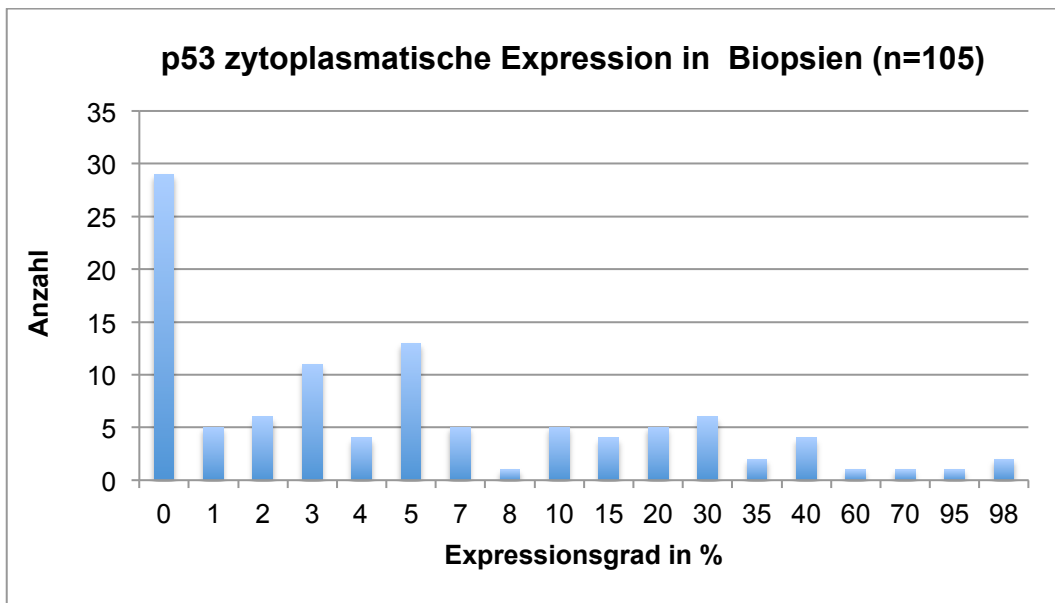
**Abbildung 19: Darstellung der Entwicklung der zytoplasmatischen Expression von p21 (in Anlehnung an Tabelle 12) bei allen Biopsien und Resektaten unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie (n=78), der Kreis markiert die Expressionsgrade der Resektate, die sich posttherapeutisch höher ansiedeln, als die der Biopsate.**

#### 4.2.6 Expressionsstatus der p53-gefärbten Biopsien (Abb. 20 und 21, S. 47)

Bei der Auswertung der Biopsien bezüglich der Expression von p53 waren hinsichtlich der nukleären und der zytoplasmatischen Färbung 23 Präparate von 128 Patientenfällen nicht auswertbar.

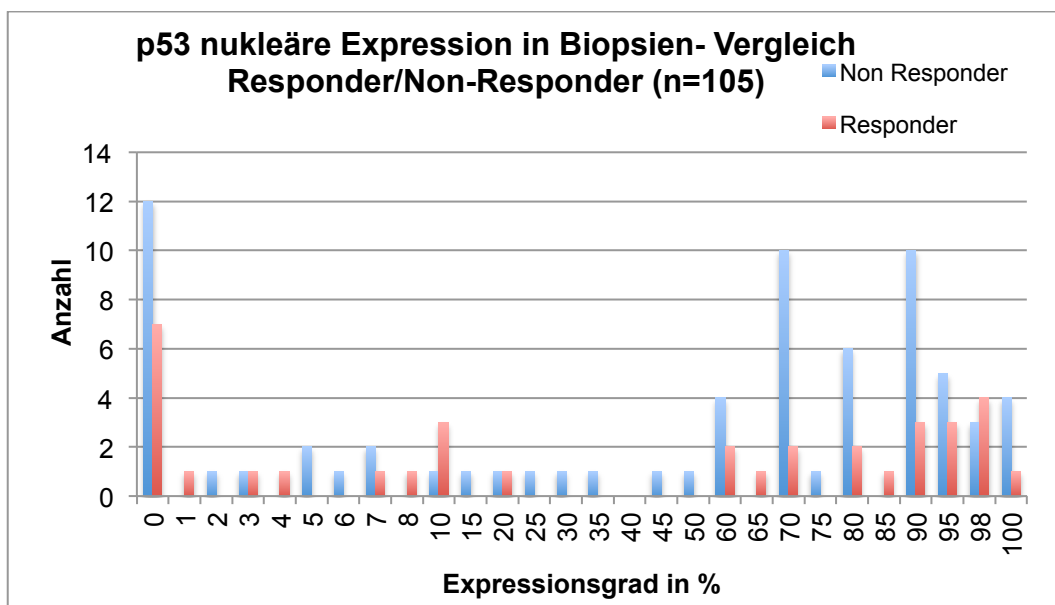


**Abbildung 20: Darstellung der Verteilung der nukleären p53-Expression in allen Biopsien (n=105)**

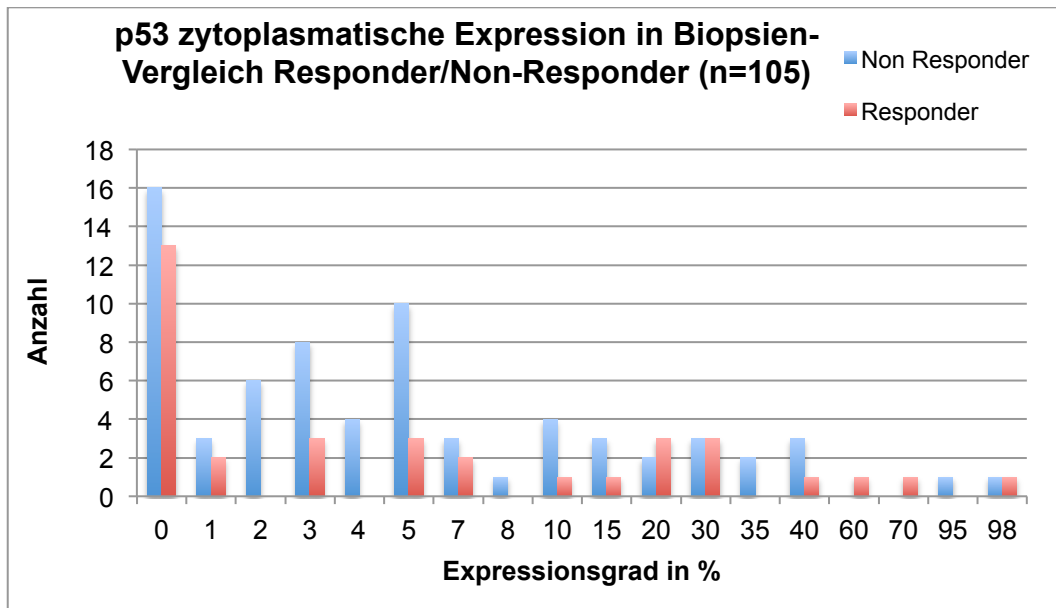


**Abbildung 21: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p53-Expression in allen Biopsien (n=105)**

4.2.7 Expressionsstatus der p53-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response)  
 Als „Responder“ wurden Patienten mit einem Regressionsgrad 3 und 4 nach Dworak gewertet. „Non-Responder“ waren somit Patienten mit einem Regressionsgrad 1 und 2 nach Dworak. Der nukleäre (Abb. 22, S. 48) sowie der zytoplasmatische (Abb.23, S. 49) Expressionsgrad der mittels p53-gefärbten Biopsien korrelierte nicht mit der Response, dem Ansprechen auf die neoadjuvaten Radiochemotherapie. Der p-Wert der Korrelation des nukleären Expressionsgrades mit der „Response“ betrug 0,677, der p-Wert des zytoplasmatischen Expressionsgrads mit der „Response“ betrug 0,82.



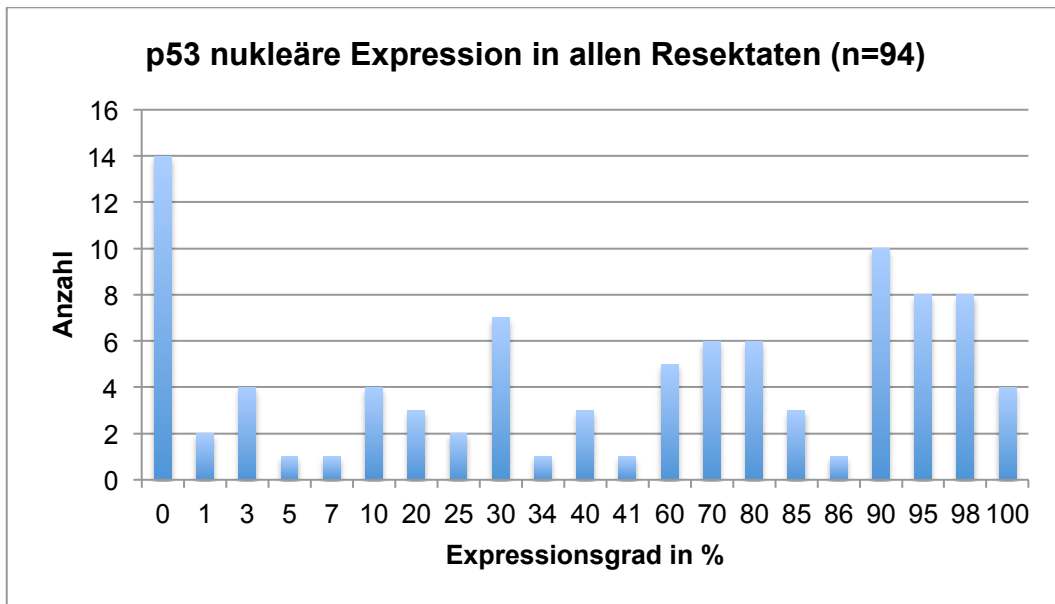
**Abbildung 22: Darstellung der Verteilung der nukleären p53-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=105) (Mann-Whitney-Test, p=0,677).**



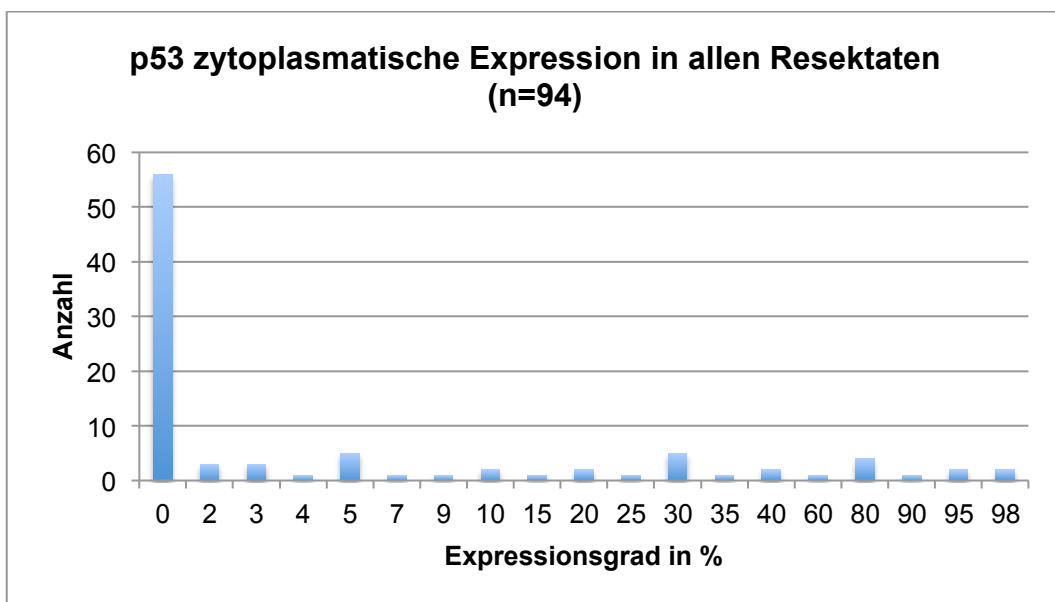
**Abbildung 23: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p53-Expression von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=105) (Mann-Whitney-Test,  $p=0,82$ )**

#### 4.2.8 Expressionsstatus der p53-gefärbten Resektate (Abb. 24 und 25, S. 50)

35 Präparate der Resektate wurden nicht gefärbt und ausgewertet, da diese posttherapeutisch keinen Tumor mehr aufwiesen (Regressionsgrad 4 nach Dworak) oder aus anderen Gründen nicht auswertbar waren.



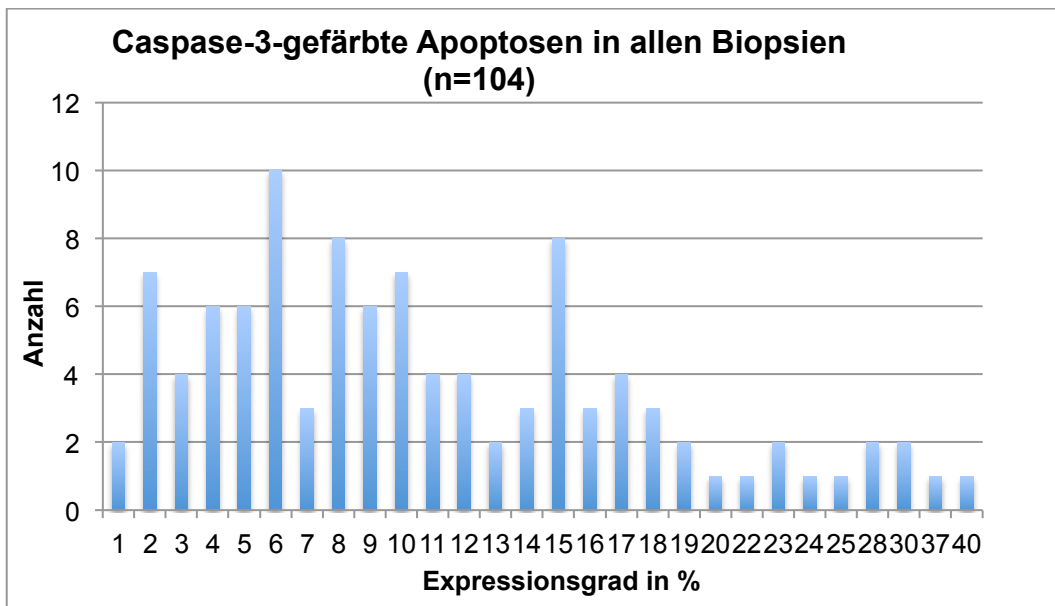
**Abbildung 24: Darstellung der Verteilung der nukleären p53-Expression in allen Resektaten (n=94)**



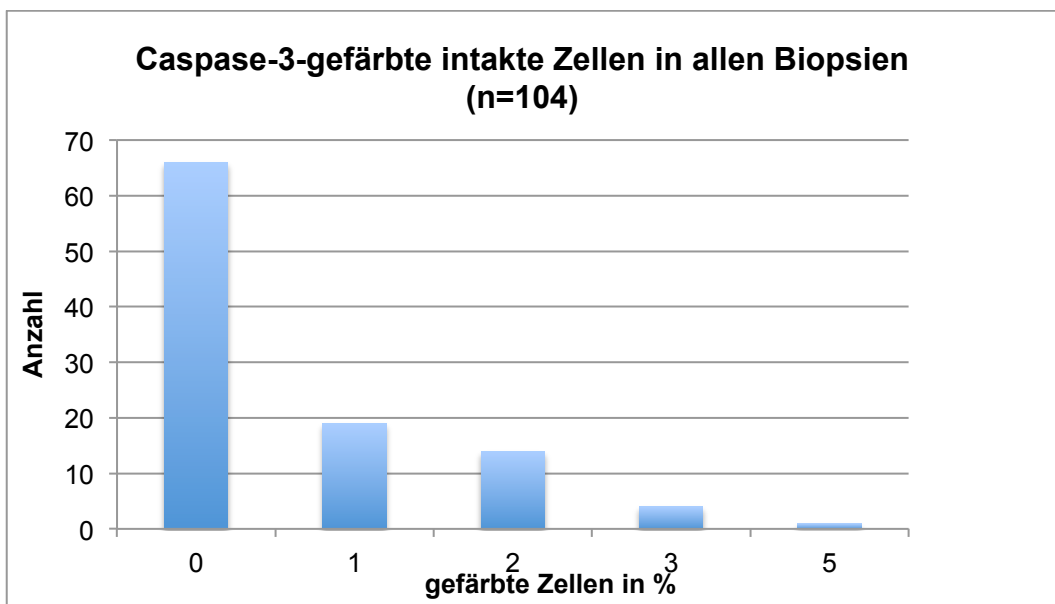
**Abbildung 25: Darstellung der Verteilung der zytoplasmatischen p53-Expression in allen Resektaten (n=94)**

#### 4.2.9 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Biopsien (Abb. 26, 27 und 28, S. 51-52)

Bei der Auswertung der Biopsien bezüglich der Expression der Caspase-3 waren hinsichtlich der Apoptosen, der „Schmutznekrosen“ und der intakten Zellen 24 Präparate von 128 Patientenfällen nicht auswertbar.

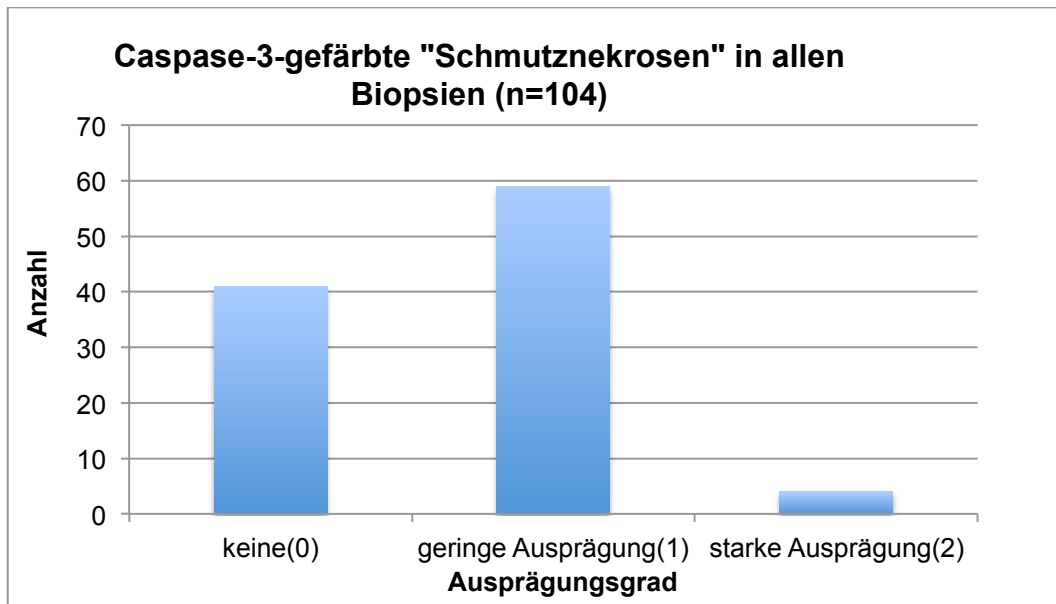


**Abbildung 26: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der Apoptosen in allen Biopsien (n=104)**



**Abbildung 27: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der intakten Zellen in allen Biopsien (n=104)**

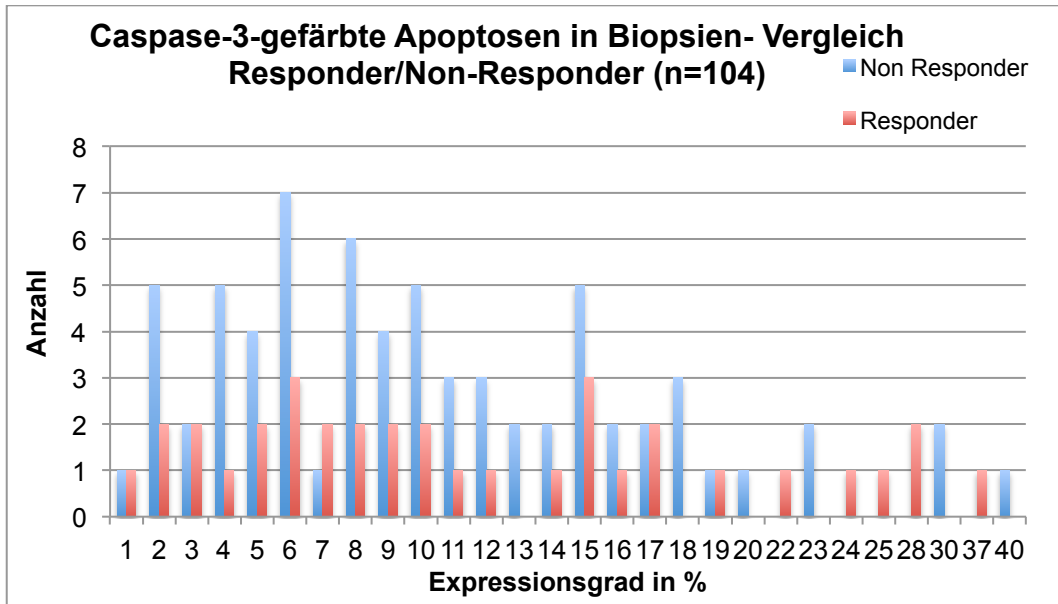




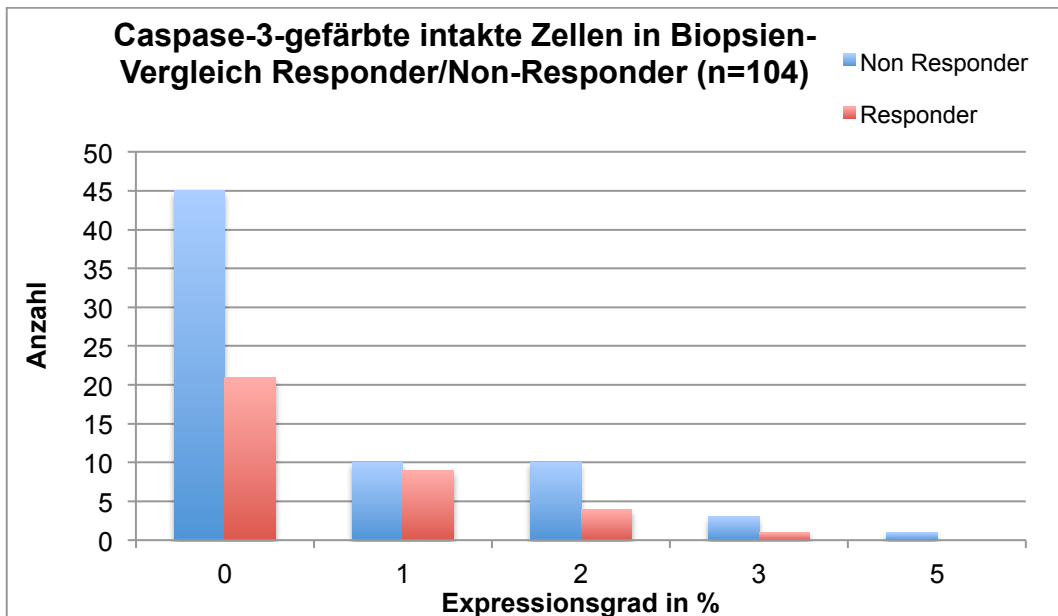
**Abbildung 28: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der „Schmutznekrosen“ in allen Biopsien (n=104)**

#### 4.2.10 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Biopsien und Dworak Grading (Response)

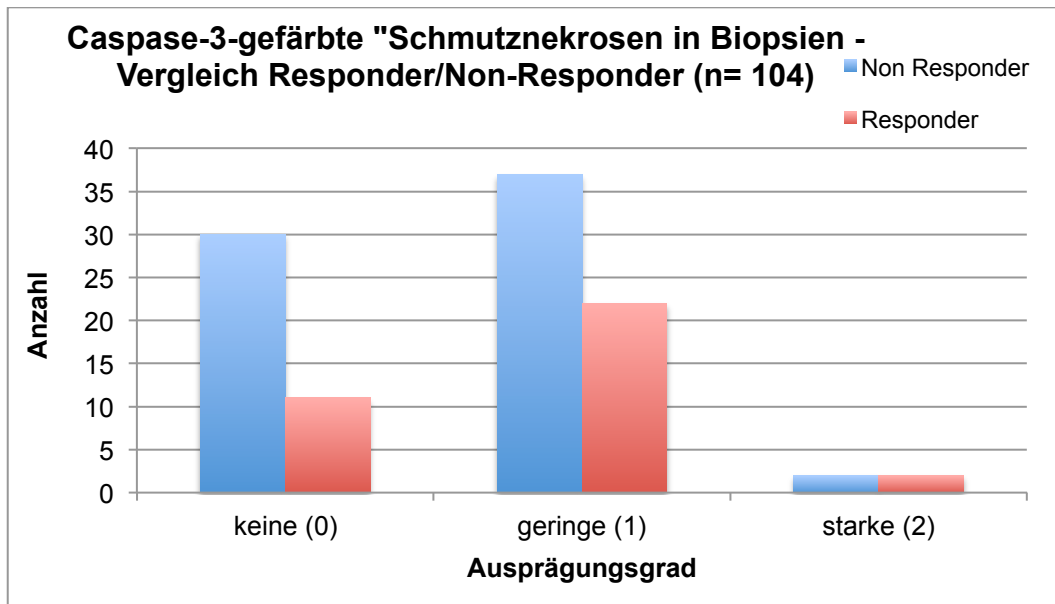
Als „Responder“ wurden Patienten mit einem Regressionsgrad 3 und 4 nach Dworak gewertet. „Non-Responder“ waren somit Patienten mit einem Regressionsgrad 1 und 2 nach Dworak. Die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen (Abb. 29, S. 53), der intakten Zellen (Abb. 30, S. 53) sowie der „Schmutznekrosen“ (Abb. 31, S. 54) in den Biopsien korrelierte nicht mit dem Ansprechen auf die neoadjuvate Radiochemotherapie. Der p-Wert der Korrelation der Apoptosen mit der „Response“ betrug 0,558, der p-Wert der intakten Zellen mit der „Response“ betrug 0,863, der p-Wert der „Schmutznekrosen mit der „Response“ betrug 0,204.



**Abbildung 29: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-gefärbten Apoptosen von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney-Test, p=0,558)**



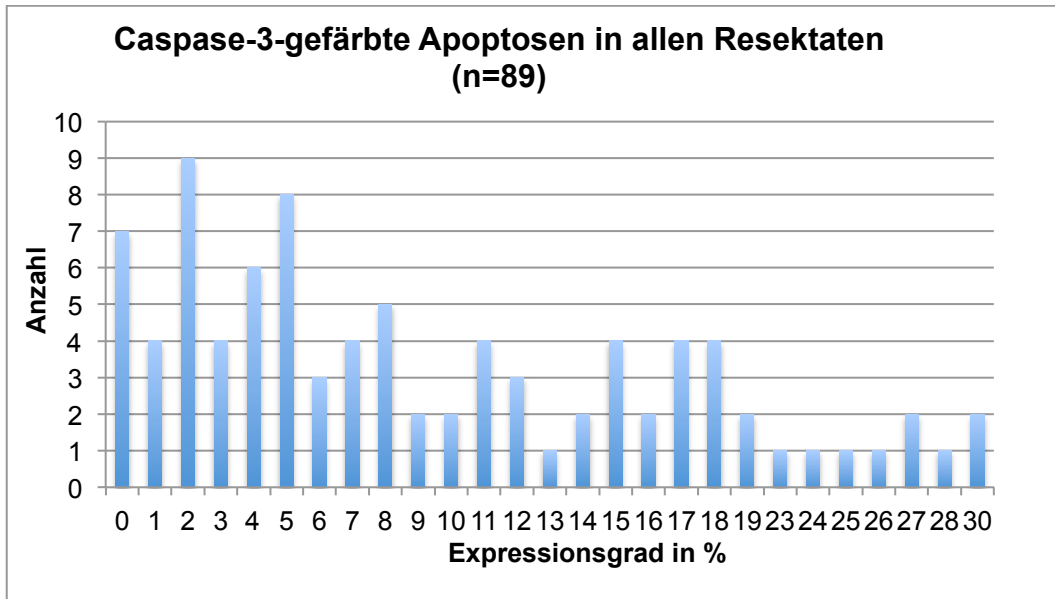
**Abbildung 30: Darstellung der Verteilung der Caspase-3 gefärbten intakten Zellen von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney-Test, p=0,863)**



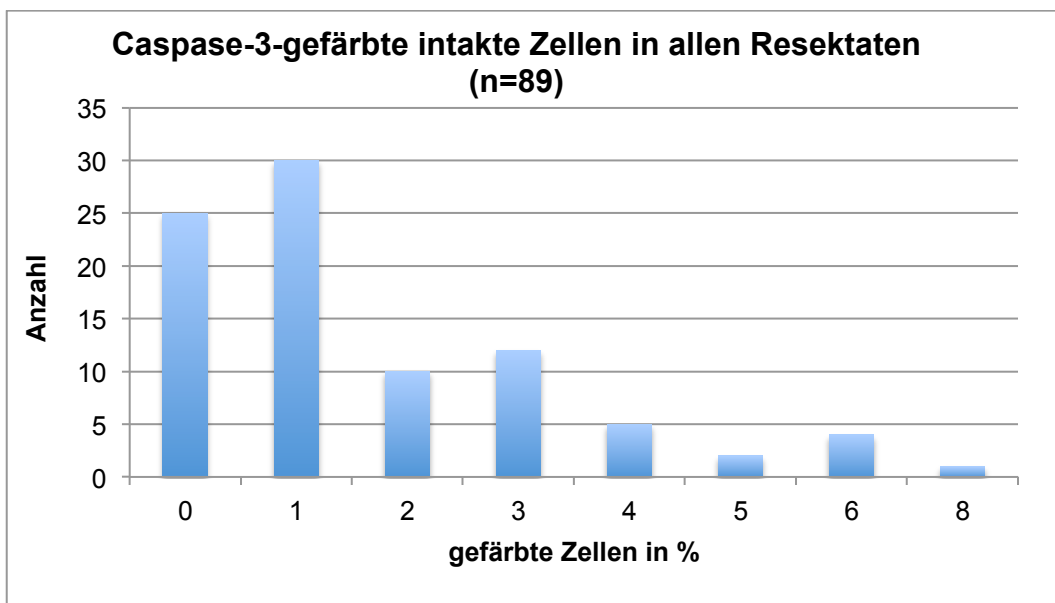
**Abbildung 31: Darstellung der Verteilung der Caspase-3 gefärbten „Schmutznekrosen“ von Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (n=104) (Mann-Whitney-Test,  $p=0,204$ ).**

4.2.11 Expressionsstatus der Caspase-3-gefärbten Resektate (Abb. 32, 33 und 34, S. 55-56)

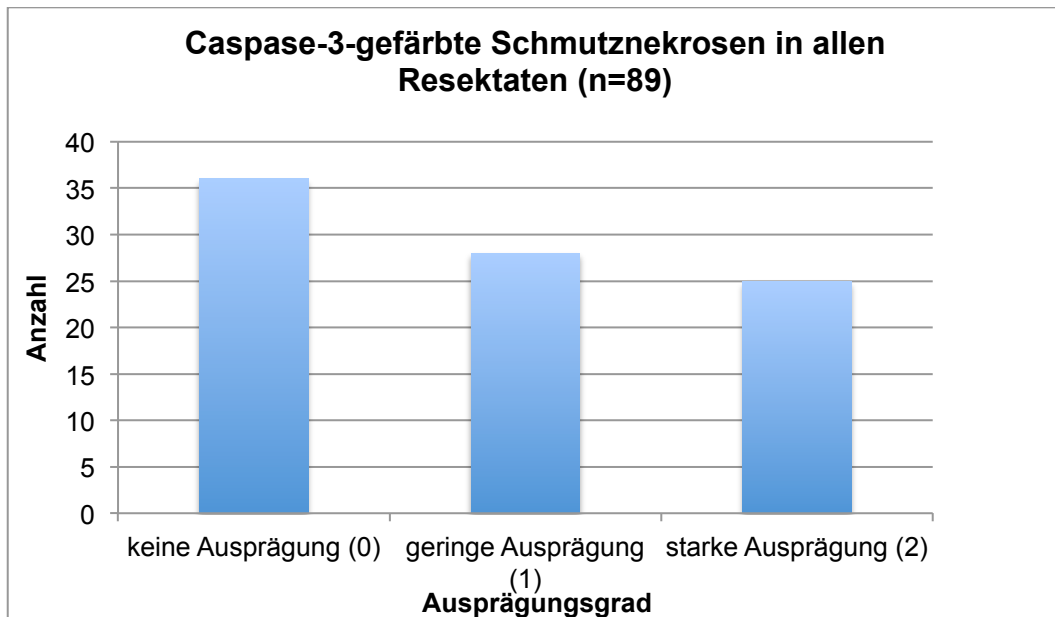
39 Präparate der Resektate wurden nicht gefärbt und ausgewertet, da diese posttherapeutisch keinen Tumor mehr aufwiesen (Regressionsgrad 4 nach Dworak) oder aus anderen Gründen nicht auswertbar waren.



**Abbildung 32: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der Apoptosen in allen Resektaten (n=89)**



**Abbildung 33: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der intakten Zellen in allen Resektaten (n=89)**



**Abbildung 34: Darstellung der Verteilung der Caspase-3-Färbung der „Schmutznekrosen“ in allen Resektaten (n=89)**

#### 4.2.12 Entwicklung des Expressionsstatus der Caspase-3 unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie (Tab. 14, S. 57)

Dabei wurde die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen, der intakten Zellen und der „Schmutznekrosen“ in den Biopsien der einzelnen Patienten mit denen in ihren Resektaten verglichen.

Bei 29 Patienten war die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen in der Biopsie geringer, weitere 42 wiesen eine höhere Anzahl in den Biopsien im Vergleich zu den Resektaten auf. Bei 2 Patienten veränderte sich die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie nicht. Die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen stieg damit nicht signifikant unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie ( $p=0,213$ ).

Bei 37 Patienten war die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten intakten Krebszellen in der Biopsie geringer, weitere 13 Patienten wiesen eine höhere Anzahl in den Biopsien im Vergleich zu den Resektaten auf. Bei 23 Patienten veränderte sich die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten intakten Zellen unter der neoadjuvanten

Radiochemotherapie nicht. Die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten intakten Zellen stieg somit signifikant an mit  $p < 0,0005$ .

Bei 30 Patienten war die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ in der Biopsie geringer, weitere 17 wiesen eine höhere Anzahl in den Biopsien im Vergleich zu den Resektaten auf. Bei 26 Patienten veränderte sich die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie nicht. Die Anzahl der mittels Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ stieg damit signifikant unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie ( $p = 0,028$ ).

**Tabelle 14: Darstellung der Entwicklung der Anzahl der Caspase-3-gefärbten Apoptosen, intakten Zellen und „Schmutznekrosen“ unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie durch den Vergleich der Biopsien und Resektate (n=73) (Wilcoxon-Signed-Rank-Test).**

N=73	Gefärbte Apoptosen	Gefärbte intakte Zellen	Gefärbte Schmutznekrosen
Expr. PE < Expr. Res.	29	37	30
Expr. PE > Expr. Res.	42	13	17
gleichbleibend	2	23	26
p-Wert	0,213	<b>&lt;0,0005</b>	<b>0,028</b>

4.3 Zusammenhang zwischen klinischen und pathohistologischen Parametern (Tab. 15, S. 58)

**Tabelle 15: Das TNM-Stadium, Rauchgewohnheiten und der BMI in Abhängigkeit der Response (Angewandter statistischer Test: Chi-Quadrat-Test) (n variiert, da teilweise nicht alle Daten verfügbar waren)**

Parameter		„Non-Responder“	„Responder“	p-Wert
<b>ypT- Kategorie</b> n=125	0	0	21	<b>p&lt;0,0005</b>
	1	5	3	
	2	23	9	
	3	50	7	
	4	7	0	
<b>ypN-Kategorie</b> n=125	0	48	36	<b>p=0,002</b>
	1	29	2	
	2	8	2	
<b>ypN-Kategorie</b> n=125	positiver N-Befund	37	4	<b>p&lt;0,0005</b>
	negativer N-Befund	48	36	
<b>cM-Kategorie</b> n=125	0	75	38	p=0,233
	1	10	2	
<b>BMI</b> n=124	Normalgewicht (< BMI 25)	43	18	p=0,319
	Präadipositas (< BMI 30)	34	16	
	Adipositas (> BMI 30)	7	6	
<b>Grading der Biopsie</b> n=109	1	4	2	p=0,51
	2	63	30	
	3	6	3	
	4	0	1	
<b>Nikotinabusus</b> n=123	Nichtraucher	45	29	<b>p=0,015</b>
	Raucher	40	9	
<b>Nikotinabusus</b> n=123	Nichtraucher	45	29	p=0,053
	Ehemalige Raucher	24	4	
	Raucher	16	5	

#### 4.4 Binäre logistische Regressionsanalyse (Multivariate Analyse)

In der multivariaten Analyse wurde getestet, ob die nukleäre p21-Expression ein von anderen klinisch-pathologischen Parametern unabhängiger Prädiktor der Response, d.h. dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie, ist. Die nukleäre p21-Expression bei einem Cut Off von 1% zeigte sich dabei nicht als unabhängig prädiktiv (Tab. 16a, S. 60). Die nukleäre p21-Expression bei einem Cut Off von 5% war ein unabhängiger Prädiktor der Response ( $p=0,002$ , Tab. 16b, S. 61). Dasselbe galt auch für die Kombination beider Cut Off's entsprechend einer Unterteilung der nukleären p21-Expression in drei Gruppen ( $p=0,006$ , Tab 16c, S. 62). Von den drei hier gezeigten logistischen Regressionen wies die Regression mit der p21-Expression bei einem Cut Off von 5% (Tab. 16b, S. 61) als Variable das, verglichen mit den anderen, höchste Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) aus. Damit erklärt diese logistische Regression mehr Varianz in der abhängigen Variablen (Response) als die anderen. In allen drei logistischen Regressionsanalysen zeigte sich die ypT-Kategorie als unabhängiger Faktor ( $p<0,0005$ , Tab 16 a-c, S. 60-62).



**Tabelle 16a: Binäre logistische Regressionsanalyse der Response bei n=125, Variablen: Cut Off bei 1% der nukleären p21-Expression der Biopsien, ypT-Kategorie, ypN-Kategorie, cM-Kategorie, prätherapeutisches Grading, Nikotinabusus**

R <sup>2</sup> (Cox & Snells) = 0,443	Odd's Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
<b>p21 nukleär Biopsie Cut Off bei 1%</b>	2,678	0,521 - 13,763	0,238
<b>ypT- Kategorie</b> pT 1 pT 2 pT 3 pT 4	0,229	0,116 - 0,453	<b>&lt;0,0005</b>
<b>ypN-Kategorie</b> pN 1 pN 2	0,288	0,064 - 1,306	0,107
<b>cM-Kategorie</b> cM 0 cM 1 cM 2	5,007	0,359 - 69,898	0,231
<b>Prätherapeutisches Grading</b> G 0 G 1 G 3 G 4	0,872	0,163 - 4,674	0,873
<b>Nikotinabusus</b> Nichtraucher Raucher	0,432	0,114 - 1,633	0,216

**Tabelle 16b: Binäre logistische Regressionsanalyse der Response bei n=125, Variablen: Cut Off bei 5% der nukleären p21-Expression der Biopsien, ypT-Kategorie, ypN-Kategorie, cM-Kategorie, prätherapeutisches Grading, Nikotinabusus**

R <sup>2</sup> (Cox & Snells) = 0,5	Odd's Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
<b>p21 nukleär Biopsie Cut Off bei 5%</b>	15,454	2,771 - 86,176	<b>0,002</b>
<b>ypT-Kategorie</b> pT 1 pT 2 pT 3 pT 4	0,194	0,082 - 0,459	<b>&lt;0,0005</b>
<b>ypN-Kategorie</b> pN 1 pN 2	0,229	0,046 - 1,139	0,072
<b>cM-Kategorie</b> cM 0 cM 1 cM 2	5,643	0,354 - 90,067	0,221
<b>Prätherapeutisches Grading</b> G 0 G 1 G 3 G 4	0,48	0,065 - 3,52	0,47
<b>Nikotinabusus</b> Nichtraucher Raucher	0,344	0,079 - 1,506	0,157

**Tabelle 16c: Binäre logistische Regressionsanalyse der Response bei n=125, Variablen: nukleäre p21-Expression der Biopsien in drei Gruppen, ypT-Kategorie, ypN-Kategorie, cM-Kategorie, prätherapeutisches Grading, Nikotinabusus**

R <sup>2</sup> (Cox & Snells) = 0,484	Odd's Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
<b>p21 nukleär</b> Biopsie in drei Gruppen	4,774	1,556 - 14,651	<b>0,006</b>
<b>ypT-Kategorie</b> pT 1 pT 2 pT 3 pT 4	0,229	0,106 - 0,492	<b>&lt;0,0005</b>
<b>ypN-Kategorie</b> pN 1 pN 2	0,230	0,046 - 1,148	0,073
<b>cM-Kategorie</b> cM 0 cM 1 cM 2	9,11	0,516 - 160,998	0,132
<b>Prätherapeutisches Grading</b> G 0 G 1 G 3 G 4	0,492	0,077 - 3,137	0,453
<b>Nikotinabusus</b> Nichtraucher Raucher	0,343	0,084 - 1,392	0,134

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Innerhalb des Patientenkollektivs reagierten 32% der Patienten als „Responder“ und 68% der Patienten als „Non-Responder“. Statistisch ergab sich kein Unterschied in der Response zwischen der Standardtherapie und geringfügig modifizierten Therapieformen (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,406$ ). Die nukleäre p21-Expression der prätherapeutischen Biopsien korrelierte signifikant mit der Response (Mann-Whitney-Test,  $p<0,0005$ ). Geeignete Cut Off's zeigten sich hier bei 1% und 5%. Die zytoplasmatische p21-Expression vergrößerte sich unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie (Wilcoxon-Rank-Test,  $p<0,0005$ ). Die nukleäre als auch die zytoplasmatische p53-Expression korrelierten nicht signifikant mit der Response (Mann-Whitney-Test,  $p=0,677/p=0,82$ ). Die Caspase-3-gefärbten intakten Zellen, Apoptosen und „Schmutznekrosen“ korrelierten nicht signifikant mit der Response (Mann-Whitney-Test,  $p=0,863/p=0,558/p=0,204$ ). Unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie vergrößerte sich die Anzahl an Caspase-3-gefärbten intakten Zellen, sowie die Anzahl an „Schmutznekrosen“ (Wilcoxon-Rank-Test,  $p<0,0005/p=0,028$ ). Die ypT-Kategorie, die ypN-Kategorie und der Nikotinabusus korrelierten signifikant mit der Response (Chi-Quadrat-Test,  $p<0,0005/p=0,002/p=0,015$ ). In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass die nukleäre p21-Expression bei einem Cut Off von 5% ein unabhängiger Prädiktor der Response war ( $p= 0,002$ ). Dasselbe galt auch für die Kombination beider Cut Off's entsprechend einer Unterteilung der nukleären p21-Expression in drei Gruppen ( $p=0,006$ ). Daneben wies die logistische Regression mit dem Cut Off bei 5% bei der prätherapeutischen p21-Expression als Variable das, verglichen mit den anderen, höchste Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) aus.

## 5. Diskussion

### 5.1 Hintergrund

Die Mortalität des CRC konnte innerhalb der letzten Jahre in verschiedenen europäischen Ländern deutlich gesenkt werden<sup>83</sup>. Gründe hierfür sind unter anderem eine Zunahme der Vorsorgeuntersuchungen sowie schonendere Operationstechniken in spezialisierten Behandlungszentren mit multimodaler und individuell auf den Patienten abgestimmter Therapie<sup>31,39</sup>.

Um diese einzelnen Behandlungsstrategien besser planen zu können, rückte in den letzten Jahren die Identifikation entsprechender prognostischer und prädiktiver molekularer Marker in den Vordergrund<sup>4</sup>. Hierbei stellt neben aufwändigeren molekularen Ansätzen (z.B. PCR<sup>84</sup>, FISH<sup>85</sup>), insbesondere die Immunhistochemie eine verlässliche, zeit- und kostensparende, sowie vor allem in der Breite einsetzbare Methode dar<sup>86</sup>. So kann ein entsprechender Marker den Tumor charakterisieren und gegebenenfalls Aussagen über wirksame Therapiestrategien treffen und individuelle Prognosen liefern<sup>87</sup>. Zwar spricht beim Rektumkarzinom ein erheblicher Teil der Patienten auf die neoadjuvante Radiochemotherapie an<sup>88-90</sup>, dennoch gibt es immer wieder Therapieversager („Non-Responder“), die gar nicht oder nur insuffizient auf die neoadjuvante Radiochemotherapie reagieren. Diese zu detektieren wäre hilfreich um den Einsatz der Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom weiter zu optimieren<sup>91,92</sup>. Bisher wurden diesbezüglich mehrere Marker wie zum Beispiel p21 und p53 getestet, die Caspase-3 wurde noch wenig untersucht. Problematisch ist hierbei auch die zum Teil widersprüchliche Datenlage hinsichtlich ihrer prädiktiven Relevanz (Tab. 17 und 18, S. 74-76, S. 78). Ziel dieser Arbeit war es folglich, die genannten Marker an einem geeigneten Patientenkollektiv hinsichtlich ihres Expressionsprofils zu untersuchen, um gegebenenfalls das bestehende Staging erweitern zu können. Dies könnte dazu führen, dass Patienten, die als „Non-Responder“ eingestuft werden, früher operiert werden und Nebenwirkungen der Radiochemotherapie vermieden werden könnten. Letztere sind insbesondere Diarrhö, Zystitis, Dermatitis im Bestrahlungsfeld, intestinale Funktionsstörungen, fäkale Inkontinenz, Blutungen, Perforationen, urogenitale Dysfunktionen und Beckenfrakturen<sup>93</sup>.

Die Gesamtanzahl der hier untersuchten Patienten liegt bei 125, bei einem Gesamtkollektiv von 128 Patienten. Biopsien und Resektate konnten bei insgesamt

105/104 Patienten untersucht werden. Die Anzahl der untersuchten Fälle ist damit gut mit der bereits publizierten Datenlage vergleichbar und liegt damit im durchschnittlichen Fallzahlbereich (Tab. 17, S. 74-76).

Die korrespondierenden Biopsien und Resektate wurden immunhistochemisch hinsichtlich des Expressionsprofils der oben beschriebenen Marker vergleichend untersucht. Weiterhin wurden das Regressionsgrading nach Dworak und Kriterien der TNM-Klassifikation bestimmt, sowie klinische Daten den Patientenakten entnommen und in die Bewertung mit einbezogen. Zusätzlich wurde die standardmäßige neoadjuvante Radiochemotherapie mit leicht modifizierten Therapieschemata hinsichtlich der Response verglichen.

## 5.2 Neoadjuvante Radiochemotherapie

Bezüglich der verschiedenen Therapieschemata zeigte sich, dass sich modifizierte Therapieschemata (die Kurzzeitstrahlentherapie nicht mit eingeschlossen) statistisch nicht von der Standardtherapie hinsichtlich der posttherapeutischen Tumorresponse unterscheiden ( $p=0,406$ ).

Dies rechtfertigt, dass auch Patienten, die eine modifizierte neoadjuvante Radiochemotherapie erhielten, in die immunhistochemische Expressionsanalyse und alle weiteren Analysen miteingeschlossen werden konnten.

## 5.3 Klinische Daten und das TNM-Stadium

Die ypT-Kategorie sowie die ypN-Kategorie als auch die reine Unterscheidung zwischen positivem und negativem Lymphknotenstatus korrelierten signifikant mit der Tumorresponse ( $p<0,0005/p=0,002/p<0,0005$ ). Dass der Lymphknotenstatus und die ypT-Kategorie hochsignifikant mit der Response korrelieren, konnten wir in der Vorarbeit bereits zeigen<sup>79</sup>.

Hinsichtlich der klinischen Risikofaktoren zeigte sich, dass der derzeitige Nikotinabusus mit der Response nach abgeschlossener neoadjuvanter Radiochemotherapie signifikant korreliert ( $p=0,015$ ). Schließt man zusätzlich noch ehemalige Raucher in die Analyse mit ein, verbleibt immerhin ein Trend zur Signifikanz ( $p=0,053$ ). Hinsichtlich dieser Ergebnisse sollte man in Betracht ziehen, die Patienten noch einmal explizit darauf hinzuweisen, dass ein Nikotinabusus das Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie verschlechtert.

In der Literatur gibt es bereits Arbeiten, die dieses Ergebnis unterstützen könnten: Cucina et al. schlugen 2012 vor, dass Nikotin die Proliferation in Kolonkrebszellen fördert und dabei gleichzeitig die Apoptose hemmt<sup>94</sup>. Dinicola et al. beobachteten ebenfalls eine durch Nikotin geförderte Proliferationszunahme in Kolonkrebszellen, die mittels Chemotherapeutikum behandelt werden, indem sie die PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase: ein Zielsubstrat der Caspase-3 und 7)-Expression maßen<sup>95</sup>. Auch Wong et al. und Ye et al. berichteten über einen Zusammenhang zwischen Kolontumorwachstum und Nikotin bei Mäusen<sup>96,97</sup>. Für das Rektumkarzinom wurde dies isoliert bisher nicht berichtet. Hinsichtlich der Überlebensprognose berichteten Walter et al., dass Rauchen einen negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben hat bezüglich des Kolonkarzinoms, für das Rektumkarzinom und erkrankte Frauen konnten sie keinen Zusammenhang zwischen Rauchen und Überleben nachweisen<sup>98</sup>. Beim Lungenkarzinom konnten Rivera et al. zeigen, dass die Raucherentwöhnung egal zu welchem Zeitpunkt der Diagnosestellung zu einer Verbesserung der Überlebensrate und zu einem besseren Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie führt. Als möglicher Grund wird hier der möglicherweise veränderte Metabolismus der Chemotherapie beschrieben und die geminderte Toxizität der Radiatio bei Rauchern<sup>99</sup>. In der multivariaten logistischen Regression zeigte sich die ypT-Kategorie bei allen drei hier durchgeführten Regressionen als unabhängiger Faktor ( $p < 0,0005$ ).

#### 5.4 Diskussion der prädiktiven Marker

Der Expressionsgrad der einzelnen Färbungen wurde mittels Immunhistochemie ermittelt. Jedoch kann beispielsweise bei einer Überexpression bei der immunhistochemischen Färbung mittels p53-Antikörper zwischen einem möglicherweise funktionell intakten Protein und einer großen Anhäufung von mutiertem und dadurch funktionslosem Protein nicht immer sicher unterschieden werden<sup>100</sup>. Dies stellt einen Nachteil gegenüber der DNA-Analyse dar (z.B. (PCR) und Next Generation Sequencing (NGS)<sup>101</sup>), welche allerdings teurer und aufwendiger sind. Die Vorteile der Immunhistochemie überwiegen weiterhin in ihrer eher weniger aufwändigen Auswertung, ihrer Kosteneffizienz und der Möglichkeit der Nutzung des vorhandenen Untersuchungsmaterials<sup>86</sup>.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Biopsien kann bei einem geringem Gehalt an Tumorzellen bzw. Material insgesamt schwierig sein<sup>86</sup>: In einer Biopsie mit spärlichem Tumorzellgehalt muss ein invasiver Bereich gefunden werden, der homogen

gefärbt ist. Des Weiteren können aus kleinen Biopsaten nur wenige Stufenschnitte gewonnen werden. Je nach Schnittebene kann es auch passieren, dass kein invasives Tumorgewebe in den tieferen Schnittstufen mehr zu finden ist.

Die Auswertung der Resektate gestaltet sich bei der Gruppe der „Responder“ speziell der Gruppe der als Dworak 3 reagierenden Patienten ebenfalls schwierig. Diese haben nur noch vereinzelte Tumorrestzellen, die in der Hämatoxylin/Eosin Färbung schon schwer aufzufinden sind und bei schwacher immunhistochemischer Reaktion wenig sichtbar sind.

Bei der Auswertung wurde zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Färbung (p21 und p53), bzw. der Färbung von intakten Zellen, Apoptosen und „Schmutznekrosen“ (Caspase-3) unterschieden, da hier deutliche Unterschiede aufgefallen sind und eine möglichst differenzierte Auswertung des Expressionsprofils erfolgen sollte.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden für die immunhistochemische Auswertung der nukleären p21-Expression geeignete Cut Off's bei 1% und 5% ermittelt. Da in der Literatur mit diversen unterschiedlichen Cut Off's in der Auswertung gearbeitet wurde, ist dies möglicherweise eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse, bezüglich des Vorhersagewertes der prädiktiven Marker.

#### 5.4.1 Prädiktive Relevanz des p21- Expressionsstatus

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim Rektumkarzinom die nukleäre p21-Expression in präoperativ entnommenen Biopsien positiv mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie korreliert ( $p < 0,0005$ ). Die zytoplasmatische p21-Expression zeigte hingegen kein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,456$ ). In der Literatur gibt es hinsichtlich des Vorhersagewertes des p21-Expressionsgrades bezüglich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie widersprüchliche Aussagen (Tab. 17, S. 74-76). Kim et al., Edden et al., Negri et al. und Chang et al. kamen in ihren Arbeiten (Anzahl der Patienten: 54, 152, 57 und 130) zu dem einheitlichen Ergebnis, dass der Expressionsgrad von p21 keinen Vorhersagewert bezüglich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie treffen könne<sup>74,102-104</sup>. Dabei unterschieden Kim et al. und Chang et al. jedoch nicht zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Färbung, sondern werteten die kumulative Expression semiquantitativ aus<sup>74</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine quantitative Auswertung vorgenommen und die Expressionsprofile hinsichtlich ihrer nukleären und zytoplasmatischen Färbung unterschieden. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die



im Vergleich zur Literatur diskordante Ergebnisse dar. Edden et al. und Negri et al. hingegen werteten nur die nukleäre p21-Expression semiquantitativ aus<sup>102,103</sup>. Negri et al. bestimmten den Grad der Tumorregression anhand der Größe des Resttumors. Dabei werteten sie verbliebene Tumormicrofoci anhand deren Durchmesser (0,3cm bis 0,9cm) aus<sup>103</sup>. Auch hier liegt der Unterschied zu dieser Arbeit, in der alle Resektate nach dem Regressionsgrading nach Dworak bewertet wurden, welches in den aktuellen Leitlinien enthalten ist<sup>39</sup>. Edden et al. bewerteten die Tumorregression jedoch nach Mandard<sup>102</sup>, was die Vergleichbarkeit zu dieser Arbeit einschränkt. Auch Wittekind weist auf eine unzureichend mögliche Vergleichbarkeit von Studien dieser Art hin, da bisher beim Rektumkarzinom noch kein einheitliches Regressionsgrading verwendet wird<sup>105</sup>. Sim et al. erhielten mit einer Patientenzahl von n=112 ein konträres Ergebnis zu dieser Arbeit: Demnach ist der Expressionsgrad von p21 als negativer Vorhersagewert bezüglich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie zu werten<sup>73</sup>. Sim et al. trafen jedoch keine Unterscheidung hinsichtlich nukleärer und zytoplasmatischer Färbung bei der Auswertung des Expressionsprofils<sup>73</sup>. In dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu bei quantitativer Auswertung der Expressionsprofile zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Expression von p21 unterschieden, was eine mögliche Erklärung für das konträre Ergebnis sein könnte.

Qiu et al. (Anzahl der Patienten: 72) bestätigen das Ergebnis dieser Arbeit wiederum indem sie zeigen konnten, dass der Expressionsgrad von p21 positiv mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie korreliert<sup>75</sup>. Qiu et al. haben den Expressionsgrad von p21 rein nukleär ausgewertet und keine zytoplasmatische Auswertung durchgeführt, was ebenfalls die Methodik und das Ergebnis dieser Arbeit bestätigt. Die Tumorresponse maßen sie anhand der T-Kategorie des Resektates: als Responder galten Patienten deren T-Kategorie kleiner war als die prätherapeutisch klinisch ermittelte, bzw. diejenigen mit vollständiger Regression, d.h. auch deren Arbeit ist nicht vollständig vergleichbar mit der vorliegenden.

Insgesamt zeigten sich zwischen allen untersuchten Arbeiten (Tab. 17, S.74-76) kleinere Unterschiede zwischen den angewandten neoadjuvanten Radiochemotherapien, was die Vergleichbarkeit der Expression von p21 mit dieser Arbeit zusätzlich einschränkt, jedoch nicht ausschließt, wie in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte.

p21 gehört zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren, speziell zur Cip/Kip Familie und besteht aus einer N-terminalen und aus einer C-terminalen Domäne. Es reguliert abhängig vom Tumorsuppressorgen p53 den Zellzyklus, indem es den Zyklus am Übergang von der G1 in die S-Phase und von der G2 in die M-Phase inhibiert<sup>106,107</sup>. Neuerdings nimmt man an, dass p21 je nach Lokalisation in der Zelle unterschiedliche Funktionen wahrnimmt: Im Zellkern reguliert p21 die Zellproliferation, indem es Cyclin-Kinase Komplexe und Transkriptionsfaktoren negativ beeinflusst und damit die DNA Replikation hemmt<sup>108,109</sup>. p21 kann den Zellzyklus auch positiv regulieren. Je nach Expressionsstatus kann p21 die Proliferation vorantreiben, indem es Cyclin/CDK4-6/Komplexe fördert und diese inhibitorisches p21 entziehen, umso den Weg zur weiteren Proliferation zu ebnen. Die Cyclin-Kinase-Komplexbildung kann jedoch nur im Kern stattfinden und so wird deren Aktivität durch die Senkung der resultierenden Kaskade deutlich vermindert<sup>106</sup>.

Dass p21 nicht „nur“ die Funktion des Tumorsuppressors erfüllt, wurde unter anderem auch von Gartel angenommen<sup>110</sup>. Dieser nimmt an, dass p21 auch als Onkogen fungieren kann, indem bestimmte Cyclin-Kinase-Komplexe wie beispielsweise CDK4 auch p21 unabhängig den Zellzyklus bestreiten können<sup>111</sup>.

Eine Funktion des nukleär exprimierten p21 Proteins besteht also in der Induktion des Zellzyklusarrest durch das Angreifen an den Checkpoints zwischen G2-Phase/Mitose und G1-Phase/S-Phase, das, falls in Tumorzellen auftretend, zu einer Verminderung des Tumorwachstums führt (Abb. 1, S.13). Wird weniger bzw. kein p21 nukleär exprimiert, kann dies auf eine verminderte Funktion des p21WAF1 Gens hindeuten. Die Replikationsschäden, die den Tumorzellen durch die neoadjuvante Radiochemotherapie zugefügt werden, führen dann möglicherweise zu keinem Tumorwachstumsarrest, da das funktionslose p21 nicht an den bekannten Checkpoints eingreifen kann und die Mitose nicht aufgehalten werden kann.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurde in dieser Arbeit bei der Auswertung der nukleären p21-Färbung der Biopsien ein Cut Off bei 1% festgelegt, wobei dies eine sehr hohe Sensitivität von 91,4% ergab. Dies bedeutet, dass mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit alle Patienten, die p21 nukleär exprimieren und schließlich als „Responder“ auf die neoadjuvante Radiochemotherapie reagieren, detektiert werden können. Allerdings liegt bei einem Cut Off von 1% die Spezifität nur bei 30,4%, d.h. „Non-Responder“, die als p21 negativ zu werten waren, werden nicht mit ausreichender

Sicherheit erkannt. Bildet man den Cut Off bei 5% steigt die Spezifität auf 82,6% und p21 negative „Non-Responder“ können mit einer höheren Wahrscheinlichkeit erkannt werden, die Sensitivität liegt hier bei 57,1%.

Daher ist es sinnvoll, die zwei Cut Off's bei der nukleären Auswertung der mittels p21-Antikörper gefärbten Biopsien zu kombinieren. So konnten drei Subgruppen gebildet werden: Die negativen Patienten mit einer 0%-Expression, Patienten mit einem Expressionsgrad zwischen 1-4% und Patienten mit einem Expressionsgrad von 5% und >. Der Anteil an Respondern in diesen Subgruppen stieg signifikant monoton an, das heißt, die Wahrscheinlichkeit gut auf die neoadjuvante Radiochemotherapie anzusprechen, steigt mit der Anzahl an nukleär p21-gefärbten Tumorzellen in der Biopsie signifikant an ( $p < 0,0005$ ). Ab einem Anteil von 5% an nukleär p21-gefärbten Tumorzellen, lag der Anteil an Respondern in dieser Arbeit bei 62,5%.

In der binären logistischen Regression zeigte sich, dass bei einem Cut Off von 5% bei der nukleären p21-Expression der Biopsate das höchste Bestimmtheitsmaß (siehe Tab. 16b, S. 61 :  $R^2 = 0,5$ ) erreicht wird, das heißt, dass hier der höchste Teil der Varianz der abhängigen Variablen erklärt wird. Zudem zeigte sich, dass p21 bei einem Cut Off von 5% und p21 unterteilt in drei Gruppen als unabhängige Prädiktoren bezüglich der Response fungieren ( $p = 0,002/p = 0,006$ ).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass der zytoplasmatische Expressionsgrad beim Vergleich der Biopsien und der Resektate unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie signifikant anstieg ( $p < 0,0005$ ).

Romanov et al. schlagen hierzu vor, dass die Funktion von p21 deutlich von der Lokalisation abhängt. Im Zytoplasma lokalisiertes p21 soll eher eine zum Zellkern gegenteilige Funktion übernehmen: Es gibt Hinweise, dass es antiapoptotisch also onkogenetisch wirken soll, indem seine Funktion durch Phosphorylierung vermindert wird und es sich schlussendlich im Zytoplasma ansammelt<sup>108</sup>.

Im Zytoplasma auftretendes p21 fungiert also möglicherweise im Gegensatz zu nukleär auftretendem p21 als Onkogen, indem es die Zellproliferation anregt, die Apoptose inhibiert und die Zellmigration durch verstärkten Umbau des Zytoskeletts anregt<sup>106</sup>. Es wird allerdings nicht angegeben, ab welchem Expressionsgrad p21 im Zytoplasma als aktiv funktionsfähig gilt. Der zytoplasmatische Expressionsgrad von p21 in der Biopsie korreliert in dieser Arbeit nicht mit dem Regressionsgrading nach Dworak ( $p = 0,456$ ).

#### 5.4.2 Prädiktive Relevanz des p53- Expressionsstatus

In dieser Studie konnte keine Korrelation zwischen dem nukleären ( $p= 0,677$ ) und dem zytoplasmatischen ( $p= 0,82$ ) p53-Status der präoperativ entnommenen Biopsien und der Response des Tumors auf die neoadjuvante Radiochemotherapie festgestellt werden. Eine Analyse bezüglich der Entwicklung der p53-Expression unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie, indem der Expressionsgrad der Biopsie mit dem des korrespondierenden Resektates verglichen wird, erscheint hier nicht sinnvoll. Die mittels Wilcoxon-Signed-Rank-Test gemessene Expressionsdifferenz, die schon geringe Prozentgrade nachweist, ist für p53 wahrscheinlich nicht relevant hinsichtlich des Mutationsstatus. p53 steht bei einer immunhistochemischen Überexpression bzw. einem hohem Expressionsgrad in Verdacht mutiert zu sein und somit funktionsunfähig. Es lässt sich immunhistochemisch also nicht unterscheiden, ob es sich im vorliegenden Präparat um eine funktionslose Mutation oder um einen funktionstüchtigen stark exprimierten Wildtyp handelt. Yemelyanova et al. untersuchten das Ovarialkarzinom hinsichtlich der immunhistochemischen p53-Expression und dem genetischen p53-Mutationsstatus: aufgrund der diskordanten genetischen Analysen sollten Expressionsgrade  $>50\%$  und  $<10\%$  nicht ohne weiteres als Wildtyp gewertet werden<sup>112</sup>. Hierfür wäre eine Genanalyse notwendig.

Eine prädiktive Relevanz konnte für p53 in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Das Tumorsupressorgen p53 ist ein häufig untersuchtes Gen beim kolorektalen Karzinom und greift als Transkriptionsfaktor direkt in den Zellzyklus ein<sup>113</sup>. Bei fehlerhafter DNA kommt es so zu einer Anhäufung des Proteins<sup>56</sup>, welche über die Induktion von p21 am Übergang von der G2 zur M-Phase und von der G1 zur S-Phase zum Zellzyklusarrest führt (Abb.1, S.13). Währenddessen werden verschiedene Reparaturmechanismen in Gang gesetzt. Falls keine adäquate Reparatur möglich ist, wird über weitere Kaskaden die Apoptose der Zelle eingeleitet<sup>59,60</sup>. Des Weiteren können Missense- oder Non-sense-Mutationen die Funktion des p53-Wildtyps herabsetzen, bzw. ausschalten<sup>112,114</sup>. Diverse Erkrankungen, die mit einer stark erhöhten Malignombildung einhergehen, resultieren daraus. Als bekanntes Beispiel hierfür gilt das Li-Fraumeni-Syndrom, bei welchem schon in jungen Jahren eine Vielzahl von bösartigen Tumorerkrankungen auftreten, da fehlerhafte DNA Replikationen aufgrund von funktionslosem p53 nicht erkannt und aufgehalten werden können<sup>115</sup>.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen bezüglich des Vorhersagewertes von p53 hinsichtlich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie (Tab. 17,

S. 74-76). Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Untersuchung der Korrelation des Expressionsgrades von p53 und der Reaktion des Tumors auf die neoadjuvante Radiochemotherapie bzw. der Prognose des Langzeitüberlebens. Die Meinungen differieren zwischen negativer Korrelation<sup>116</sup> und (wovon die Mehrzahl ausgeht) keiner Korrelation<sup>72,73,75,102-104,117</sup>. Edden et al., Sim et al. sowie Chang et al. erhielten bei einem ähnlich großen Patientenkollektiv (Anzahl der Patienten: 152, 112 und 130 Patienten) bei semiquantitativer Auswertung des Expressionsgrades von p53 in der präoperativen Biopsie ebenfalls keine Korrelation mit dem Regressionsgrad des Resektats. Edden et al. werteten nur die nukleäre p53-Färbung der Tumorzellen<sup>102</sup>, Sim et al. und Chang et al. hingegen ließen in die Bewertung der Färbung auch zusätzlich zur nukleären auch die zytoplasmatische Färbung miteinfließen und unterschieden hierbei nicht im Expressionsprofil<sup>73,104</sup>. Edden et al. bewerteten die Tumorresponse anhand des Regressionsgradings nach Mandard<sup>102</sup>, was die Vergleichbarkeit zu dieser Arbeit einschränkt. Sim et al. und Chang et al. verwendeten wie in dieser Arbeit das Dworak Grading<sup>73,104</sup>. Auch Studien mit kleineren Patientenkollektiven wie Lopez-Crapez et al. und Qui et al. (Anzahl der Patienten: 70 und 72 Patienten) konnten keine signifikante Korrelation finden<sup>117</sup>. Sie evaluierten die rein nukleäre p53-Färbung der Tumorzellen und können daher zum direkten Vergleich herangezogen werden. Lopez-Crapez et al. quantifizierten die Tumorresponse nach einem 3-stufigen Grading nach Wheeler<sup>118</sup>, Qiu et al. maßen die Tumorresponse anhand der T-Kategorie des Resektats: als Responder galten Patienten deren T-Kategorie kleiner war als die prätherapeutisch klinisch ermittelte bzw. diejenigen mit vollständiger Regression<sup>75</sup>, d.h. auch deren Arbeit ist nicht vollständig vergleichbar mit unserer.

Spitz et al. konnten bei semiquantitativer Auswertung und einer Patientenzahl von 42 eine signifikante negative Korrelation des präoperativen nukleären p53-Expressionsgrades mit der Tumorresponse zeigen<sup>116</sup>.

Ein Grund für das Ergebnis könnte sein, dass bei der Bewertung des Ansprechens des Tumors auch der Lymphknotenstatus mitbetrachtet wurde und nicht das Regressionsgrading nach Dworak vorgenommen wurde, wie in dieser Studie. Des Weiteren betrachteten Spitz et al. nur die nukleäre Expression von p53, die zytoplasmatische Expression wurde in der Betrachtung und Auswertung nicht miteinbezogen<sup>116</sup>.

Diese widersprüchlichen Studienergebnisse könnten auf die hohe Mutationsrate von p53 zurückzuführen sein, die in der immunhistochemischen Analyse nicht sicher von

einem hohen Expressionsgrad zu unterscheiden ist, allerdings in der Funktion von p53 zu einem wesentlichen Unterschied führt. Ein mutiertes p53-Gen ist funktionslos, ein hoher Expressionsgrad eines funktionstüchtigen p53-Gens würde den Tumorstoffwechsel negativ beeinflussen und könnte damit zu einem eher positiven Krankheitsverlauf führen und die Prognose günstig beeinflussen. Allerdings kann diese Theorie für das Rektumkarzinom in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

**Tabelle 17: Literaturüberblick zu bisherigen Arbeiten zu den prädiktiven Markern p21, p53 und weiteren**

<b>Autoren</b>	<b>N</b>	<b>Art der NRCT</b>	<b>Marker</b>	<b>Auswertung</b>	<b>Prä/Post</b>	<b>Ergebnis</b>
Kim et al. <sup>74</sup>	54	GD: 50,4 Gy in 28 Fraktionen und 5-FU (500 mg/qm/Tag) i.V. oder oral Capecitabine (1650 mg/qm/Tag) parallel	Survivin, p21, weitere	Semiquantitativ, keine Unterscheidung zw. nukleärer u. zytoplasmatischer Färbung	Prä	-, 0
Bertolini et al. <sup>119</sup>	91	GD: 50 Gy in 25 Fraktionen und 5-FU(225 mg/qm/Tag) über 5 Wochen	p21, MIB-1, EGFR	P21 u. MIB-1: Cut off bei 20% EGFR: Cut off bei 1%	Post	-, -, +
Sim et al. <sup>73</sup>	112	GD: 45 Gy mit Tumorboost 50,4 Gy über 5,5 Wochen und Capicitabine (825/qm/2xTag) oder 5-FU (400 mg/qm) oder Leucovorin (20 mg/qm) beide als Injektion über 4 Tage	p21, CD116, p53	Semiquantitativ, keine Unterscheidung zw. nukleärer u. zytoplasmatischer Färbung	Prä	-, -, 0
Rödel et al. <sup>72</sup>	44	GD: 50,4 Gy in werktäglichen Fraktionen und während der 1. und 5. Woche 5-FU(100 mg/qm/Tag) i.V., T-4 Patienten zusätzlich Oxilaplatin (20 mg/qm/Tag) an den Tagen 1-5 und 29-33	p53 und weitere	Semiquantitativ	Post	0

**Fortsetzung Tabelle 17 auf S. 75**

### Fortsetzung Tabelle 17

Autoren	N	Art der NRCT	Marker	Auswertung	Prä/Post	Ergebnis
Edden et al. <sup>102</sup>	152	45 Gy über 5-6 Wochen mit Tumorboost 50,4 Gy bei 28 Fraktionen und 5-FU (225 mg/qm/Tag) i.v. oder Capecitabine (825/mg/qm/2xTag)	p53, p21 , APAF-1, VEGF, Cox-2	Semiquantitative, nukleäre p53 und p21 Auswertung	Prä u. Post	0, 0, +, -, -
Lopez-Crapez et al. <sup>117</sup>	70	GD: 45 Gy, Ed: 1,8 Gy teilweise Tumorboost mit 15 Gy, nur 4 Pat. erhielten 5-FU (400 mg/qm/Tag) und Leucovorin (10 mg/100 mg/qm/Tag) je nach Zyklus	p53	Semiquantitative, nukleäre Auswertung	Prä	0
Qiu et al. <sup>75</sup>	72	GD 45 Gy in 25 Fraktionen über 5 Wochen mit Tumorboost 54 Gy, parallel bei 72% d. Pat. Parallel Chemotherapie	p21, p53 und weitere	p21: Cut off bei 10%, nukleäre Auswertung p53: Cut off bei 25%, nukleäre Auswertung	Prä u. post	+, 0
Negri et al. <sup>103</sup>	57	38 Pat. GD: 40 Gy in 16 Fraktionen, 19 Pat. GD: 45 Gy in 25 Fraktionen mit 5-FU(200 mg/qm/Tag) und Oxaliplatin (60 mg/qm/Woche)	p53, p21, Thymilidate Synthase und weitere	p53, p21: Cut off bei 10%, nukleäre Auswertung Thymilidate Synthase: semiquantitativ	Prä	0, 0, +

Fortsetzung Tabelle 17 auf S. 76



### Fortsetzung Tabelle 17

Autoren	N	Art der NRCT	Marker	Auswertung	Prä/Post	Ergebnis
Chang et al. <sup>104</sup>	130	GD: 50,4 Gy und 2 Zyklen 5-FU (400 mg/qm/Tag) oder Capecitabine (1650 mg/qm/Tag) und Leucovorin (20 mg/qm/Tag)	p53, p21, BAX und weitere	Semiquantitativ, keine Unterscheidung zw. nukleärer und zytoplasmatischer Färbung	Prä	0, 0, +
Moore et al. <sup>120</sup>	67	Mind. GD=45 Gy in 25-26 Fraktionen mit Tumorboost 50,4 Gy und 40 Pat. 5-FU mit Leucovorin	p53, p21, p27 und weitere	p21 und p27: Cut off bei 10% p53: Cut off bei 5%	Post	0, 0, -
Spitz et al. <sup>116</sup>	42	GD: 45 Gy, ED: 1,8 Gy in 25 Fraktion und 5-FU (300mg/qm/Tag) i.v.	p53	Semiquantitative, nukleäre Auswertung	Prä	-

#### Legende:

Prä= Immunhistochemische Expressionsanalyse vor neoadjuvanter Radiochemotherapie

Post= Immunhistochemische Expressionsanalyse nach neoadjuvanter Radiochemotherapie

Kein signifikanter Effekt auf die Wirkung der NRCT= 0

Positiver signifikanter Effekt auf die Wirkung der NRCT= +

Negativer signifikanter Effekt auf die Wirkung der NRCT= -

#### 5.4.3 Prädiktive Relevanz der Caspase-3

Unter der Hypothese, dass eine a priori erhöhte Neigung der Tumorzellen zur Apoptose mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Therapie korrelieren könnte, wurde das Apoptose ausführende Molekül Caspase-3 immunhistochemisch untersucht. In dieser Studie konnte der Caspase-3 keine prädiktive Relevanz hinsichtlich des Ansprechens auf die neoadjuvante Radiochemotherapie nachgewiesen werden. In der Auswertung der Biopsien wurde zwischen der Färbung der Apoptosen, der intakten Zellen und der

„Schmutznekrosen“ unterschieden. Bei quantitativer Auswertung korrelierten die mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen ( $p=0,558$ ) und intakten Zellen ( $p=0,863$ ) nicht mit der Response auf die neoadjuvante Radiochemotherapie. Die „Schmutznekrosen“<sup>77</sup> korrelierten bei semiquantitativer Auswertung ebenfalls nicht mit der Response ( $p=0,204$ ).

Insgesamt veränderte sich der Anteil an mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen unter der neoadjuvaten Radiochemotherapie nicht signifikant ( $p=0,213$ ). Allerdings erhöhte sich der Anteil an mittels Caspase-3-gefärbten intakten Zellen unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie signifikant ( $p<0,0005$ ), ebenso wie der Anteil an mittels Caspase-3-gefärbten „Schmutznekrosen“ ( $p=0,028$ ). Dies zeigt, dass die Tumorzellen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie reagieren und die Caspase-3 als Reaktion darauf vermehrt exprimiert wird. Eine prädiktive Relevanz kann der Caspase-3 jedoch zumindest in dieser Studie nicht nachgewiesen werden.

Die Caspase-3 zählt zu den Apoptose ausführenden Proteinen, genauer zu den cystein-aspartic-acid Proteasen<sup>121</sup>. Sie spaltet am Zielprotein Peptidbindungen C-Terminal von Aspartat. Die Caspase-3 wird als inaktive Pro-Caspase-3 von den Vorläuferproteinen wie Caspase-8 und -9 durch proteolytische Spaltung aktiviert und reiht sich als aktive Form in die Kaskade ein und führt die Zelle schlussendlich ebenfalls in die Apoptose<sup>61-63</sup> (Abb. 1, S. 13). Dabei spaltet sie die Poly-ADP-Ribose-Polymerase, ein DNA-Reparaturenzym und Gelsolin, ein Zytoskelettprotein, wodurch die Zelle zu einem so genannten „apoptotic body“ wird<sup>61</sup>.

De Heer et al. konnten einen Anstieg der enzymatischen Aktivität der Caspase-3 messen, allerdings ohne immunhistochemischen Vergleich<sup>122</sup>. Mit einer erhöhten enzymatischen Aktivität der Caspase-3 gehe nach ihren Ergebnissen allerdings eine erhöhte Rezidivgefahr einher (Tab. 18, S. 78). Hier stellt sich jedoch die Frage, ab welchem Grad die Caspase-3 als erhöht gilt. Für die Immunhistochemie gibt es hier noch keine Erkenntnisse. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Jonges et al. 2001 (Tab. 18, S. 78), allerdings maßen sie die enzymatische Aktivität posttherapeutisch und schlossen auch Kolonkarzinome mit ein<sup>123</sup>.

**Tabelle 18: Literaturüberblick zu bisherigen Arbeiten zur Caspase-3**

Autoren	N	Marker	Auswertung	Prä/Post	Ergebnis
Heer et al. <sup>122</sup>	47	Caspase-3	Messung der enzymatischen Aktivität	Prä	Höhere Rezidivgefahr
Jonges et al. <sup>123</sup>	60	Caspase-3 und M30	Messung der enzymatischen Aktivität und Immunhistochemie	Post	höhere Rezidivgefahr, 0 Tumorgroße

**Legende:**

Prä= Immunhistochemische Expressionsanalyse vor neoadjuvanter Radiochemotherapie

Post= Immunhistochemische Expressionsanalyse nach neoadjuvanter Radiochemotherapie

Kein signifikanter Effekt auf die Wirkung der NRCT= 0

### 5.5 Zusammenfassende Diskussion

Die nukleäre p21-Expression der Biopsien korrelierte signifikant mit der Tumorresponse. Bildet man bei der Auswertung einen Cut off von 1% erhält man eine weniger große Spezifität dafür eine höhere Sensitivität als bei einem Cut off von 5%. Bei der Kombination beider und der Bildung dreier Gruppen (Gruppe eins: 0%-ige Expression, Gruppe zwei: 1-4%-ige Expression, Gruppe drei: 5%-ige Expression und >) erhält man einen monotonen Anstieg innerhalb der Gruppe der Responder. Mittels der beschriebenen Cut Off's können bei der nukleären p21-Expression drei Gruppen gebildet werden: „Responder“, „Non-Responder“ und „intermediate“. Die zytoplasmatische p21-Expression der Biopsien korrelierte nicht mit der Tumorresponse.

Vergleicht man die Expressionsgrade in korrespondierenden Biopsien und Resektaten nimmt die zytoplasmatische p21-Expression unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie zu. Für die nukleäre p21-Expression ist keine signifikante Veränderung unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie erkennbar. Die nukleäre und zytoplasmatische p53-Expression in den Biopsien korrelierten nicht mit der Tumorresponse. Die mittels Caspase-3-gefärbten intakten Zellen und Apoptosen sowie die „Schmutznekrosen“ der Biopsien korrelierten nicht mit der Tumorresponse. Vergleicht man die korrespondierenden Biopsate und Resektate nehmen die mittels Caspase-3-gefärbten intakten Zellen und die „Schmutznekrosen“ unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie zu. Bei den mittels Caspase-3-gefärbten Apoptosen ist keine signifikante Veränderung unter der neoadjuvanten Radiochemotherapie erkennbar. Die ypT-Kategorie sowie die ypN-Kategorie korrelierten signifikant mit der Response. Der Nikotinabusus der Patienten hat einen negativen Einfluss auf die Tumorresponse.

#### 5.6 Schlussfolgerung

Die nukleäre p21-Expression könnte als prädiktiver Marker für die Tumorresponse auf die neoadjuvante Radiochemotherapie fungieren. Weitere, prospektive Studien an größeren Patientenkollektiven sollten dies aufgrund der bisher widersprüchlichen Studienlage weiterhin untersuchen.

Dem negativen Einfluss von Nikotin auf die Tumorresponse könnte ein veränderter Stoffwechsel zu Grunde liegen, oder auch eine verminderte kapilläre Durchblutung, welche die Reaktionen auf die neoadjuvante Radiochemotherapie herabsetzen.

In zukünftigen Arbeiten könnten die immunhistochemischen Expressionsanalysen mit genetischen Analysen verglichen werden, um die Translation von Gen zu Proteinebene zu untersuchen und Mutationen auf Genebene nachweisen zu können. Der Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und Response sollte an größeren Kollektiven weiterhin untersucht werden um rauchenden Patienten genauere Prognosen hinsichtlich des Therapieansprechens geben zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:359-86.
2. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015;26:779-86.
3. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C. Krebs in Deutschland 2009/2010, Robert-Koch-Institut und Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland. 2013:36-9.
4. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383:1490-502.
5. Zimmermann F, Papachristofilou A. Fortbildung Coloproctology: Epidemiologie, Pathologie und Diagnostik des Rektumkarzinoms. *Coloproctology* 2007;29:215-24.
6. Hiddemann W, Bartram C. Die Onkologie-Kapitel 43: Kolon- und Rektumkarzinom. Springer Verlag, 2010:854.
7. Hauser H. Das Kolorektale Karzinom- Teil 1: Epidemiologie, Präkanzerosen Primär und Sekundärprävention. *Journal für Gastroenterologische und hepatische Erkrankungen* 2004;4:6-11.
8. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J cancer*. 2002;98:241-56.
9. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of Meat, Fat, and Fiber Intake to the Risk of Colon Cancer in a Prospective-Study among Women. *New Engl J Med*. 1990;323:1664-72.
10. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut*. 2003;52:861-7.
11. Wei PL, Chang YJ, Ho YS, Lee CH, Yang YY, An J, Lin SY. Tobacco-specific carcinogen enhances colon cancer cell migration through alpha-7-nicotinic acetylcholine receptor. *Ann of Surg*. 2009;249:8.
12. Murphy TK, Calle EE, Rodriguez C, Kahn HS, Thun MJ. Body mass index and colon cancer mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol*. 2000;152:847-54.
13. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *New Engl J Med*. 1994;331:1669-74.
14. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *New Engl J Med*. 2003;348:919-32.
15. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:7-17.
16. Barrow E, Hill J, Evans DG. Cancer risk in Lynch Syndrome. *Fam cancer*. 2013;12:229-40.
17. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 1999;36:801-18.

18. Ponti G, Castellsague E, Ruini C, Percesepe A, Tomasi A. Mismatch repair genes founder mutations and cancer susceptibility in Lynch syndrome. *Clin Genet.* 2014;87:507-16.
19. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Human Mutat.* 1994;3:121-5.
20. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.
21. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.
22. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl J Med.* 1988;319:525-32.
24. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.
25. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:7555-9.
26. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.
27. Jung SB, Lee HI, Oh HK, Shin IH, Jeon CH. Clinico-pathologic Parameters for Prediction of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res Treat.* 2012;44:179-86.
28. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-7.
29. Dietmaier W. [Microsatellite instability. A new predictive marker (?)] (Article in German). *Pathologe* 2010;31 Suppl 2:268-73.
30. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
31. Buhr HJ, Dommisch K, Fleischer G-M, Gastinger I, Grundmann RT, Hermanek P, Hopt UT, Jauch KW, Junginger Th, Köckerling F, Merkel S, Raab HR, Roder J, Schwenk W, Tannapfel A, de Vries A. Klinischer Ablaufpfad (Workflow) zu Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Rektumkarzinoms. *Zentralbl Chir.* 2006;131:185-97.
32. Aldridge MC, Phillips RK, Hittinger R, Fry JS, Fielding LP. Influence of tumour site on presentation, management and subsequent outcome in large bowel cancer. *Br J Surg.* 1986;73:663-70.
33. Willis S, Schumpelick V. *Praxis der Viszeralchirurgie- Kapitel: Rektumkarzinom.* Springer Verlag; 2006:642-59.
34. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. *WHO Classification of Tumors of the Digestive System- Chapter 8: Tumors of the colon and rectum.* Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2010: 138.
35. Wittekind C, Meyer HJ. *TNM Classification of Malignant Tumors, 7th Edition- Colon and Rectum: 2010 WILEY- VCH Verlag GmbH&Co.; 2009: 94-99.*
36. Wittekind C, Koch H. *Empfehlungen zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des kolorektalen Karzinom. Empfehlungen Kolorektales Karzinom, Berufsverband Deutscher Pathologen eV 2005:1-40.*
37. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 1997;12:19-23.

38. Tischoff I, Tannapfel A. Regressionsgrading bei gastrointestinalen Tumoren. *Pathologe* 2012;33:53-60.
39. Pox C AS, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W, Holstege a, Hübner J, Kolligs F, Kreis M, Lux P, Ockenga J, Porschen R, Post S, Rahner N, Reinacher-Schick A, Riemann JF, Sauer R, Sieg A, Scheppach W, Schmitt W, Schmoll HJ, Schulmann K, Tannapfel A, Schmiegel W. S-3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. Leitlinienprogramm Onkologie 2014:141.
40. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel 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. *New Engl J Med.* 2004;351:1731-40.
41. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska-Guttmejer A, Michalski W, Bebenek M, Pudielko M, Kryi M, Oledzki J, Szmeja J, Sluszniaik J, Serkies K, Kladny J, Pamucka M, Kukolowicz P. Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* 2004;72:15-24.
42. Kruspe S, Hahn U. An aptamer intrinsically comprising 5-fluoro-2'-deoxyuridine for targeted chemotherapy. *Angew Chemie Int Ed Engl.* 2014;53:10541-4.
43. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:330-8.
44. Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J. Dependence of 5-fluorouracil-mediated radiosensitization on DNA-directed effects. *Int Journal Radiat Oncol, Biol, Phys.* 1994;29:519-23.
45. Sauer H. Systemische Zytostatische Chemotherapie. *Internist* 1998;39:1104-14.
46. Molls M. Praxis der Viszeralchirurgie- Onkologische Chirurgie Band I- Kapitel 14: Prinzipien der Strahlentherapie: Springer; 2001: 253.
47. Kreuzeder J. Effekte von Bestrahlung mit Gamma-Strahlen und Chemotherapie mit Paclitaxel auf Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main; 2008.
48. Röper B, Molls M. Praxis der Viszeralchirurgie- Onkologische Chirurgie Kapitel 26: Prinzipien der Strahlentherapie und der kombinierten Radio-Chemotherapie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006: 233-246.
49. Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, Füzesi L, Klimpfing M, Fietkau R, Liersch T, Hohenberger W, Raab R, Sauer R, Wittekind C. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:8688-96.
50. Roy P, Serra S, Kennedy E, Chetty R. The prognostic value of grade of regression and oncocytic change in rectal adenocarcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Surg Oncol.* 2012;105:130-4.
51. Gosens MJ, Klaassen RA, Tan-Go I, Rutten HJ, Martijn H, van den Brule AJ, Nieuwenhuijzen GA, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Circumferential margin involvement is the crucial prognostic factor after multimodality treatment in patients with locally advanced rectal carcinoma. *Clin cancer Res.* 2007;13:6617-23.
52. Marr R, Birbeck K, Garvican J, Macklin CP, Tiffin NJ, Parsons WJ, Dixon MF, Mapstone NP, Sebag-Montefiore D, Scott N, Johnston D, Sagar P, Finan P, Quirke P. The Modern Abdominoperineal Excision- The Next Challenge After Total Mesorectal Excision. *Ann Surg.* 2005;242:74-81.

53. Ptok H, Marusch F, Meyer F, Schubert D, Gastinger I, Lippert H. Impact of anastomotic leakage on oncological outcome after rectal cancer resection. *Br J Surg.* 2007;94:1548-54.
54. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
55. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med.* 1995;1:570-7.
56. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:594-604.
57. Demetrick DJ, Matsumoto S, Hannon GJ, Okamoto K, Xiong Y, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet.* 1995;69:190-2.
58. Lancet D, Safran M, Rosen N, Stelzer G, Tsippi IS, Bahir I, Rappaport N, Twik M, Fishilevich S, Kohn A, Edri O, Plaschkes I, Lieder I, Kaplan S, Mazor Y. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN1A&keywords=CDKN1A,i>  
Stand: 11/2015.
59. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
60. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998;282:1497-501.
61. Kliche KO, Clement JH, Höffken K. Apoptose. *Der Onkologe: Molekulare Onkologie* 1999;10:891-8.
62. Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolff BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS . Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem.* 1998;273:27084-90.
63. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
64. 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.
65. Seicean R, Crisan D, Boers JE, Mocan T, Seicean A, Funariu G, Ciuce C. The prognostic role of apoptosis mediators in rectal adenocarcinoma. *Hepato-gastroenterology* 2011;58:1490-4.
66. Kruschewski M, Mueller K, Lipka S, Budczies J, Noske A, Buhr HJ, Elezkurtaj S. The Prognostic Impact of p53 Expression on Sporadic Colorectal Cancer Is Dependent on p21 Status. *Cancers* 2011;3:1274-84.
67. 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;22:3-9.
68. Theodoropoulos GE, Karafoka E, Papailiou JG, Stamopoulos P, Zambirinis CP, Bramis K, Panoussopoulos SG, Leandros E, Bramis J. P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of 'old' tissue markers in patients with long follow-up. *Anticancer Res.* 2009;29:785-91.



69. Kressner U, Lindmark G, Gerdin B, Pahlman L, Glimelius B. Immunohistological p53 staining is of limited value in the staging and prognostic prediction of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 1996;16:951-7.
70. Hoffmann AC, Hartmann A, Schmid KW, Schuler M. Biomarker für die individualisierte Behandlung solider Tumoren. *Onkopipeline* 2009;2:134-40.
71. Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol, Biol, Phys.* 2009;74:673-88.
72. Rödel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Günther K, Schick C, Peters A, Sauer R, Rödel F. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol, Biol, Phys.* 2002;52:294-303.
73. Sim SH, Kang MH, Kim YJ, Lee KW, Kim DW, Kang SB, Eom KY, Kim SJ, Lee HS, Kim JH. P21 and CD166 as predictive markers of poor response and outcome after fluorouracil-based chemoradiotherapy for the patients with rectal cancer. *BMC cancer* 2014;14:241-9.
74. Kim K, Chie EK, Wu HG, Kim SG, Lee SH, Kang GH, Hyun CL, Ha SW. High survivin expression as a predictor of poor response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26:1019-23.
75. 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;43:451-9.
76. Stiphout RGPMv, Valentini V, Buijsen J, Lammering G, Meldolesi E, van Soest J, Leccisotti L, Giordano A, Gambacorta MA, Dekker A, Lambin P. Nomogram predicting response after chemoradiotherapy in rectal cancer using sequential PETCT imaging: A multicentric prospective study with external validation. *Radiother Oncol.* 2014;113:215-22.
77. Li L, Jiang W, Yang Y, Chen Z, Feng C, Li H, Guan G, Chen J. Identification of dirty necrosis in colorectal carcinoma based on multiphoton microscopy. *J Biomed Opt.* 2014;19:066008.
78. Lang G. *Histotechnik- Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik- Kapitel 5: Fixierung.* Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer; 2013: 57.
79. Elezkurtaj S, Moser L, Budczies J, Müller AJ, Bläker H, Buhr HJ, Kruschewski M. Histopathological regression grading matches excellently with local and regional spread after neoadjuvant therapy of rectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2013;209:424-8.
80. Beddy D, Hyland JM, Winter DC, Lim C, White A, Moriarty M, Armstrong J, Fennelly D, Gibbons D, Sheahan K. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:3471-7.
81. Losi L, Luppi G, Gavioli M, Lachetta F, Bertolini F, D'Amico R, Jovic G, Bertoni F, Falchi AM, Conte PF. Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis.* 2006;21:645-51.
82. Shin JS, Jalaludin B, Solomon M, Hong A, Lee CS. Histopathological regression grading versus staging of rectal cancer following radiotherapy. *Pathology* 2011;43:24-30.
83. Bosetti C, Levi F, Rosato V, Bertuccio P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *Int J cancer.* 2011;129:180-91.

84. Mühlhardt C. Der Experimentator Molekularbiologie Genomics, Kapitel 4: Die Polymerase-Kettenreaktion: Springer; 2013:84-120.
85. Cremer T, Jauch A, Ried T, Schröck E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Deutsches Ärzteblatt 1995;92:1593-601.
86. Rüschoff J, Zielinski D, Heinmöller E. Neue Entwicklungslinien der Immunhistologie. Pathologe 2013;34:226-9.
87. Tan D, Lynch H. Principles of Molecular Diagnostics and Personalized Cancer Medicine- Chapter 54: Personalized Medicine and Targeted Therapy for Colorectal Cancer (Hubbard JM, Grothey A): LWW; 2013.
88. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, Kerner BA, Taylor CW, Aquilar PS, Khanduja KS. T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. Dis Colon Rectum 2002;45:895-903.
89. Gavioli M, Luppi G, Losi L, Bertolini F, Santantonio M, Falchi AM, D'Amico R, Conte PF, Natalini G. Incidence and clinical impact of sterilized disease and minimal residual disease after preoperative radiochemotherapy for rectal cancer. Dis Colon Rectum 2005;48:1851-7.
90. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, Moriarty M, Fennelly D, Sheahan K. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. Histopathology 2005;47:141-6.
91. Kulu Y, Büchler M, Ulrich A. Strahlentherapie assoziierte Morbidität und Mortalität in der Rektumchirurgie. Der Chirurg 2013;11:951-6.
92. Kulu Y, Ulrich A, Büchler M. Resectable Rectal Cancer: Which Patient Does Not Need Preoperative Radiotherapy? Dig Dis. 2012;30:118-25.
93. Joye I, Haustermans K. Early and late toxicity of radiotherapy for rectal cancer. Recent results cancer Res. 2014;203:189-201.
94. Cucina A, Dinicola S, Coluccia P, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqualato A, Bizzarri M. Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation and survival pathways. J Surg Res. 2012;178:233-41.
95. Dinicola S, Morini V, Coluccia P, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqualato A, Masiello MG, Palombo A, De Toma G, Bizzarri M, Cucina A . Nicotine increases survival in human colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. Toxicol in Vitro 2013;27:2256-63.
96. Wong H, Yu L, Lam E, Tai E, Wu W, Cho C. Nicotine promotes cell proliferation via alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2007;221:261-7.
97. Ye Y, Liu E, Shin V, Wu W, Luo J, Cho C. Nicotine Promoted Colon Cancer Growth via Epidermal Growth Factor Receptor, c-Src, and 5-Lipoxygenase-Mediated Signal Pathway. J Pharmacol Exp Ther. 2004;308:66-72.
98. Walter V, Jansen L, Hoffmeister M, Ulrich A, Chang-Claude J, Brenner H. Smoking and survival of colorectal cancer patients: population-based study from Germany. Int J cancer. 2015;137:1433-45.
99. Rivera C, Rivera S, Fabre E, Pricopi C, Le Pimpec-Barthes F, Riquet M. Consequences of tobacco smoking on lung cancer treatments. Rev Pneumol Clin. 2015; doi: 10.1016/j.pneumo.2014.11.009.

100. Bosch F, Homann N, Conradt C, Dietz A, Erber R. p53-Mutationen/p53-Proteinüberexpressionen Differentielle Bedeutung für die Progression von Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO* 1999;47:833-48.
101. Mardis E. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:847-402.
102. Edden Y, Wexner SD, Berho M. The use of molecular markers as a method to predict the response to neoadjuvant therapy for advanced stage rectal adenocarcinoma. *Colorectal Dis.* 2011;14:555-61.
103. Negri FV, Campanini N, Camisa R, Pucci F, Bui S, Ceccon G, Martinelli R, Fumagalli M, Losardo PL, Crafa P, Bordi C, Cascinu S, Ardizzoni A. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J cancer.* 2008;98:143-7.
104. Chang HJ, Jung KH, Kim DY, Jeong SY, Choi HS, Kim YH, Sohn DK, Yoo BC, Lim SB, Kim DH, Ahn JB, Kim IJ, Kim JM, Yoon WH, Park JG. Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:364-71.
105. Wittekind C, Oberschmied B. Pathologisches Staging und Response-Evaluation beim Rektumkarzinom. *Der Chirurg* 2012;5:423-9.
106. Romanov VS, Pospelov VA, Pospelova TV. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2012;77:575-84.
107. Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 1998;17:1691-703.
108. Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol.* 2013;25:52-8.
109. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
110. Gartel AL. p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *BioFactors* 2009;35:161-4.
111. Liu Y, Yeh N, Zhu XH, Leversha M, Cordon-Cardo C, Ghossein R, Sing B, Holland E, Koff A. Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1). *EMBO J.* 2007;26:4683-93.
112. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IeM, Kurman RJ. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol.* 2011;24:1248-53.
113. Inga A, Storici F, Darden TA, Resnick MA. Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell Biol.* 2002;22:8612-25.
114. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007;26:2157-65.
115. Agarwal R, Liebe S, Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, Munoz J, Schwab R, Rodon J, Kurzrock R, Subbiah V. Targeted therapy for hereditary cancer syndromes: hereditary breast and ovarian cancer syndrome, Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and Li-Fraumeni syndrome. *Discov Med.* 2014;18:331-9.

116. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N, Cleary KR, Skibber JM. p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1685-90.
117. Lopez-Crapez E, Bibeau F, Thezenas S, Ychou M, Simoni-Lafontaine J, Thirion A, Azra D, Grenier J, Senesse P. p53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: a prospective multilevel analysis. *Br J Cancer.* 2005;92:2114-21.
118. Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, Ekanyaka N, Kulacoglu H, Jones AC, George BD, Kettlewell MG. Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation: a proposal for a modified staging system. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1051-6.
119. Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Lachetta F, Dealis C, Jovic G, Deppeni R, Zironi S, Falchi AM, Luppi G, Conte PF. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol, Biol, Phys.* 2007;68:1455-61.
120. 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;11:955-61.
121. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kägi D, Hakem A, Mc Currach M, Khoo W, Kaufmann SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev.* 1998;12:806-19.
122. de Heer P, de Bruin EC, Klein-Kranenburg E, Aalbers RI, Marijnen CA, Putter H, de Bont, HJ, Nagelkerke JF, van Krieken JH, Vespaget HW, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Caspase-3 activity predicts local recurrence in rectal cancer. *Clin cancer Res.* 2007;13:5810-5.
123. Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde EA, Tollenaar RA, Fleuren GJ, van de Velde CJ, Morreau H, Kuppen PJ. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest.* 2001;81:681-8.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

APAF 1	Apoptotic protease activation factor 1
APC-Gen	Adenomatous-polyposis-coli Gen
BAX	Bcl2-assoziiertes X-Protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
CBF	Campus Benjamin Franklin
CCM	Campus Charité Mitte
CRC	Kolorektales Karzinom (Colorectal Carcinoma)
CT	Computer-Tomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ED	Einzeldosis
EGFR	Epidermal growth factor
Expr.	Expression
GD	Gesamtdosis
Gy	Gray
FAP	Familiäre Polyposis
FISH	Fluorescence-in-situ-hybridization
H&E	Hämatoxylin/Eosin
HNPPC	Hereditäres Nichtpolypöse Kolorektale Karzinom
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NGS	Next-Generation-Sequencing
NRCT	Neoadjuvante Radiochemotherapie
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
Pat.	Patienten
PCR	Polymerase-chain-reaction
PE	Probeentnahme
PET CT	Positronen-Emissions-Computer-Tomographie
RNA	Ribonukleinsäure
Res.	Resektat
TNM-Stadium	Tumor, Nodalstatus, Metastasen- Stadium
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
5-FU	5-Fluoruracil

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alice Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum prädiktiven Stellenwert von p21, p53 und Caspase-3 beim neoadjuvant therapierten Rektumkarzinom: Eine immunhistochemische Expressionsanalyse und Korrelation mit klinischen Risikofaktoren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum            1.11.2015

Unterschrift

## **9. Lebenslauf**

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

## 10. Publikationsliste

### Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alice Müller hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Elezkurtaj S1, Moser L, Budczies J, Müller AJ, Bläker H, Buhr HJ, Dietel M, Kruschewski M.

**„Histopathological regression grading matches excellently with local and regional spread after neoadjuvant therapy of rectal cancer.“**

**Pathol Res Pract. 2013 Jul;209(7):424-8. doi: 10.1016/j.prp.2013.04.009. Epub 2013 Apr 30.**

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Erstellung des Patientenkollektivs, Datenauswertung und histologischen Auswertung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



## **11. Danksagung**

In erster Linie danke ich Herrn Professor Martin Kruschewski für die Überlassung des Promotionsthemas und die zuverlässige und nette Betreuung während der Bearbeitung. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sefer Elezkurtaj für die geduldige Heranführung und Einarbeitung in das Thema, sowie der Unterstützung bei der Umsetzung. Ich danke Frau Katharina Rashed für die Hilfe bei der Aktensuche in der Abteilung für Strahlentherapie des Campus Benjamin Franklin der Charité, sowie Herrn Dr. Jan Budczies für die Beantwortung meiner Fragen zu der statistischen Auswertung. Den Mitarbeiterinnen des Immunlabors des Instituts für Pathologie der Charité, Frau Kerstin Witkowski und Frau Kerstin Petri, danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Isabel Arendt und Bernhard Müller, meinem Bruder, Adrian Müller und meinen Großeltern Marianne und Franz Müller für ihre Unterstützung.