

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

DISSERTATION

Prognostische Relevanz von p21 und p53 beim kolorektalen Karzinom
und deren Bedeutung für den Benefit einer adjuvanten Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Sybille Lipka
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Kruschewski

2. Prof. Dr. med. N. Runkel

3. Priv.-Doz. Dr. med. S. Daum

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1. Das kolorektale Karzinom.....	5
1.1.1. Epidemiologie	5
1.1.2. Karzinogenese	5
1.1.3. Klinik und Therapie des kolorektalen Karzinoms	6
1.1.4. Prognose des kolorektalen Karzinoms	7
1.2. Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms	7
1.3. Genese des hereditären kolorektalen Karzinoms (HNPCC)	8
1.4. Molekulargenetik	8
1.4.1. Zellzyklus und seine Regulation	8
1.4.2. Das Tumorsuppressorgen p53	9
1.4.2.1. Regulation von p53	10
1.4.2.2. Inaktivierung und Mutation von p53.....	10
1.4.2.3. p53 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie.....	12
1.4.3. Das Zellzyklusregulationsgen p21	12
1.4.3.1. p21 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie.....	12
1.5. Zusammenfassung	13
1.6. Fragestellung	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Erhebung der Patientendaten.....	15
2.3. Ein- und Ausschlusskriterien	17
2.4. Anfertigung der histologischen Schnitte	18
2.5. Immunhistochemie	18
2.5.1. Etablierung der Immunhistochemie von p53 und p21	18
2.5.2. Immunhistochemische Technik.....	18
2.5.3. Durchführung der immunhistochemischen Technik	19
2.6. Mikroskopische Auswertung.....	20
2.7. Statistische Auswertung	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1. Patientenkollektiv	22
3.2. Immunhistochemische Expressionsanalyse	25
3.3. Expressionsstatus des Tumorsuppressorgens p53.....	26

3.4. Expressionsstatus des Zellzyklusregulationsgens p21	30
3.5. Expressionsstatus und adjuvante Therapie.....	35
3.5.1. p53-Status und adjuvante Therapie	35
3.5.2. p21-Status und adjuvante Therapie	35
3.6. Zusammenhang zwischen p21 und p53	37
3.7. p21/p53 und adjuvante Therapie	39
3.8. Multivariate Analyse	41
4. DISKUSSION	42
4.1. Material und Methoden	43
4.2. Diskussion der Ergebnisse	44
4.2.1. Zusammensetzung des Patientengutes	44
4.2.2. Prognostische Relevanz des p53-Status	45
4.2.2.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika	45
4.2.2.2. Einfluss von p53 auf die Prognose	46
4.2.3. Prognostische Relevanz des p21-Status	47
4.2.3.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika	47
4.2.3.2. Einfluss von p21 auf die Prognose	48
4.2.4. Expressionsstatus und Einfluss der adjuvanten Therapie auf die Prognose.....	49
4.2.4.1. Adjuvante Therapie und p53	49
4.2.4.2. Adjuvante Therapie und p21	50
4.2.5. Zusammenhänge zwischen p53 und p21	51
4.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	54
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	56
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	57
8. DANKSAGUNGEN	62
9. ERKLÄRUNG	63
10. PUBLIKATIONSLISTE	64

1. EINLEITUNG

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (CRC) zählt zu den häufigsten malignen Tumoren in der westlichen Welt. Die Inzidenz umfasst hierzulande etwa 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr. In Australien, Nordamerika und Europa tritt das kolorektale Karzinom häufiger auf als in Afrika und Asien. Es werden Lebens- und Ernährungsgewohnheiten als Ursache für diese Häufigkeitsunterschiede diskutiert.

Das Lebenszeitrisiko an diesem Karzinom zu erkranken, beträgt für die Bewohner der westlichen Industrienationen 6%. Ein Drittel der Patienten verstirbt innerhalb von fünf Jahren an den Folgen des Tumorleidens. Der Erkrankungsgipfel liegt im siebten Lebensjahrzehnt.

In Deutschland ist das kolorektale Karzinom, nach dem Prostatakarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom bei der Frau, die zweithäufigste Tumorerkrankung [1].

1.1.2. Karzinogenese

In der Genese des kolorektalen Karzinoms spielen endogene und exogene Faktoren eine wichtige Rolle. Anhand von Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass zu diesen äußeren Faktoren neben den nicht beeinflussbaren wie männliches Geschlecht und Alter auch beeinflussbare wie Nikotin- und Alkoholabusus, Übergewicht, Bewegungsarmut sowie falsche Ernährungsgewohnheiten zählen.

Beim kolorektalen Karzinom wird zwischen einer sporadischen (85%) und einer familiären (15%) Form unterschieden

Das sporadische Kolonkarzinom entwickelt sich abhängig von Größe und histologischem Typ innerhalb von 10-15 Jahren auf dem Boden eines Adenoms. Dies wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und mit einer Serie von somatischen Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen begründet [2]. Man geht davon aus, dass sich aus ca. 10% der Dickdarmadenome ein maligner Prozess entwickelt.

Zu den familiären Formen zählen die autosomal-dominant vererbte Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), das HNPCC-Syndrom (hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom) und das Peutz-Jeghers-Syndrom mit autosomal-dominanter Vererbung.

1.1.3. Klinik und Therapie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist ein langsam wachsender Tumor und bleibt klinisch lange unbemerkt. Die überwiegende Lokalisation findet sich im Rektum und im Colon sigmoideum (Tabelle 1, S. 6).

Nach chirurgischer Resektion und histopathologischer Untersuchung erfolgt die Einteilung anhand der UICC-Klassifikation, wobei in den USA auch die Einteilung nach Dukes gebräuchlich ist (Tabelle 2, S. 6).

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

Tabelle 1: Anatomische Verteilung des kolorektalen Karzinoms [3]

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

Tabelle 2: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms [4]

Neben der chirurgischen Therapie mit kurativer Zielsetzung wird im Stadium III beim Kolonkarzinom eine adjuvante Chemotherapie zur Verbesserung der Prognose empfohlen. Derzeit gilt außerhalb von klinischen Studien das FOLFOX-schema als Standard (MOSAIC-Studie [5]). Hierbei handelt es sich um eine 14-tägig durchzuführende Chemotherapie, bestehend aus Folinsäure, Fluorouracil (als Bolus und anschließend als 48 h Infusion) und Oxaliplatin. Beim Rektumkarzinom wird im Stadium II und III eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie durchgeführt [6].

1.1.4. Prognose des kolorektalen Karzinoms

Als entscheidender prognostischer Faktor gilt, bei erfolgreicher R0-Resektion des Primärtumors, das UICC-Stadium. Mit zunehmendem Tumorstadium verschlechtert sich die Prognose progredient.

Einen Überblick über das stadienabhängige Überleben liefert die Tabelle 3 (S. 7). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl anderer Faktoren, welche die Prognose beeinflussen, wie Tumorklassifikation, histologischer Differenzierungsgrad, Operationstechnik, Lymphgefäßinfiltration, Tumorperforation und Obstruktion.

UICC-Stadium	Kolonkarzinom		Rektumkarzinom	
	<i>m</i>	<i>w</i>	<i>m</i>	<i>w</i>
St.I/II	92,4	90,2	86,0	87,6
St.III	67,5	66,7	57,2	57,6
St.IV	8,2	8,9	7,8	7,6
Gesamt	61,9	60,5	60,2	61,5

Tabelle 3: 5-Jahres-Überlebensraten des CRC (in %) für den Zeitraum von 1992 bis 1997 nach dem SEER Cancer Statistics Review des amerikanischen National Cancer Institute

1.2. Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Man unterscheidet in der Genese des sporadischen kolorektalen Karzinoms zwei Entstehungsmöglichkeiten.

Ein möglicher Weg ist der sogenannte Mutator-Pathway. Hierbei kommt es zu irreversiblen Mutationen in DNA-Mismatch-Repair-Genen (MMRG) und einer unkorrigierbaren Basenfehlpaarung in repetitiven Abschnitten der DNA, den so genannten Mikrosatelliten. Diese Basenfehlpaarung führt zu Längenpolymorphismen, welche man als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet. Die Entstehung von sekundären Mutationen und malignen Transformationen ist dadurch begünstigt.

Der andere Entstehungsmechanismus wird als Suppressor-Pathway bezeichnet. Dieses Konzept zur Entstehung des sporadischen kolorektalen Karzinoms wurde durch die Adenom-Karzinom-Sequenz von Vogelstein [2] beschrieben. Hierbei führen genetische Alterationen zur Aktivierung von Onkogenen (*ras*) und zur Inaktivierung (Mutation) verschiedener Tumorsuppressorgene (*DCC*, *p53* oder *APC*), was zur Entstehung eines invasiven Karzinoms führt. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren und Apoptose induzieren können und somit das Mutationsrisiko verringern.

1.3. Genese des hereditären kolorektalen Karzinoms (HNPCC)

Das HNPCC-Syndrom stellt mit 2-3% der Kolon- und Rektumkarzinome die häufigste Entität der autosomal dominant vererbten Dickdarmkreberkrankungen dar [7]. Es ist assoziiert mit verschiedenen Neoplasien. Hierzu zählen kolonische und extrakolonische Tumoren wie Manifestationen im Endometrium, Dünndarm, ableitenden Harnwegen, Magen und Ovar.

Dies ist vor allem für die Diagnosefindung und die familiäre Betreuung von Bedeutung, da das kumulative Risiko für Mutationsträger, an einem Karzinom zu erkranken, 70-85% für das Kolorektum, 50% für das Endometrium und ca. 15% für andere Neoplasien beträgt [7].

Weitere klinische Merkmale des HNPCC sind das frühe Manifestationsalter (mittleres Alter bei Diagnose: 45 Jahre), häufig synchrone und metachrone Zweitkarzinome des Kolorektums, die bevorzugte Lokalisation im rechten Hemikolon und die Häufung von muzinösen oder siegelringzelligen Adenokarzinomen mit entzündlicher Infiltration.

Zur Diagnosestellung wurde ein erweiterter Kriterienkatalog (Bethesda Kriterien) definiert. Bei Erfüllen dieser Kriterien muss der Verdacht auf HNPCC mit speziellen molekulargenetischen Untersuchungen überprüft werden.

Tumoren von HNPCC-Patienten zeigen in 80% der Fälle eine genomische Instabilität, die auf Replikationsfehler während der Tumorgenese schließen lässt. Ursächlich hierfür sind Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen, den Mismatch-Repair-Genen. Deshalb sollten die diagnostischen Untersuchungen eine Mikrosatellitenanalyse des Genoms oder einen immunhistochemischen Nachweis des Expressionsverlust der Reparaturproteine umfassen.

1.4. Molekulargenetik

1.4.1. Zellzyklus und seine Regulation

Bei der Entstehung und Progression maligner Tumore ist die Rolle des Zellzyklus von zentraler Bedeutung, da durch Dysregulationen genetische und chromosomale Instabilitäten auftreten können.

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen, die als G₁-, S-, G₂ - und M-Phasen bezeichnet werden. Wie in Abbildung 1 (S. 9) dargestellt, unterliegt die Kontrolle des Zellzyklus einem komplexen Regulationsmodell aus Zyklinen, deren abhängigen Kinasen (CDK; cyclin dependent kinases) und Mitgliedern der Retinoblastom (Rb)-Genfamilie, die an bestimmten Restriktionspunkten aktiviert werden.

Die Aktivität der Zyklin-CDK-Komplexe wird durch Inhibitoren (CDKI, cyclin dependent kinase inhibitors) vermittelt, die den Zellzyklus in jeder Phase anhalten können. Diese Inhibitoren unterteilen sich in zwei Gruppen, die CIP/KIP-Familie und die INK4-Familie. Die Mitglieder der INK4-Familie (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d}) agieren ausschließlich in der G₁-Phase, wohingegen die der CIP/KIP-Familie (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) die Zyklin-CDK-Komplexe während der S- und G₂-Phase hemmen.

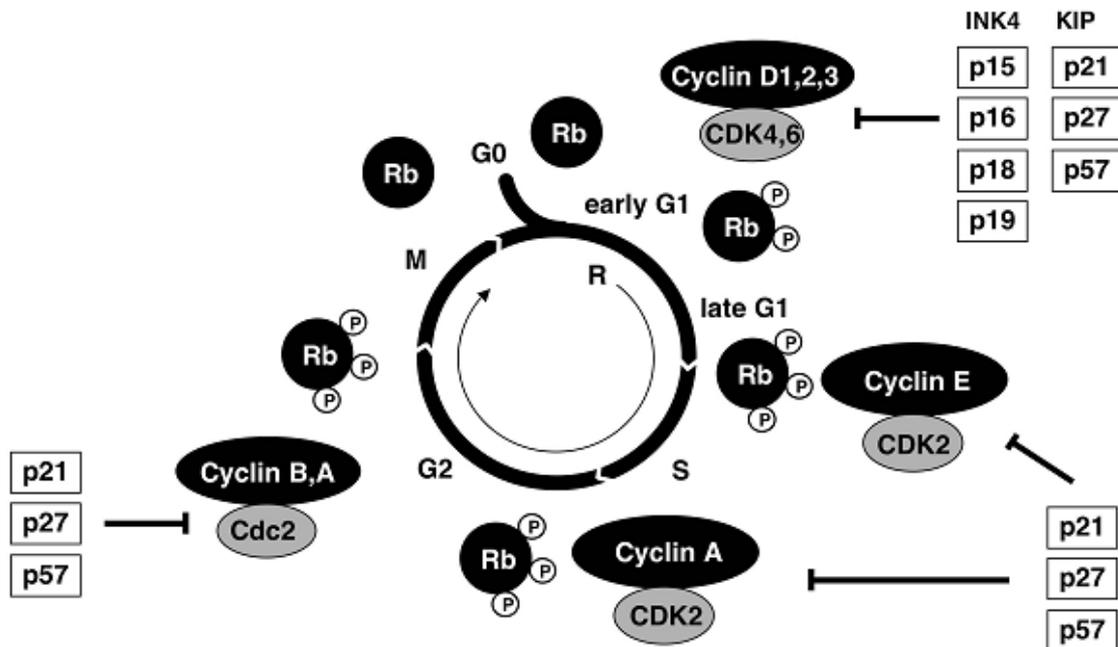


Abbildung 1: Zellzyklus [8]

Anmerkung: Phasenabhängig exprimierte Zykline aktivieren spezifische CDK. Diese CDK phosphorylieren Retinoblastom (Rb) und ermöglichen so die weitere Progression durch den Zellzyklus. CDK-Inhibitoren (CDKI) können Zyklin-CDK-Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKI der INK4a-Familie hemmen G₁-Phase-Zykline, die der KIP-Familie können auch S- und G₂-Phase Zyklin-CDK-Komplexe hemmen.

1.4.2. Das Tumorsuppressorgen p53

Mit einer Masse von 53.000 Dalton und 393 Aminosäuren ist p53 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 codiert. Die Hauptaufgabe von p53 ist die Kontrolle über das Zellwachstum. Dies geschieht einerseits durch Induktion des Zellzyklusarrests und andererseits durch Apoptose. Der Zellzyklusarrest kann irreversibel oder transient sein und es können darin DNA-Reparaturen durchgeführt werden, bevor weitere Replikationszyklen stattfinden. Die Apoptose zeichnet sich durch endgültiges Entfernen von Zellen aus dem Organismus aus [9, 10]. Das Tumorsuppressorgen p53 schützt somit die menschlichen Körperzellen vor onkogenetischer Veränderung und verhindert die Entwicklung von Malignomen.

1.4.2.1. Regulation von p53

Die Regulation des p53-Proteinspiegels erfolgt, wie in Abbildung 2 (S. 11) dargestellt, über einen negativen Feedbackmechanismus durch Mdm-2. Die p53-Expression ist daher unter normalen Bedingungen niedrig. Mdm-2 bindet an p53 im N-terminalen Bereich direkt in der Trans-aktivierungs-Domäne [11-13] und kann dadurch die Wechselwirkung von p53 und seinen transkriptionellen Aktivatoren beeinflussen und direkt hemmen [14, 15]. Mdm-2 ist die E3-Ligase von p53 und führt als solche zu Abbau von p53 durch ein Ubiquitin-Proteasom-System [16, 17].

Fällt diese Regulation aus, beispielsweise durch Verminderung der Mdm-2-Expression, wird p53 stabilisiert und vermehrt exprimiert und kann somit zur Apoptoseinduktion führen. Außerdem kann es über die Aktivierung zellzyklushemmender Gene wie p21^{Waf1/Cip1} den Zellzyklusarrest einleiten.

Ein anderes an der Regulation beteiligtes Gen ist p14^{ARF}. Die Expression dieses Tumorsuppressorgens induziert eine Akkumulation von p53, es interagiert direkt mit Mdm-2 und hält dieses im Nukleolus zurück [18]. Es fungiert als Stabilisator von p53. Dadurch führt die Überexpression von p14 auch zur Erhöhung von p21, welches ein transkriptionelles Zielgen vom Protein p53 ist [19, 20].

1.4.2.2. Inaktivierung und Mutation von p53

Die Inaktivierung von p53 erfolgt durch Mutation (bevorzugt in den Exonen 5 bis 8 der DNA-Bindungsdomäne), Deletion (Chromosom 17p) oder Komplexbildung mit anderen Proteinen. Dadurch kommt es zum Ausbleiben des programmierten Zelltods und damit zum ungebremsten Wachstum der Tumorzelle. Das Tumorsuppressorgen p53 kann nun auch mit Onkoproteinen aus der Reihe ras, myc oder E1A interagieren. Dadurch kommt es zur Beeinträchtigung der Stabilität von p53; die Mutationen können nun indirekt die sequenz-spezifische DNA-Bindung und Transkriptionsfaktoraktivität beeinträchtigen [21].

Eine Inaktivierung von p53 durch Missense-Mutationen kann bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden [22]. Die mutierte Form des p53 hat im Vergleich zu seinem Wildtyp eine stark verlängerte HWZ (ca. 24 Std. vs. 20 min), weshalb in den meisten malignen Tumoren die mutierte Form in einer höheren Konzentration vorliegt. Diese Akkumulation des Genproduktes induziert über einen bisher unbekanntem Mechanismus eine humorale Immunantwort gegen p53-Proteine mit Antikörperbildung der Klasse IgG. Diese Antikörper wurden bei Patienten mit

verschiedenen Karzinomen gefunden. Bei Patienten mit CRC beispielsweise waren Antikörper gegen p53 in 26% der Fälle zu finden, der Titer stieg parallel zum Tumorprogress an [23]. Es ist denkbar, dass Karzinome mit Hilfe dieser Methode vor der klinischen Manifestation detektiert werden könnten.

Deletionen in Allelen des p53-Tumorsuppressorgens sind bei Karzinomen sehr häufig (75%), relativ selten jedoch bei Adenomen (10%), weshalb auf eine späte Inaktivierung dieses Gens in der Kolonkarzinogenese geschlossen wurde [24].

Des Weiteren führt die mutierte Form des p53 zu einer Verkürzung der G1-Phase, in welcher die Schäden der DNA repariert werden können. Sinkt nun die Zeit für eine mögliche Reparatur, kommt es zur vermehrten Anzahl von Mutationen und der Tumor wächst. Bei über 50% der menschlichen malignen Tumoren konnte eine Mutation oder ein Verlust von p53 nachgewiesen werden [22].

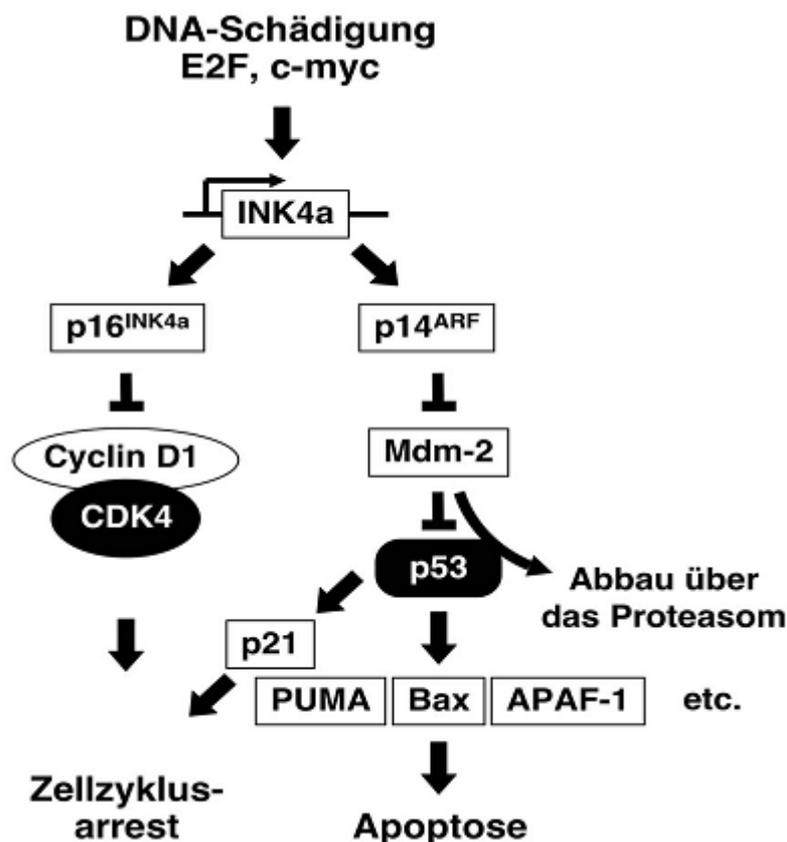


Abbildung 2: Induktionskaskade von Apoptose und Zellzyklusarrest [8]

Anmerkung: DNA-Schädigung oder Deregulation von zellzyklusregulierenden Genen führt zur Aktivierung und Expression von p16^{INK4a} und p14^{ARF}. p16^{INK4a} vermittelt über Hemmung von CDK4-Zyclin D1-Komplexen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase. p14^{ARF} destabilisiert Mdm2, einen Inhibitor von p53, und fördert dessen Abbau über das Proteasom. Dadurch kann p53 stabilisiert werden und als transkriptioneller Aktivator von zellzyklushemmenden (z.B. p21^{Waf1/Cip1}) und apoptosefördernden Genen (z.B. PUMA, Bax, APAF-1) wirken.

1.4.2.3. p53 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie

Die Relevanz der p53 Mutationen für die klinische Prognose ist wiederholt untersucht worden, ohne dass es diesbezüglich eindeutige Aussagen gibt. Einige Analysen wiesen einen Einfluß der p53-Expression auf die Prognose nach [25, 26] andere wiederum nicht [27, 28].

Ebenso unklar ist die Relevanz des p53- Status für das Ansprechen auf eine adjuvante Therapie. Einige Untersuchungen fanden keine Assoziationen zwischen dem p53-Status und dem Erfolg einer adjuvanten Therapie [29, 30]. Andere dagegen kommen zu dem Schluss, dass Mutationen bzw. Überexpression von p53 mit einer besseren [31] oder auch mit einer schlechteren [32] Prognose nach adjuvanter Therapie verbunden sind.

1.4.3. Das Zellzyklusregulationsgen p21

Das Gen p21 ist ein Mitglied der CDKI-Familie CIP/KIP und reguliert die Zyklin-CDK-Komplexe und somit auch den Zellzyklus (Abbildung 1, S. 9). Es ist ein transkriptionelles Zielgen von p53 [19, 20] und induziert den Zellzyklusarrest. Die Regulation erfolgt durch p14, welches über die Hemmung von Mdm-2, die Stabilisierung von p53 erreicht und damit zur vermehrten Expression von zellzyklushemmenden Genen wie p21 führt (Abbildung 2, S. 11).

1.4.3.1. p21 und Prognose sowie Effekt der adjuvanten Therapie

Die Bedeutung von p21 für die Prognose beim CRC ist bislang noch unklar. Während in einigen Arbeiten kein Zusammenhang zwischen der p21-Expression und klinisch-pathologischen Merkmalen festgestellt wurde [33], konnte in anderen Arbeiten eine signifikante Korrelation zwischen einer geringen p21-Expression und einem negativen klinischen Outcome aufgezeigt werden [34]. Bei Patienten mit Rektumkarzinom scheint die Prognose bei erhöhter Expression von p21 (und p53) verbessert zu sein [32]. Auch in Bezug auf eine neoadjuvante Therapie ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse. Einerseits wurde bei Patienten mit Rektumkarzinom und neoadjuvanter Radio-Chemotherapie ein schlechteres tumorfreies Überleben beobachtet werden, wenn diese vier bis sechs Wochen nach Abschluss der Chemotherapie eine erhöhte p21-Expression aufwiesen [30]. Andererseits zeigte sich bei erhöhter Expression von p21 ein besseres Ansprechen auf die neoadjuvante Radio-Chemotherapie mit 5-FU und Irinotecan [35].

1.5. Zusammenfassung

Im Verlauf der vergangenen Jahre konnte ein relevanter Zusammenhang zwischen der Prognose des kolorektalen Karzinoms und unterschiedlichen molekulargenetischen Markern ermittelt werden. Veränderungen (Mutationen, Blockierungen oder Abwesenheit) von Reparaturgenen, Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose nehmen eine bedeutende Rolle bezüglich der Tumorentstehung und der Prognose ein. Viele bisherige Arbeiten weisen darauf hin, dass sich die individuelle Behandlung von Patienten mit CRC grundlegend ändern könnte, wenn die Bedeutung der einzelnen, die Karzinogenese betreffenden, Gene vollständig aufgedeckt und erklärt werden könnte. Die dazu veröffentlichten Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des prognostischen Aussagewertes der einzelnen molekulargenetischen Marker.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 und des Zellzyklusregulationsgens p21 an einem Kollektiv von sporadischen kolorektalen Karzinomen vorzunehmen sowie das rezidivfreie und das Gesamtüberleben zu untersuchen. Darüberhinaus sollte das Ansprechen auf die adjuvante Therapie evaluiert werden.

Die Kenntnis des genetischen Status könnte nicht nur Behandlung und Prognose der Patienten bestimmen, sondern möglicherweise auch eine prädiktive Funktion übernehmen. Es wäre erstrebenswert, bisherige Screeningverfahren zur Erkennung von frühen Vorstadien von Darmkarzinomen durch weitere Methoden zu ergänzen. Hierbei könnte die Erforschung und mögliche Etablierung der molekularbiologischen Marker einen wichtigen Platz einnehmen. Die Detektion von Mutationen der Onkogene und Tumorsuppressorgene, die zur Entstehung des kolorektalen Karzinom führen können, wäre eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Untersuchungsmethoden, da diese Marker schon vor Entwicklung eines invasiven Karzinoms entdeckt werden könnten. Insbesondere beim sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinom wäre dies eine vielversprechende Methode, da keine Grundkrankheit eruierbar ist und Frühsymptome meist fehlen.

Patienten mit kolorektalem Karzinom weisen unterschiedliche Krankheitsverläufe auf. Während teilweise eine jahrelange Beschwerde- und Rezidivfreiheit besteht, ist in anderen Fällen eine unaufhaltsame Progredienz nachweisbar. Erklärbar ist dies durch die eingänglich beschriebenen molekularbiologischen Veränderungen. Zukünftig ist die Erstellung eines individuellen Tumormutationsprofil und einer darausfolgenden rational begründeten und maßgeschneiderten Therapie denkbar.

1.6. Fragestellung

Anhand eines Patientenguts mit kurativ operiertem kolorektalen Karzinom sollte festgestellt werden, ob sich die Individuen hinsichtlich ihrer Proteinexpression von p53 und p21 in bestimmtem Tumorcharakteristika und in ihrem klinischen Verlauf unterscheiden. Des Weiteren wurde überprüft, ob diese Gene das Ansprechen auf eine adjuvante Therapie beeinflussen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchungen erfolgten an Kolon- bzw. Rektumkarzinomen von Patienten, die im Zeitraum von 1995 bis 1998 bzw. 1995 bis 2001 in der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité- Universitätsmedizin Berlin kurativ reseziert worden waren. Die Erhebung der klinischen Nachsorgedaten der Patienten erfolgte mittels eines Fragebogens an die betreuenden Ärzte. Aus dem Institut für Pathologie des Campus Benjamin Franklin der Charité- Universitätsmedizin Berlin bereitgestellten Tumorgewebe wurden histologische Schnitte angefertigt. Es folgte die Etablierung der immunhistochemischen Färbetechnik (Titration der Antikörper anti-p53, anti-p21) und anschließend die Färbung aller Gewebeschnitte. Nach mikroskopischer Auswertung konnten die statistischen Berechnungen vorgenommen werden.

2.1. Erhebung der Patientendaten

Die Untersuchungen erfolgten an Patienten, die wegen eines kolorektalen Karzinoms in der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité- Universitätsmedizin Berlin im Zeitraum von 1995 bis 2001 operiert worden sind. In einer offenen prospektiven Beobachtungsstudie wurden diese Patienten online dokumentiert. Die Dokumentation umfasste neben den Stammdaten, detaillierte Angaben zu Anamnese, Risikofaktoren, präoperativer Diagnostik, operativem Vorgehen, intraoperativen Befunden, histopathologischer Aufarbeitung sowie postoperativem Verlauf.

Die allgemeinen Patientendaten, die Angaben zur pathologischen Auswertung des Tumorgewebes und die nachsorgenden Ärzte wurden diesem Register entnommen (Tabelle 4, S. 16).

Es wurden diejenigen Patienten erfasst, deren Mindestnachsorgezeitraum 5 Jahre beim Kolonkarzinom und 2 Jahre beim Rektumkarzinom betrug. Die Nachbeobachtungszeit von 2 Jahren beim Rektumkarzinom wurde gewählt, da dieser Zeitraum als Surrogat-Endpunkt gelten kann [36].

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

Tabelle 4: Übersicht über die erfassten Patienten- und Tumorcharakteristika

Die Tumornachsorge beinhaltet neben der körperlichen Untersuchung, die Bestimmung der Tumormarker, bildgebende Diagnostik (Sonographie, CT) sowie die Endoskopie (Tabelle 5, S. 16). Nach Ermittlung der betreuenden Hausärzte wurde ein telefonischer Kontakt hergestellt. Auf dem Postweg wurde ihnen ein Fragebogen zugesandt mithilfe dessen die klinischen Daten der Patienten erfasst wurden. Die Nachsorgedaten der Patienten, die in der chirurgischen Poliklinik weiterbehandelt wurden, sind aus den dortigen Krankenakten entnommen worden.

Untersuchung	Nachsorgeuntersuchungen in Monaten post OP							
	3	6	12	18	24	36	48	60
Anamnese, körp.Untersuch., CEA		X	X	X	X	X	X	X
Koloskopie		X ¹				X ²		
Abdomensonographie ³		X	X	X	X	X	X	X
Sigmoidoskopie (Rektoskopie) ⁴		X	X	X	X			
Spiralcomputertomographie ⁵	X							
Röntgen Thorax (kein Konsens)								

¹ wenn keine vollständige Koloskopie präoperativ erfolgt ist

² bei unauffälligem Befund (kein Adenom, kein Karzinom) nächste Koloskopie nach 5 Jahren

³ eine Metaanalyse ergab einen Vorteil für ein bildgebendes Verfahren zum Nachweis von Lebermetastasen in der Nachsorge. Aus diesem Grund entschied sich die Expertenkommission, das einfachste und kostengünstigste Verfahren anzuwenden.

⁴ nur beim Rektumkarzinom ohne neoadjuvante oder adjuvante Radiochemotherapie

⁵ Nur beim Rektumkarzinom 3 Monate nach Abschluß der tumorspezifischen Therapie (Operation bzw. adjuvante Strahlen-/Chemotherapie) als Ausgangsbefund

Tabelle 5: Nachsorgeschema für kolorektale Neoplasien nach S3-Leitlinie [37]

2.3. Ein- und Ausschlusskriterien

Zu Beginn der Studie wurden bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt, anhand derer die Auswahl des Patientenkollektivs erfolgte (Tabelle 6, S. 17). Die Patienten wurden nach den damaligen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der Deutschen Krebsgesellschaft behandelt (Tabelle 5, S. 16). Die kurative Therapie des kolorektalen Karzinoms beinhaltet die primär chirurgische Exzision und die Durchführung der adjuvanten Therapie. Beim Kolonkarzinom UICC-Stadium III erfolgte eine Kombination von 5-Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure für sechs bis acht Monate. Diese Therapie wurde beim Rektumkarzinom UICC-Stadium II und III durch eine Radiotherapie ergänzt (Abbildung 3, S. 17).

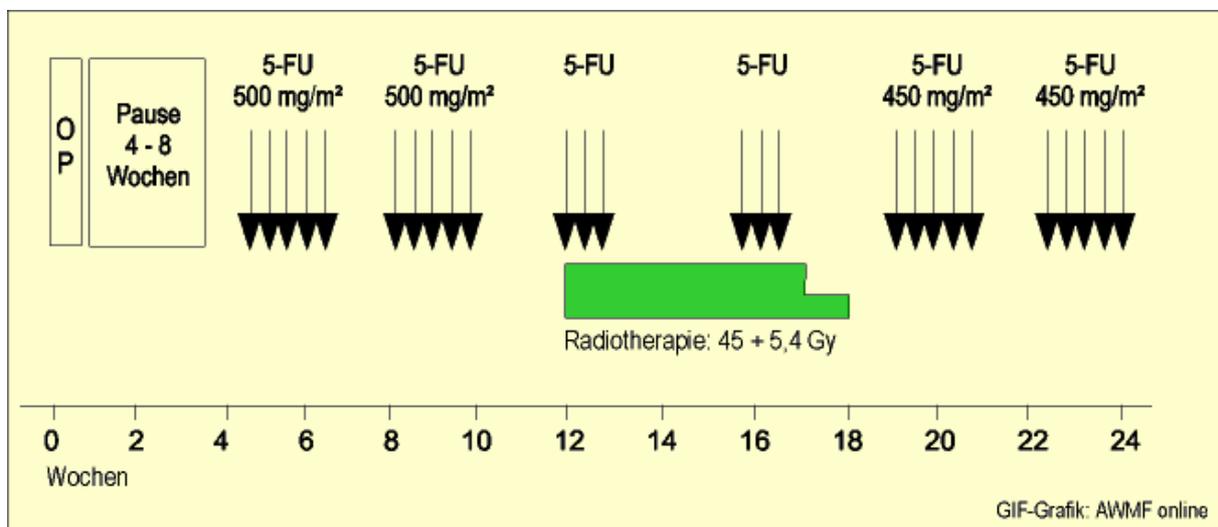


Abbildung 3: Adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms; Indikation: Stadium UICC II + III (pT3/4 oder pN+) [38]

<u>Einschlusskriterien:</u>	<u>Ausschlusskriterien:</u>
Sporadische kolorektale Karzinome	Zweit-/ Doppelkarzinome
Kurative Resektion (R0)	Rezidive
Kolonkarzinome UICC III	Kolitis assoziierte Karzinome
Rektumkarzinome UICC II und III	
Operationszeitraum	
Kolonkarzinome 1995 – 1998	
Rektumkarzinome 1995 – 2001	
Follow up	
Kolonkarzinome mindestens 5 Jahre	
Rektumkarzinome mind. 2 Jahre	

Tabelle 6: Ein- und Ausschlusskriterien für das zu untersuchende Patientenkollektiv

2.4. Anfertigung der histologischen Schnitte

Die formalinfixierten und paraffineingebetteten Tumorgewebeblöcke wurden vom Institut für Pathologie (Campus Benjamin Franklin) zur Verfügung gestellt. Nach Auswahl der repräsentativen Blöcke anhand der Hämatoxylin-Eosin Färbungen, erfolgte die Verarbeitung zu 3-5 µm dicken histologischen Schnitten mit dem Mikrotom. Diese wurden dann auf Objektträger aufgetragen und über Nacht im Ofen bei einer Temperatur von 60°C getrocknet. Die Schnitte zeigen Bereiche normaler Darmmukosa mit Übergang zu Anteilen des Karzinoms. In Vorbereitung auf die immunhistochemische Behandlung wurden die Schnitte mittels Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und einer 15 minütigen hitzeinduzierten Antigen-demaskierung im Citratpuffer (pH 6,0) zugeführt. Abschließend wurden sie mit Protein-Block (Dako# X0909) behandelt.

2.5. Immunhistochemie

2.5.1. Etablierung der Immunhistochemie von p53 und p21

Erst seitdem die entsprechenden paraffingängigen Antikörper zu erwerben sind, ist die Untersuchung der Proteinexpression von p53 und p21 mittels Immunhistochemie möglich.

Um ein optimales zuverlässiges und reproduzierbares Färbeergebnis zu erhalten, war es für die experimentelle Arbeit notwendig, die oben genannten Antikörper neu zu etablieren. Dafür wurden einige Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Farbeinwirkzeiten durchgeführt. Die Negativkontrolle erfolgte durch Weglassen des Primärantikörpers.

2.5.2. Immunhistochemische Technik

Die Antigendetektion mittels Immunhistochemie ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zuerst die Bindung eines Antikörpers an das zu untersuchende Antigen stattfindet und als nächstes die Detektion und Visualisierung des Antikörperbindungskomplexes mittels eines Enzymchromogensystems erfolgt. Hierfür gibt es verschiedene Detektionssysteme mit einerseits direkten oder andererseits indirekten Methoden.

Bei der direkten Methode ist das Enzym an den primären Antikörper gebunden, wohingegen bei der indirekten Methode das Enzym über ein zweites Reagenz (so genannte Link-Antikörper, Brückenantikörper) an den primären Antikörper konjugiert ist.

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

Für diese Arbeit wurde mit dem Super Sensitive Detection System (Large Volume, Ready-to-Use Reagent Kit) von BioGenex (# QA 900-9L) gearbeitet.

Bei diesem System ist der Brückenantikörper so modifiziert, dass er mehr Biotinmoleküle binden kann, ohne dabei seine Bindungseigenschaften zu beeinflussen. Zusätzlich sind einige Enzym-eigenschaften verbessert, so dass dieser Detektionskit gegenüber anderen indirekten Methoden vorgezogen wurde.

2.5.3. Durchführung der immunhistochemischen Technik

Im Anschluss an die Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden die primären monoklonalen Antikörper anti-p53 (Monoclonal Mouse anti-human p53, Clone DO-7, Dako) und anti-p21 (Monoclonal Mouse anti-human p21^{WAF1/Cip1}, Clone SX118, Dako) in der in Tabelle 7 (S. 19) dargestellten Verdünnung appliziert und für 1-1,5 Stunden im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Bei allen Anwendungen diente Antibody diluent solution (Zymed # 01162756) als Verdünnungs-medium.

Dann erfolgte die Anwendung des Detektionskits und des Chromogens entsprechend der in Tabelle 7 (S. 19) angegebenen Einwirkzeiten. Abschließend wurde die Kerngegenfärbung mit Hämalaun und die Eindeckung der Objektträger mit Aquatex (Merck # 1.08562) vorgenommen.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit (in Minuten)	Chromogeneinwirkzeit (in Minuten)
Anti-p53	1:100	60	10
Anti-p21	1:50	90	15

Tabelle 7: Schema für die Anfertigung immunhistochemischer Schnitte

2.6. Mikroskopische Auswertung

Das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53 und des Zellzyklusregulationsgens p21 ist mit Hilfe der Immunhistochemie nachweisbar. Bei positiver Expression des Genproduktes weisen die Tumorzellen eine Färbung auf, normale Dickdarmschleimhaut zeigt hingegen keine oder nur eine sehr geringe Färbung. Als negative Proteinexpression wurde ein Ausbleiben der nukleären Färbung in den Tumorzellen gedeutet (Abbildungen 4 und 5, S. 21).

Zur Beurteilung der Färbe- und Schnittqualität erfolgte zuerst die lichtmikroskopische Übersichtseinstellung des Tumors und der angrenzenden normalen Darmschleimhaut. Bei der Auswertung wurden nur Bereiche mit gleichmäßiger Färbung berücksichtigt, da unterschiedlich starke Farbreaktionen im Tumorzentrum und dessen Randbereichen die Beurteilung erschweren. Die Auswertung der Immunfärbung des Tumorsuppressorgens p53 und des Zellzyklusregulationsgens p21 semiquantitativ vorgenommen. Die Gradeinteilung der p53- und p21-Expression (Tabelle 8, S. 20) erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von Lyall und Mitarbeitern [26].

Grad	1	2	3	4	5
Expression	0-5%	6 ≤ 10%	11 ≤ 25%	26 ≤ 50%	> 50%

Tabelle 8: Scoreeinteilung von p53 und p21

Danach entspricht Grad 1 einer schwachen und Grad 5 der stärksten Proteinexpression. Die Wertung der Tumorsuppressorgene als positiv wurde für p53 ab einer Expression >25% (Grad 4 und 5) und für p21 ab einer Expression >5% (Grad 2-5) festgelegt. Die cut-off-Punkte wurden in Anlehnung an andere Studien gewählt [39, 40].

Die mikroskopische Auswertung aller Schnitte erfolgte durch zwei Gutachter, die unabhängig voneinander und ohne Kenntnisse über klinische Parameter arbeiteten. Der Unterschied zwischen den histopathologischen Ergebnissen der beiden Gutachter (interobserver variability) war <10%. In einigen Fällen, wie zum Beispiel bei intratumoraler Heterogenität wurden die immunhistochemischen Färbungen wiederholt.

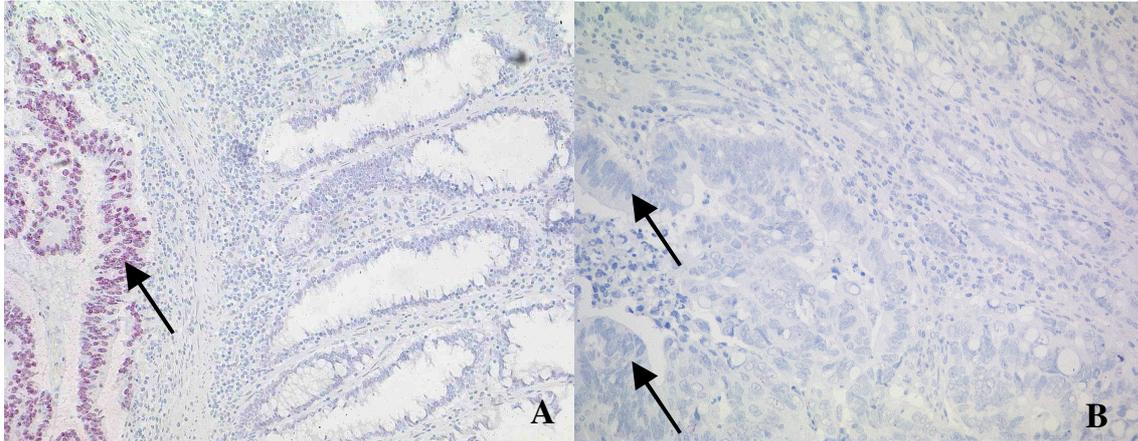


Abbildung 4: p53-Expression

(A) **p53-positiv (x200)**: im Tumorgewebe (links) positive Kernfärbung (Pfeil), rechts im Bild normale Kolonschleimhaut mit fehlender Expression

(B) **p53-negativ (x200)**: im Tumorgewebe (links) fehlende Kernfärbung (Pfeile), rechts oben im Bild normale Kolonschleimhaut mit fehlender Expression

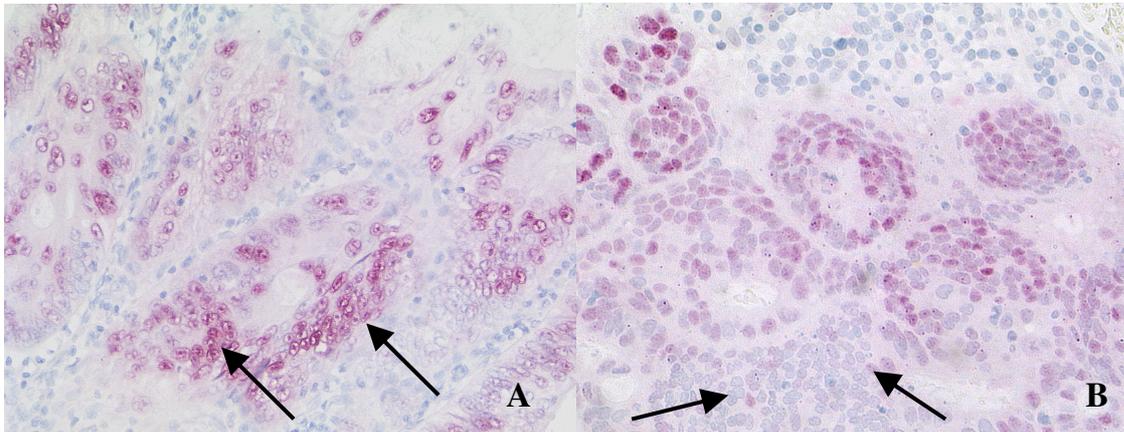


Abbildung 5: p21-Expression

(A) **p21-positiv (x200)**: positive nukleäre Expression (Pfeile) in >5% der Tumorzellen

(B) **p21-negativ(x400)**: schwache Kernfärbung (Pfeile) in <5% der Tumorzellen

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Ermittlung einer Beziehung zwischen Proteinexpression von p53 und p21 und den verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Tests. Die Berechnung des Überlebens erfolgte nach der Kaplan Meier Methode, Unterschiede im Überleben wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt. Die multivariate Analyse wurde mittels Cox Regression durchgeführt. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS 13.0. Als Signifikanzniveau galt für alle Tests $p < 0,05$.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientenkollektiv

Das Patientengut (n=125) bestand aus 52 Frauen (41,6%) und 73 Männern (58,4%), von denen 42 Patienten (33,6%) an einem Kolonkarzinom (25m, 17w) und 83 Patienten (66,4%) an einem Rektumkarzinom (48m, 35w) erkrankt waren. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag der Altersmedian bei 64 Jahren (Spanne: 39–90 Jahre). Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 51,8±2,5 Monate. Für die Kolonkarzinompatienten betrug sie 81,8±3,9 Monate, für die Rektumkarzinompatienten 62,6±3,1 Monate. Detaillierte Angaben zu den durchgeführten OP-Verfahren sind der Tabelle 9 (S. 22) zu entnehmen.

OP-Verfahren	Anzahl (n)	Häufigkeit (%)
Hemikolektomie rechts	14	11,2
Hemikolektomie links	24	19,2
Anteriore Rektumresektion nach Dixon	66	52,8
Diskontinuitätsresektion nach Hartmann	5	4,0
Rektumexstirpation nach Miles/Quenué	16	12,8

Tabelle 9: Durchgeführte Operationen bei den Patienten des untersuchten Kollektivs (n=125).

Eine adjuvante Therapie erhielten 79,2% der Patienten (n=99). Die Applikation von 5-FU- und Folinsäure erfolgte bei 36 (85,7%) Kolonkarzinom-Patienten und bei 63 (75,9%) Rektumkarzinom-Patienten. Zusätzlich wurde beim Rektumkarzinom eine Radiatio mit einer Strahlendosis von 45 Gy + 5,4 Gy durchgeführt (s. Abb. 3, S. 17).

Hinsichtlich der UICC-Klassifikation der Tumoren befanden sich 29,6% im Stadium II und 70,4% im Stadium III. Die histologische Differenzierung der kolorektalen Adenokarzinome war in nahezu allen Fällen (99,2%) mäßig bis schlecht, entsprechend Grad 2 bzw. Grad 3 (Tabelle 10, S. 23).

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

Tabelle 10: Histopathologische Charakteristika der kolorektalen Karzinome (n=125).

Während der postoperativen Nachsorge entwickelten 40% der Patienten ein Tumorrezidiv. Von diesen erkrankten 8 Patienten (14,4%) an einem lokoregionärem Rezidiv, 27 (21,6%) entwickelten Fernmetastasen und 5 (4%) waren von beidem gleichzeitig betroffen. Von den wegen eines kolorektalen Karzinoms kurativ operierten Patienten betrug die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate 62% und die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate 64% (Abb. 6 und 7, S. 23-24).

Abbildung 6: Rezidivfreies Überleben des Gesamtkollektivs (n=125).

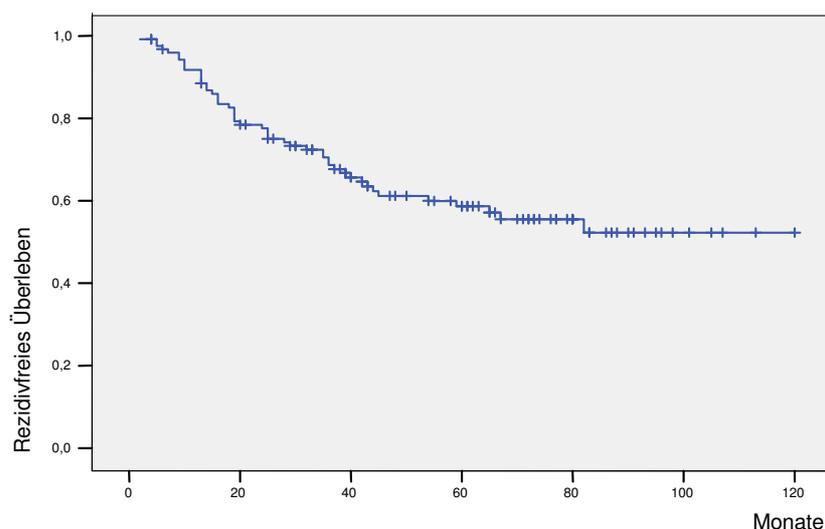
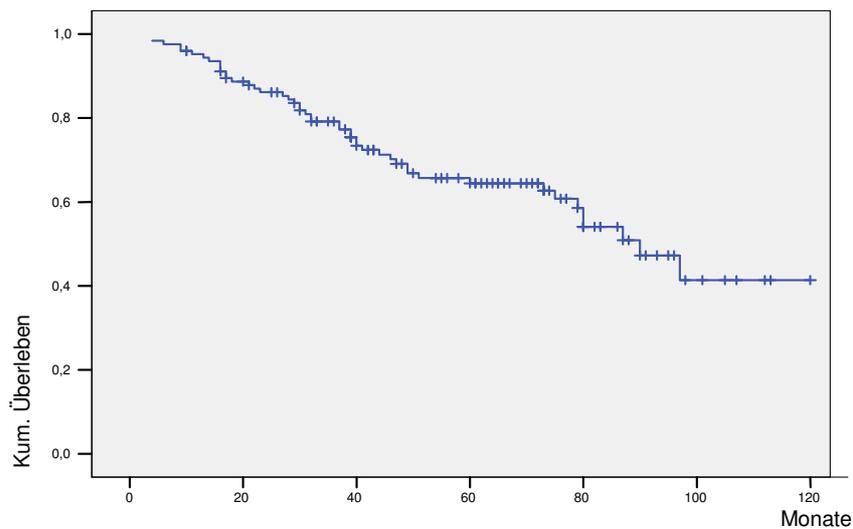


Abbildung 7: Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs (n=125).



Hinsichtlich des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens war zwischen Kolonkarzinom- und Rektumkarzinom-Patienten kein Unterschied festzustellen. Patienten mit einem Kolonkarzinom entwickelten durchschnittlich nach $76,4 \pm 8,1$ Monaten, Patienten mit Rektumkarzinom nach $73,7 \pm 5,2$ Monaten ein Rezidiv ($p=0,769$). Das Gesamtüberleben betrug beim Kolonkarzinom $79,1 \pm 7,4$ Monate und beim Rektumkarzinom $77,5 \pm 4,8$ Monate ($p=0,754$). Auch die Applikation einer adjuvanten Therapie hatte keinen Einfluß auf das rezidivfreie und auf das Gesamtüberleben (35,4% mit adjuvanter Therapie vs. 34,8% ohne adjuvante Therapie, $p=0,99$, bzw. 63,7% mit adjuvanter Therapie vs. 54,2% ohne adjuvante Therapie, $p=0,37$) (Abb. 8 und 9, S. 24-25).

Abbildung 8: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Erhalt einer adjuvanten Therapie ($p=0,99$).

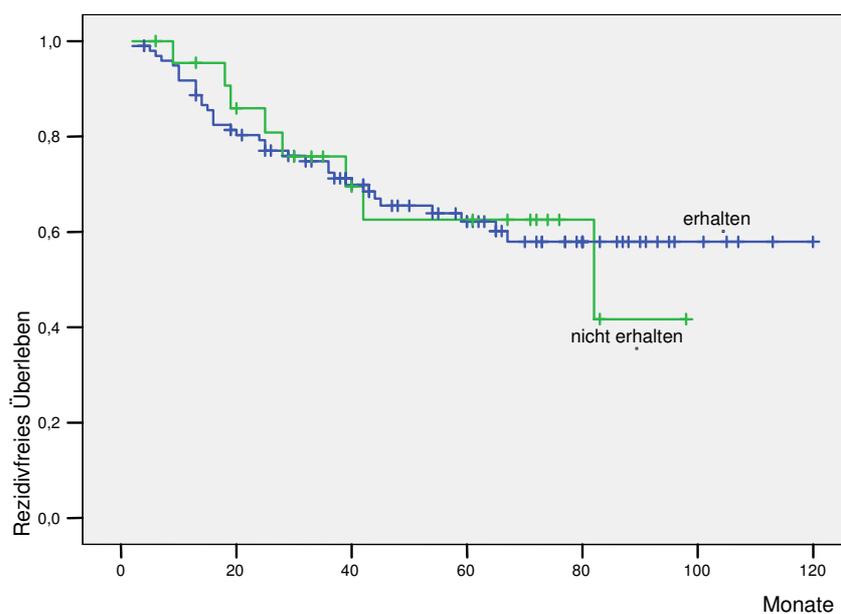
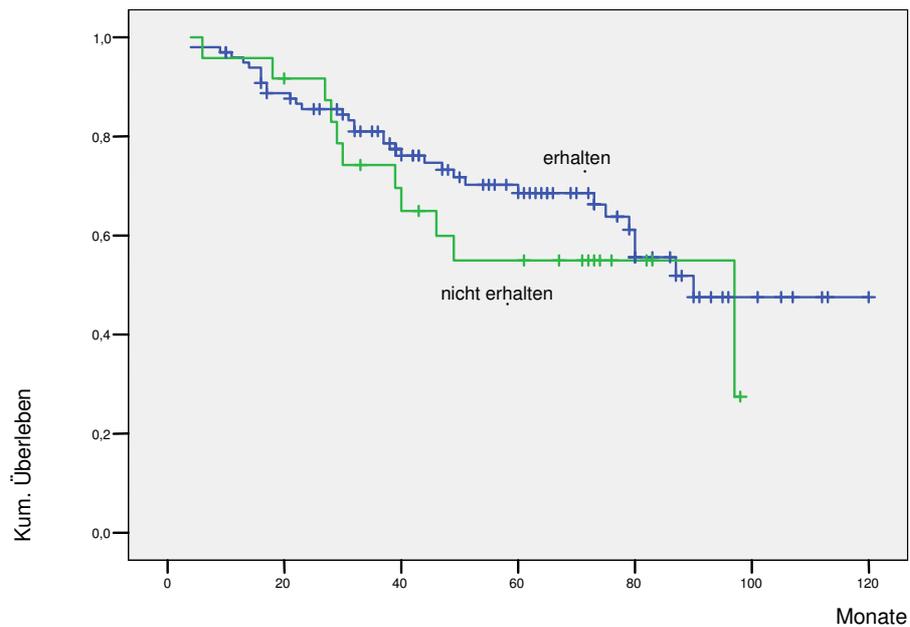


Abbildung 9: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Erhalt einer adjuvanten Therapie (p=0,37).



3.2. Immunhistochemische Expressionsanalyse

Die immunhistochemische Untersuchung des Tumorsuppressorgens p53 konnte mittels spezifischer Antikörper an 114, für das Zellzyklusregulationsgen p21 an 116 von insgesamt 125 Gewebsschnitten mit sporadischem kolorektalen Karzinom durchgeführt werden. Die mikroskopische Auswertung der Proteinexpression erfolgte semiquantitativ je nach Antikörper anhand eines festgelegten Scores (s. S. 20).

Bei der Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 (Abb. 10, S. 26) war eine schwache Expression (0-10%) in 30 Tumoren nachweisbar (Grad 1: n=22, Grad 2: n=8) und in weiteren 12 Fällen waren 11-25% der Tumorzellen (Grad 3) angefärbt. Die Mehrheit der Tumoren wies eine starke p53-Expression (>25%) auf (Grad 4: n=35, Grad 5: n=37). Für die nukleäre p21-Expression wurde in 8 Fällen keine Expression nachgewiesen, in der Mehrzahl der Fälle (n=77) war ein schwacher Nachweis (0-5%, Grad 1) zu beobachten und bei 31 Gewebsschnitten waren mehr als 5% der Tumorzellen (Grad 2-5) angefärbt. Eine nukleäre Akkumulation von >50% trat in keinem Fall auf (Abb. 11, S. 26).

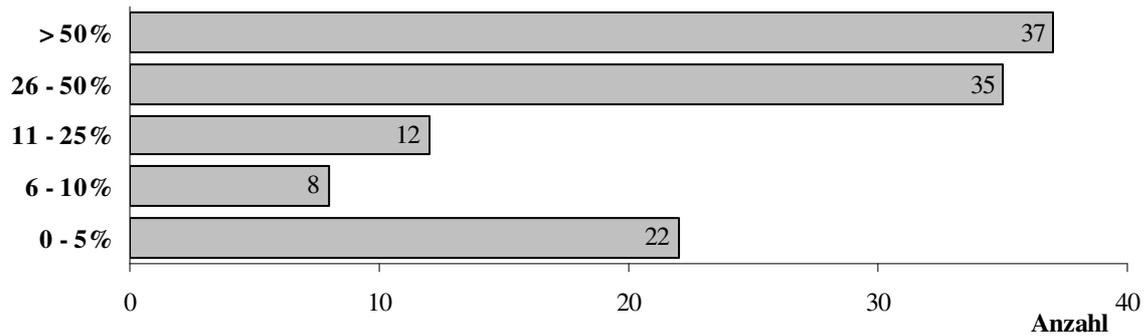


Abbildung 10: p53-Expression (n=114).

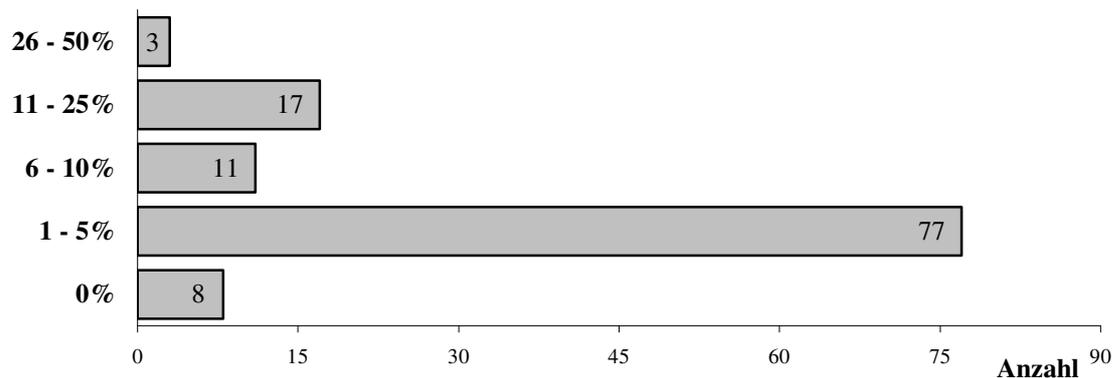


Abbildung 11: p21-Expression (n=116).

3.3. Expressionsstatus des Tumorsuppressorgens p53

Die Auswertung des p53-Status von 114 Patienten ergab bei 63,2% eine positive und bei 36,8% eine negative Expression. Beide Gruppen waren hinsichtlich der klinisch-pathologischen Parameter vergleichbar (Tabelle 11, S. 27). Während der Nachsorgezeit starben 23 (20,2%) p53-positive und 20 (17,5%) p53-negative Patienten.

Bezogen auf das rezidivfreie Überleben gab es zwischen p53-positiven und p53-negativen Patienten keine Unterschiede ($80,9 \pm 5,4$ vs. $59,0 \pm 5,5$ Monate, $p=0,161$). Die Gesamtüberlebenszeit war hingegen bei den p53-positiven Patienten signifikant günstiger ($83,4 \pm 4,9$ vs. $60,3 \pm 5,1$ Monate, $p=0,048$) (Abb.12 und 13, S. 28-29).

	p53-positiv (n=72)	p53-negativ (n=42)	p-Wert
Geschlecht			0,508
Männlich	40	26	
Weiblich	32	16	
Alter			0,378
< 60	30	14	
> 60	42	28	
Lokalisation			0,879
Kolon	23	14	
Rektum	49	28	
UICC			0,517
II	23	11	
III	49	31	
Grading			0,431
Gut-Mäßig	31	22	
Schlecht	41	20	
T-Kategorie			0,139
T1+T2	7	1	
T3+T4	65	41	
Nodalstatus			0,517
-	23	11	
+	49	31	

Tabelle 11: Klinische und histopathologische Parameter in Abhängigkeit vom p53-Status (n=114).

Das stadienabhängige Überleben unter Berücksichtigung des p53-Expressionsstatus ist in Tabelle 12 (S. 28) zusammengefasst. Die p53-positiven Patienten im UICC-Stadium II waren gegenüber den p53-negativen sowohl durch ein verlängertes rezidivfreies, als auch durch ein verlängertes Gesamtüberleben gekennzeichnet.

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
UICC II		
p53-positiv (n=23)	92,3±8,0	105,0±5,4
p53-negativ (n=11)	38,3±5,5	58,2±10,9
p-Wert	0,001	0,002
UICC III		
p53-positiv (n=49)	66,8±6,3	71,9±5,6
p53-negativ (n=31)	64,5±6,4	61,3±5,9
p-Wert	0,514	0,669

Tabelle 12: Mittelwerte mit Standardabweichung des rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p53-Expression stratifiziert nach UICC-Stadien (n=114).

Abbildung 12: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom p53-Status (p=0,161).

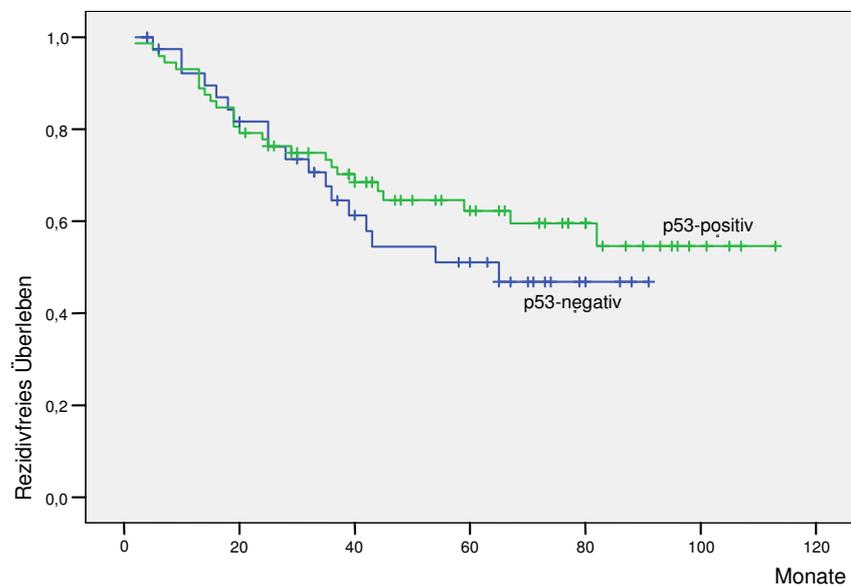
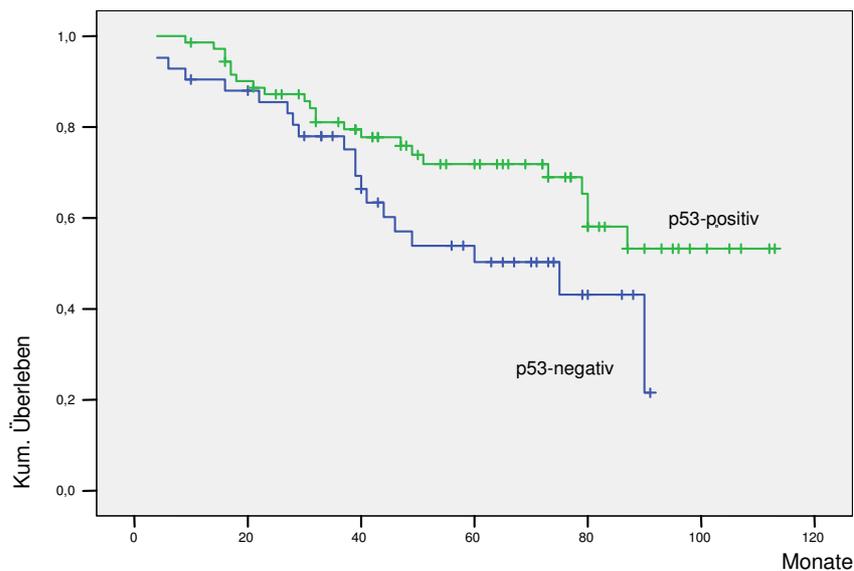


Abbildung 13: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p53-Status (p=0,048).

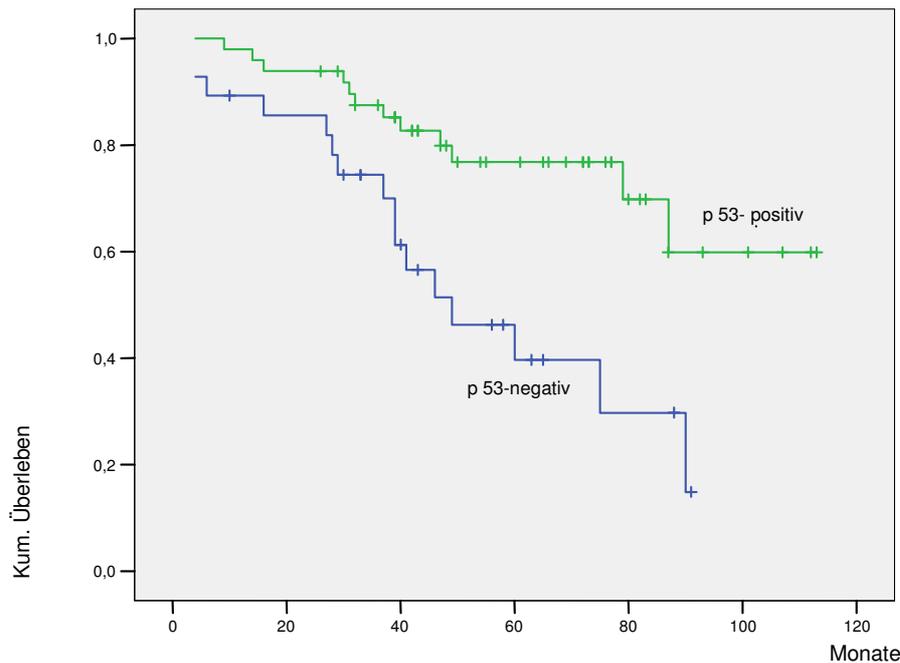


Stratifiziert nach der Tumorlokalisation wiesen p53-positive Patienten mit einem Rektumkarzinom ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich zu p53-negativen Patienten auf ($89,3 \pm 5,8$ Monate vs. $54,4 \pm 6,1$ Monate, $p=0,002$) (Abb. 14, S. 30). Weitere Unterschiede in Abhängigkeit von der p53-Expression und der Lokalisation fanden sich nicht (Tabelle 13, S. 29).

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

Tabelle 13: Mittelwerte mit Standardabweichung des rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p53-Expression stratifiziert nach der Tumorlokalisation (n=114).

Abbildung 14: Gesamtüberleben der Rektumkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom p53-Status (p=0,002).



3.4. Expressionsstatus des Zellzyklusregulationsgens p21

Das Zellzyklusregulationsgen p21 zeigte bei 26,3% der Tumoren eine positive und bei 73,7% eine negative Expression. Bei der Analyse der klinisch-pathologischen Merkmale fällt auf, dass p21-negative Tumoren signifikant häufiger im Rektum als im Kolon lokalisiert waren (Tabelle 14, S. 31). Im Nachbeobachtungszeitraum verstarben 17 p21-positive (54,8%) und 26 p21-negative (30,6%) Patienten. Dabei waren sowohl das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben der p21-negativen Patienten signifikant länger als das der p21-positiven Patienten (82,4±4,8 vs. 56,8±7,5 Monate, p=0,02 bzw. 83,9±4,5 vs. 60,9±8,0 Monate, p=0,005) (Abb. 15 und 16, S. 32).

	p21-positiv (n=31)	p21-negativ (n=85)	p-Wert
Geschlecht			0,617
Männlich	17	51	
Weiblich	14	34	
Alter			0,447
< 60	10	34	
> 60	21	51	
Lokalisation			0,001
Kolon	17	20	
Rektum	14	65	
UICC			0,101
II	6	30	
III	25	55	
Grading			0,818
Gut-Mäßig	15	40	
Schlecht	16	45	
T-Stadium			0,123
T1+T2	4	4	
T3+T4	27	81	
Nodalstatus			0,101
-	6	30	
+	25	55	

Tabelle 14: Klinische und histopathologische Parameter in Abhängigkeit vom p21-Status (n=116).

Abbildung 15: Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom p21-Status ($p=0,02$).

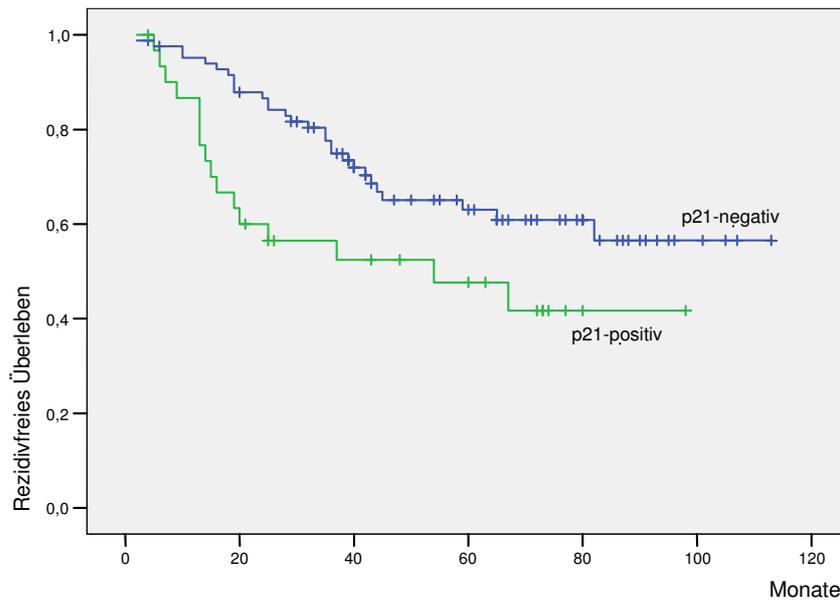
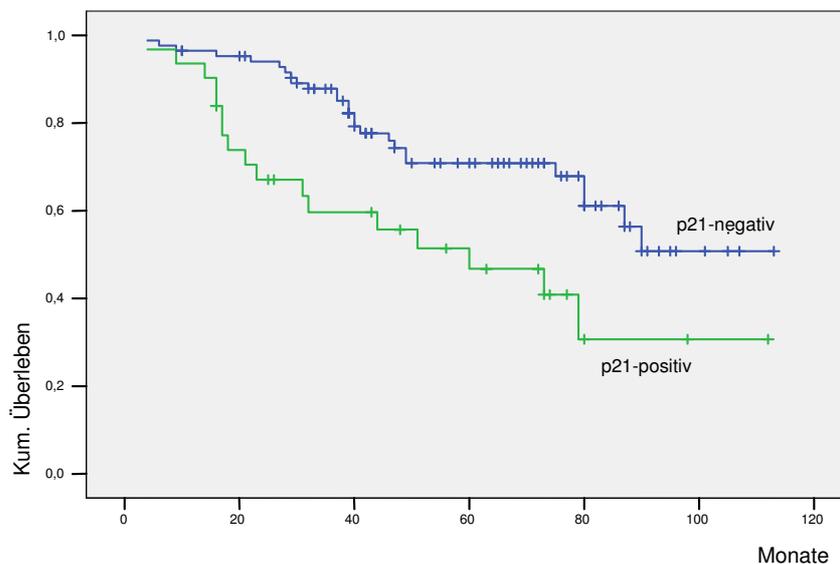


Abbildung 16: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p21-Status ($p=0,005$).



Der Vergleich des Überlebens in Abhängigkeit vom p21-Expressionsstatus und der UICC-Stadien zeigte die in Tabelle 15 (S. 33) aufgelisteten Ergebnisse. Das rezidivfreie Überleben war für p21-positive Patienten im Stadium UICC II verlängert. Im UICC-Stadium III wiesen die p21-negativen Patienten ein verlängertes Gesamtüberleben auf.

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
UICC II		
p21-positiv (n=6)	92,3±8,0	95,8±14,5
p21-negativ (n=30)	38,3±5,5	87,4±7,9
p-Wert	0,001	0,682
UICC III		
p21-positiv (n=25)	66,8±6,3	50,6±7,2
p21-negativ (n=55)	64,5±6,4	78,7±5,1
p-Wert	0,514	0,003

Tabelle 15: Mittelwerte mit Standardabweichung des rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p21-Expression stratifiziert nach dem UICC-Stadium (n=116).

Stratifiziert nach der Tumorlokalisierung zeigten Kolonkarzinom-Patienten sowohl ein besseres rezidivfreies, als auch ein besseres Gesamtüberleben wenn sie p21-negativ waren im Vergleich zu p21-positiven Patienten auf, (Abb. 17 und 18, S. 34). Bei Patienten mit Rektumkarzinom gab es hingegen keinen Unterschied (Tabelle 16, S. 33).

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
Kolon		
p21-positiv (n=17)	47,6±10,2	49,5±8,8
p21-negativ (n=20)	79,2±8,9	90,6±6,4
p-Wert	0,046	0,002
Rektum		
p21-positiv (n=14)	54,4±7,2	68,2±12,0
p21-negativ (n=65)	77,1±5,7	80,0±5,4
p-Wert	0,563	0,494

Tabelle 16: Mittelwerte mit Standardabweichung des rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p21-Expression stratifiziert nach der Tumorlokalisierung (n=116).

Abbildung 17: Rezidivfreies Überleben der Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom p21-Status (p=0,046).

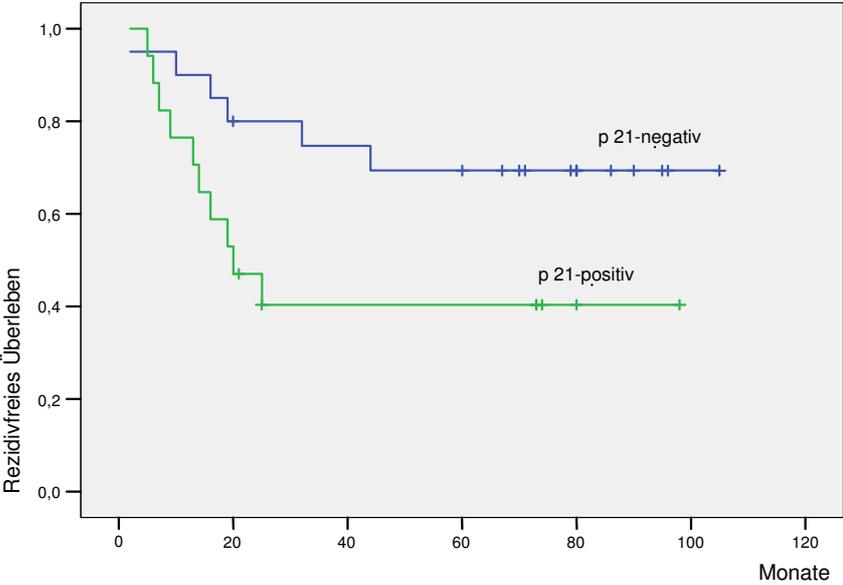
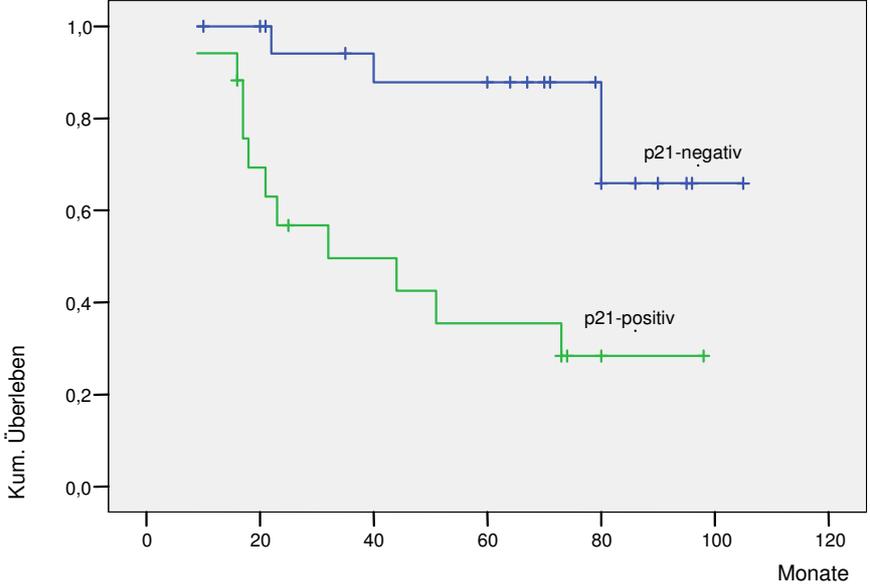


Abbildung 18: Gesamtüberleben der Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom p21-Status (p=0,002).



3.5. Expressionsstatus und adjuvante Therapie

Die Stratifizierung nach Tumorlokalisation konnte bei der Analyse des Zusammenhangs zwischen Expressionsstatus und dem Überleben in Abhängigkeit von der Applikation einer adjuvanten Therapie aufgrund der in den einzelnen Subgruppen zu geringen Fallzahl im Weiteren nicht aufrechterhalten werden, so dass hier eine Gesamtbetrachtung aller kolorektalen Karzinome erfolgte. Daten über die Durchführung einer adjuvanten Therapie konnten bei 114 Patienten erhoben werden.

3.5.1. p53-Status und adjuvante Therapie

Sowohl Patienten mit positivem p53-Status als auch solche mit negativem p53-Status zeigten im rezidivfreien und im Gesamtüberleben keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (Tabelle 17, S. 35).

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

Tabelle 17: Mittelwerte mit Standardabweichung des p53-Status und rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=112).

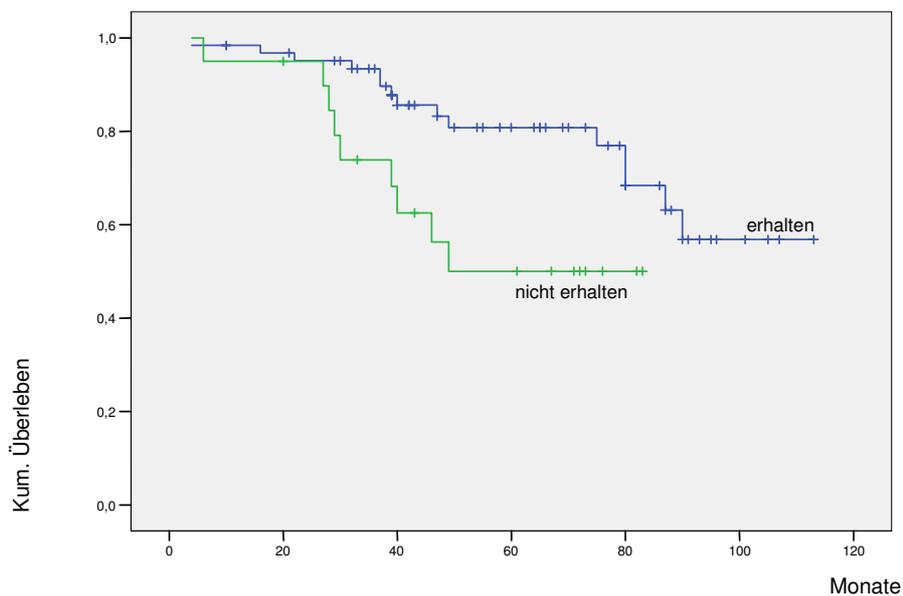
3.5.2. p21-Status und adjuvante Therapie

Weder im rezidivfreien noch im Gesamtüberleben wiesen p21-positive Patienten einen Benefit nach Applikation einer adjuvanten Therapie auf. Patienten mit negativem p21-Status profitierten hingegen signifikant von einer adjuvanten Therapie bezüglich des Gesamtüberlebens (Tabelle 18, Abb. 19, S. 36).

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
p21-positiv		
mit adjuvanter Therapie (n=28)	46,0±6,1	57,7±8,2
ohne adjuvante Therapie (n=3)	68,3±24,2	71,3±21,8
p-Wert	0,511	0,359
p21-negativ		
mit adjuvanter Therapie (n=63)	84,3±5,4	90,7±4,7
ohne adjuvante Therapie (n=20)	59,2±6,7	58,3±6,1
p-Wert	0,239	0,017

Tabelle 18: Mittelwerte mit Standardabweichung des p21-Status und rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=114).

Abbildung 19: Gesamtüberleben p21-negativer Patienten in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (p=0,017).



3.6. Zusammenhang zwischen p21 und p53

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl p53-positive Patienten als auch p21-negative Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil haben (Vgl. Abb. 13, S. 29; Abb. 15 und 16, S. 32). Da der Zellzyklusregulator p21 u.a. abhängig vom Tumorsuppressorgen p53 ist (Vgl. Abb. 2, S. 11), wurde im Weiteren untersucht, welche Bedeutung die Kombination dieser Gene auf das rezidivfreie und auf das Gesamtüberleben hat. Dazu wurden die möglichen Kombinationen (p21+/p53+, p21+/p53-, p21-/p53+, p21-/p53-) miteinander verglichen. Dabei wies die Gruppe p21-/p53+ gegenüber allen anderen Gruppen sowohl ein längeres rezidivfreies Überleben ($86,5 \pm 5,9$ vs. $57,9 \pm 5,0$ Monate; $p=0,007$), als auch ein längeres Gesamtüberleben auf ($94,5 \pm 5,0$ vs. $63,7 \pm 5,5$ Monate; $p < 0,0001$) (Abb. 20 und 21, S. 37-38).

Abbildung 20: Rezidivfreies Überleben p21-negativer/p53-positiver Patienten im Vergleich zu Patienten, die p21-/p53- bzw. p21+/p53- bzw. p21+/p53+ waren ($p=0,007$).

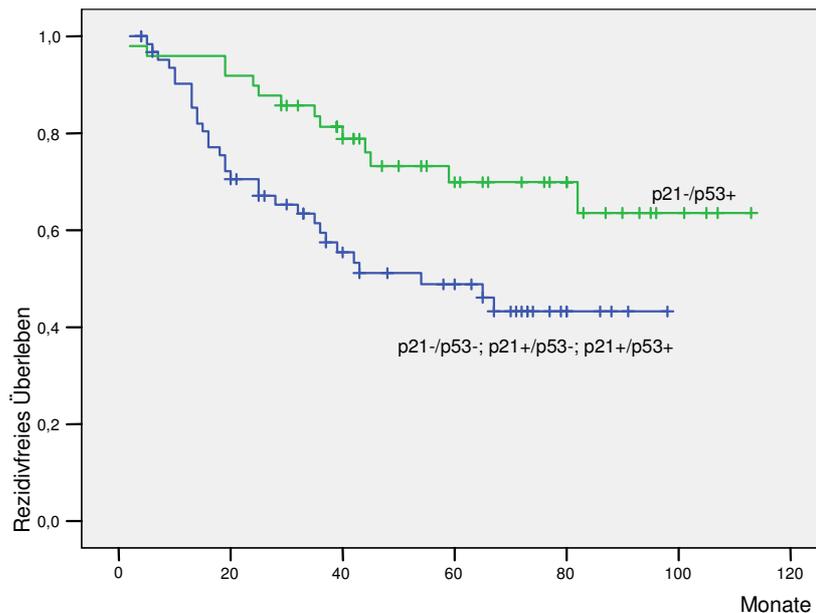
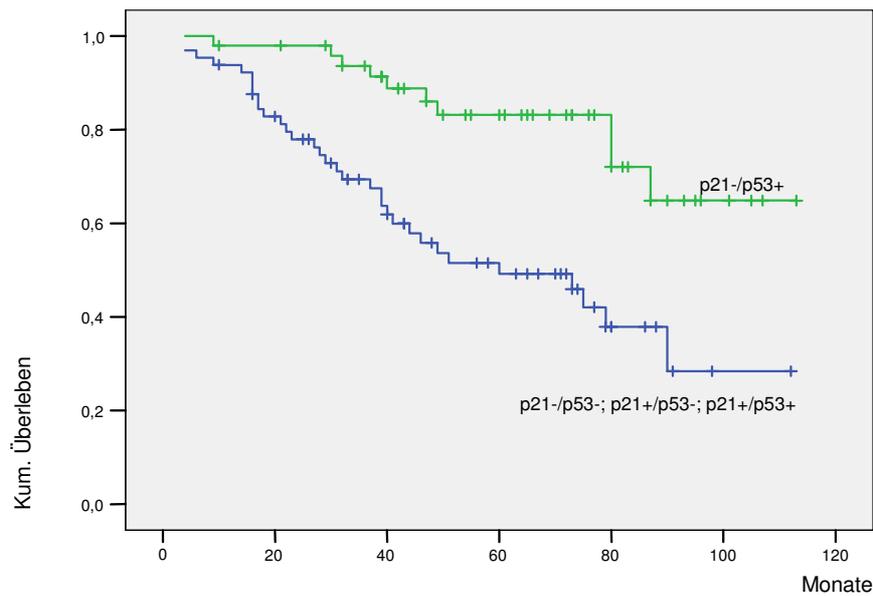


Abbildung 21: Gesamtüberleben p21-negativer/p53-positiver Patienten im Vergleich zu Patienten, die p21-/p53- bzw. p21+/p53- bzw. p21+/p53+ waren ($p < 0,0001$).



Die Überlebensanalyse stratifiziert nach UICC-Stadien zeigte einen Vorteil der Gruppe p21-/p53+ gegenüber den anderen möglichen Subgruppen (Tabelle 19, S. 38). Lediglich das rezidivfreie Überleben der Patienten im UICC-Stadium III war in beiden Gruppen gleich ($p = 0,221$).

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
UICC II		
p21-/p53+ (n=18)	97,8±7,8	107,8±5,0
p21-/p53-, p21+/p53-, p21+/p53+ (n=18)	46,3±6,2	72,0±10,2
p-Wert	0,003	0,012
UICC III		
p21-/p53+ (n=31)	76,8±7,3	85,0±6,0
p21-/p53-, p21+/p53-, p21+/p53+ (n=49)	60,5±5,9	58,5±5,3
p-Wert	0,221	0,012

Tabelle 19: Mittelwerte mit Standardabweichung des rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p21-/p53+-Expression gegenüber p21-/p53-, p21+/p53-, p21+/p53+ stratifiziert nach dem UICC-Stadium (n=116).

3.7. p21/p53 und adjuvante Therapie

Entsprechend den vorhergehenden Untersuchungen wurde der Zusammenhang zwischen dem Expressionstatus von p21/p53 und dem Überleben in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie analysiert. Ein Effekt der adjuvanten Therapie auf das rezidivfreie und auf das Gesamtüberleben ließ sich für keine der Subgruppen (p21+/p53+, p21+/p53-, p21-/p53+, p21-/p53-) belegen (Tabelle 20, S. 39).

	Rezidivfreies Überleben (Monate)	Gesamtüberleben (Monate)
p21-negativ/p53-positiv mit adjuvanter Therapie (n=39) ohne adjuvante Therapie (n=9)	89,3±6,4 70,1±7,7	99,4±4,8 68,5±7,0
p-Wert	0,698	0,177
p21-negativ/p53-negativ mit adjuvanter Therapie (n=22) ohne adjuvante Therapie (n=11)	61,8±7,5 43,9±7,5	66,9±6,7 44,1±7,0
p-Wert	0,468	0,139
p21-positiv/p53-positiv mit adjuvanter Therapie (n=21) ohne adjuvante Therapie (n=2)	44,4±7,0 53,5±31,5	57,6±9,3 58,0±28,3
p-Wert	0,969	0,691
p21-positiv/p53-negativ mit adjuvanter Therapie (n=7) ohne adjuvante Therapie (n=1)	Nicht möglich	Nicht möglich

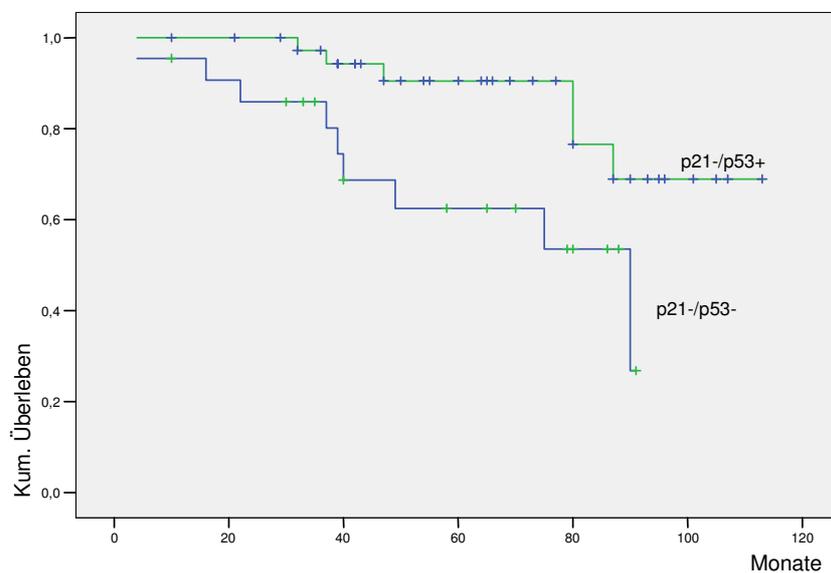
Tabelle 20: Mittelwerte mit Standardabweichung des p21/p53-Status und rezidivfreien sowie Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Durchführung einer adjuvanten Therapie (n=112).

Andererseits konnte gezeigt werden, dass p21-negative Patienten nach Durchführung einer adjuvanten Therapie ein signifikant längeres Gesamtüberleben haben (Vgl. Tabelle 18 und Abb. 19, S. 36). Daher wurde überprüft, in wie weit bei diesen Patienten der p53-Status für dieses gute Ansprechen von Bedeutung ist. Bei der Analyse zeigte sich, dass p21-negative/p53-positive Patienten gegenüber p21-negativen/p53-negativen Patienten nach Durchführung einer adjuvanten Therapie ein signifikant längeres Gesamtüberleben hatten (Tabelle 21, Abb. 22, S. 40).

	Rezidivfreies Überleben <i>(in Monaten)</i>	Gesamtüberleben <i>(in Monaten)</i>
Mit adjuvanter Therapie		
p21-/p53+ (n=39)	89,3±6,4	99,4±4,8
p21-/p53- (n=22)	61,8±7,5	66,9±6,8
p-Wert	0,140	0,012
Ohne adjuvante Therapie		
p21-/p53+ (n=9)	70,1±7,7	68,6±7,0
p21-/p53- (n=11)	43,9±7,5	44,1±7,0
p-Wert	0,113	0,095

Tabelle 21: Zusammenhang zwischen der Durchführung einer adjuvanten Therapie und rezidivfreiem sowie Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom p53-Status bei p21-negativen Patienten angegeben in Mittelwerten mit Standardabweichung (n=81).

Abbildung 22: Gesamtüberleben nach adjuvanter Therapie in Abhängigkeit vom p53-Status bei p21-negativen Patienten (p=0,012).



3.8. Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass das Alter, der Lymphknoten- und Metastasenstatus, das Auftreten eines Rezidives, der p21-Expressionsstatus sowie der Subgruppenstatus p21-/p53+ unabhängige prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben darstellen (Tabelle 22, S. 41).

	p-Wert	Hazard Ratio	95% Konfidenzintervall
Geschlecht	0,1117	1,78	0,88 - 3,62
Alter	0,001	1,05	1,02 - 1,09
Lokalisation	0,5956	1,23	0,57 - 2,64
Tumorstadium pT1/pT2 pT3/pT4	0,425	1,0 1,63	0,49 - 5,37
Lymphknotenstatus pN0/pN1 pN2/pN3	0,002	1,0 2,71	1,45 - 5,08
Histologischer Grad G1/G2 G3	0,746	1,0 1,11	0,59 - 2,11
Metastasenstatus M0 M1	<0,001	1,0 3,37	1,87 - 6,08
Adjuvante Therapie	0,9810	0,99	0,39 - 2,52
Rezidiv	<0,0001	8,56	3,96 - 18,50
Expression p21	0,0039	2,96	1,42 - 6,18
Expression p53	0,1260	0,58	0,29 - 1,17
Expression p21-/p53+ p21+/p53-, p21+/p53+, p21-/p53-	0,001	1,0 3,4	1,63 - 7,24

Tabelle 22: Cox proportional hazard Regressionsanalyse des Gesamtüberlebens (n=114)

4. DISKUSSION

In den letzten Jahren wurden die chirurgische Qualität und somit auch die Prognose nach kurativer Resektion eines kolorektalen Karzinoms deutlich verbessert. Trotzdem entwickelt ein Teil der Patienten Lokalrezidive und/ oder Fernmetastasen. Deshalb stehen Untersuchungen hinsichtlich zusätzlicher prognostischer Faktoren, die helfen Patienten mit schlechter Prognose zu determinieren, im Vordergrund der chirurgischen Forschung, um multimodale Therapie-konzepte und Nachsorge zu differenzieren und anzupassen.

Das Wissen über die genetischen Grundlagen von Krankheiten bietet neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten. Neben der klinischen Diagnostik des kolorektalen Karzinoms erlangt die Ermittlung von Gendefekten zunehmend an Bedeutung, um so Menschen mit erhöhtem Risiko ermitteln und entsprechend versorgen zu können. Ebenso wichtig scheinen diese Gendefekte für das Ansprechen einer adjuvanten Therapie zu sein.

Die Kombination von molekularen Markern in Bezug auf ihren prognostischen Vorhersagewert und zur Identifizierung von Risikopatienten ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Das Tumorsuppressorgen p53 wurde in vielen Untersuchungen getestet, wobei die prognostische Relevanz fraglich bleibt [25, 31, 41-43].

Die Kombination von p53 mit seinem transkriptionellen Zielgen, dem Zellzyklusregulator p21, wurde hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung besonders für den Benefit einer adjuvanten Therapie bisher erst wenig untersucht und auch hier zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse [30, 32, 34, 44, 45]. So wurde beispielsweise in einer Studie gezeigt, dass p21-positive Tumoren ein verkürztes rezidivfreies Überleben nach neoadjuvanter Therapie haben [30]. In einer anderen Untersuchung hingegen wiesen p21-positive Tumoren, im Gegensatz zu p21-negativen, ein gutes Ansprechen auf eine neoadjuvante Therapie auf, für p53-positive oder negative Karzinome zeigte sich kein signifikanter Unterschied [35].

Aufgrund der uneindeutigen Studienlage war es das Anliegen der zugrunde liegenden Untersuchung den prognostischen Aussagewert der einzelnen Gene und eine eventuelle Assoziation untereinander zu bestimmen. Des Weiteren wurden die Genprodukte von p53 und p21 hinsichtlich ihrer Häufigkeit, der klinisch-pathologischen Parameter und des Effektes einer adjuvanten Therapie überprüft.

4.1. Material und Methoden

Bei dem hier untersuchten Patientenkollektiv mit kolorektalen Karzinomen im UICC-Stadium II und III wurde gemäß den Einschlusskriterien eine R0-Resektion durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die adjuvante Chemo- bzw. Radiochemotherapie. Die Nachsorgedaten der Patienten wurden durch Korrespondenz mit den nachbehandelnden Ärzten erfasst. Die Tumoren wurden mittels Immunhistochemie hinsichtlich der Genexpression von p21 und p53 untersucht.

Der Nachweis von mutierten Genen erfolgt mittels molekulargenetischer Analysetechniken.

Für die Bestimmung des Tumorsuppressorgens p53 existieren zwei Standardtechniken: die DNA-Analyse zur Detektion von Mutationen im p53-Gen und die Immunhistochemie zur Detektion einer abnormalen nukleären Akkumulation des p53-Proteins. Eine p53-Überexpression wird hierbei als Marker für p53-Mutationen genutzt. Dieser Zusammenhang muss allerdings nicht immer bestehen, denn viele genetische Veränderungen resultieren nicht in einer p53-Überexpression und positive Immunhistochemie für p53 kann auch in Abwesenheit von Mutationen stattfinden. Die Korrelation zwischen p53-Genstatus und p53-Expression beim kolorektalen Karzinom beträgt 70% und mehr [25, 46].

Im Gegensatz zum Tumorsuppressorgen p53 wird für die Bestimmung von p21 nur die Immunhistochemie genutzt. DNA-Analysen zum Ausschluss von Mutationen im Zellzyklusregulationsgen p21 werden nicht durchgeführt [30, 33, 34, 40, 47].

Die immunhistochemische Färbetechnik stellt ein weit verbreitetes und etabliertes Verfahren dar. Normale Dickdarmschleimhaut zeigt eine schwache oder keine p53 Expression, in gesunden Zellen ist die p21 Expression ebenfalls gering [48]. Bei heterogener Immunreaktion im Tumorgewebe wurden repräsentative Ausschnitte aus der Tumormitte zur Auswertung herangezogen.

Vorbehandlungen des Gewebematerials, das Fixierungsmittel (Formalin), die Entwässerung, die Paraffineinbettung und die Entparaffinierung gelten als Ursache für die Heterogenität der Proteinexpression. Dies führt zur Beeinträchtigung der Antigenität, da sich bei diesen Prozeduren Quervernetzungen zwischen den Proteinen ausbilden, wodurch sich die dreidimensionale Struktur der Proteine verändert. Mittels der hitzeinduzierten Antigen-demaskierung durch den Citratpuffer wird nur ein Teil dieser Veränderungen wieder rückgängig gemacht.

Eine positive Proteinexpression bedeutet nicht unbedingt auch das Vorhandensein eines funktionstüchtigen Gens. So führen beispielsweise Missense-Mutationen zwar zu funktionslosen aber normal exprimierten Proteinen [49]. Das Mutationsspektrum umfasst Deletionen, Einzelbasenverluste, Nonsense- und Missense Mutationen, wobei nicht alle zum Verlust der Proteinexpression führen.

Die verschiedenen Ursachen der unterschiedlichen Proteinexpression sind daher auch bei diesem Patientenkollektiv und der Ergebnisinterpretation zu berücksichtigen.

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass die Aussagekraft der Immunhistochemie abhängt von der Art und Dauer der Gewebefixation, den verwendeten Antikörpern, der Proteinmodifikation durch Mutation oder Promotormethylierung sowie der subjektiven Beurteilung des Untersuchers.

Dennoch stellt die immunhistochemische Expressionsanalyse eine wichtige und etablierte Methode in der pathologischen Diagnostik dar, um neben der histologischen Auswertung ausführlichere Informationen über Tumoren zu liefern.

Die Auswertung der Färbegergebnisse erfolgte anhand des oben beschriebenen Scores (s. S. 19, Tabelle 8). In der Literatur existieren verschiedene Angaben für die Cut-off-Punkte von p53; sie variieren von 5% [42, 50] bis zu 50% [39]. Für p21 liegen die Werte zwischen 5% [39, 40] bis 10% [44, 51]. In der zugrunde liegenden Arbeit wurde der Cut-off für p53 bei einer Expression >25% und für p21 >5% gewählt. Die schwankenden Werte der Cut-off-Punkte sind eventuell ein Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Zusammensetzung des Patientengutes

Es sind 116 Patienten in die Studie eingeschlossen worden. Die Größe des Patientengutes variiert in den verschiedenen Untersuchungen (n = 34 bei Reerink et al. [45] bis n = 891 bei Elsaleh et al. [25]). Ein großer Teil der Studien umfasst jedoch zwischen 100 und 200 Patienten [32, 34, 43, 44, 52-54].

Ein Teil unserer Patienten (21%) erhielt aus verschiedenen Gründen keine adjuvante Therapie (z.B. hohes Alter, persönliche Entscheidung oder Komorbidität). Diese Patienten konnten somit als Vergleichsgruppe herangezogen werden. In anderen Studien wurden hingegen nur 30% der Patienten einer adjuvanten Therapie unterzogen [25, 31].

Hinsichtlich der UICC-Klassifikation befanden sich 29,6% im Stadium II und 70,4% unserer Patienten im Stadium III. Auch dazu finden sich in der Literatur große Unterschiede. Teilweise wurden Patienten im Stadium I-IV bzw. Dukes A-D untersucht [28, 41-43]. In andere Studien wurden hingegen nur Patienten im Stadium UICC II oder III bzw. Dukes C eingeschlossen [25, 26, 29, 53]. Die Unterschiede in der Anzahl und der verschiedenen Stadien der Patienten sind möglicherweise ein Grund für die widersprüchliche Studienlage.

4.2.2. Prognostische Relevanz des p53-Status

4.2.2.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika

In der zugrunde liegenden Studie war eine positive p53-Expression in 63,2% von 114 kolorektalen Tumoren nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse (63 und 64%) waren in den Arbeiten von Ricciardiello und Ahnen zu finden [51, 52]. Andere Studien veröffentlichten Werte um die 40% [50, 54, 55], wieder andere ergaben Werte um die 50% [43, 53, 56], 70% [28] oder sogar 81% [42]. Für diese Diskrepanzen können, wie bereits oben erwähnt, eine Reihe von Faktoren eine Rolle spielen, wie beispielsweise die verschieden große Anzahl der untersuchten Tumoren, die unterschiedlich genutzten Antikörper, Scores und Cut-off-Werte für eine positive Wertung des p53.

Keines der in unserer Studie untersuchten klinisch-pathologischen Merkmale bezogen auf den p53-Status war signifikant. Auch andere Arbeitsgruppen konnten p53 nicht mit solchen in Zusammenhang bringen [29, 43, 50, 57, 58].

Im Gegensatz dazu fanden einige Autoren Assoziationen zwischen p53-Status und Lokalisation im distalen Kolon [59-61]. Auch Russo zeigte, dass p53 Mutationen häufiger bei Tumoren im distalen Kolon und Rektum auftreten. Außerdem waren in dieser Studie p53 Mutationen mit lymphatischer Invasion bei proximaler Lokalisation, mit dem Dukes Stadium und mit lymphatischer und vaskulärer Invasion bei distaler Lokalisation assoziiert [31]. Die Arbeitsgruppe von Lan fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer p53-Überexpression und der Lokalisation im Rektum sowie einer guten bis mäßigen Tumordifferenzierung (G1 und 2 vs. G3)[62]. In 2 Fällen wurde ein positiver p53-Status mit dem gehäuften Vorhandensein von Lebermetastasen in Verbindung gebracht [63, 64].

4.2.2.2. Einfluss von p53 auf die Prognose

Die Studienlage zur prognostischen Relevanz des Tumorsuppressorgens p53 ist widersprüchlich. In unserer Untersuchung konnte ein signifikant längeres Gesamtüberleben bei p53-positiven Patienten festgestellt werden (83 vs. 60 Monate, $p=0,048$). Auch andere Autoren konnten dies zeigen [26, 28, 62, 65]. Im Gegensatz dazu brachten andere Forschungsgruppen eine positive p53-Expression mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang [32, 41, 43, 50, 53, 54]. In einer Untersuchung an Rektumkarzinomen waren p53 Mutationen mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert [66]. Neben diesen gibt es noch weitere Studien, bei denen sich keine signifikante Beziehung zwischen der p53-Expression und Überleben fand [27-29, 67]. Auch Russo konnte keinen prognostischen Wert von p53 Mutationen für das Gesamtüberleben zeigen. Lediglich in Subgruppenanalysen bezogen auf bestimmte Mutationsarten und Lokalisationen zeigten p53 Mutationen ein schlechteres Outcome [31]. Einen Überblick über eine Auswahl, zu diesem Thema bisher erschienener Studien, gibt die Tabelle 23 (S. 47).

Ebenso unklar ist der Zusammenhang zwischen p53 und dem rezidivfreien Überleben. In unserer Studie zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Fernebro und Klump kamen zum gleichen Ergebnis [27, 42]. Schwandner und Resnick beschrieben hingegen eine p53 Akkumulation als signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von Rezidiven [32, 53]. Auch Galizia zeigte, dass eine positive p53-Expression einen prognostisch ungünstigen Faktor in Bezug auf das rezidivfreie Überleben darstellt [43].

Die Analyse der p53-Expression zeigt, dass im Stadium II nach UICC bei p53-positiven Patienten sowohl das Gesamt- (105 vs. 58 Monate, $p = 0,002$) als auch das rezidivfreie Überleben (92 vs. 38 Monate, $p = 0,001$) verlängert war. Bei der Überlebensanalyse stratifiziert nach der Lokalisation im Kolon oder Rektum zeigte sich bei p53-positiven Patienten mit einem Rektumkarzinom ein verlängertes Gesamtüberleben (89 vs. 54 Monate, $p = 0,002$). Diese Zusammenhänge sind in den bisher publizierten Artikeln nicht beschrieben worden.

In der multivariaten Analyse war der p53 Expressionsstatus kein unabhängiger Faktor. Zu diesem Ergebnis kamen Klump und Koautoren ebenfalls [27]. Im Gegensatz dazu steht die Untersuchung von Galizia, in der sie p53 als unabhängigen prognostischen Parameter beschreiben [43].

Referenz	N	Stadium	Follow up (Monate)	Methode	p53-Expression, Mutation (in %)	Prognostischer Marker (Statistik)
Elsaleh et al. 2000 [29]	388	Dukes C	60	SSCP	28	Nein (U)
Gafa et al. 2000 [41]	216	UICC I-IV	75	IHC	48	Ja (U)
Elsaleh et al. 2001 [25]	891	UICC III	78	IHC SSCP	40 38	Ja (U)
Watanabe et al. 2001 [67]	516	Dukes B-C	>56	IHC	46	Nein (U)
Schwandner et al. 2002 [32]	160	UICC I –III	38	IHC	39	Ja (U)
Fernebro et al. 2004 [42]	269	Dukes A-D	35-42	IHC	81	Nein (U)
Galizia et al. 2004 [43]	104	Dukes A-D	36	IHC	52	Ja (M)
Klump et al. 2004 [27]	371	UICC I-III	43	IHC	36-42	Nein (M)
Resnick et al. 2004 [53]	134	UICC II	96	IHC	54	Ja (U)
Smyth et al. 2004 [54]	111	UICC I-II	42	IHC	39	Ja (U)
Hilska et al. 2005 [28]	363	Dukes A-D	>60	IHC	74	Nein (U)
Zhao et al. 2005 [50]	93	Dukes A-C	60	IHC	43	Ja (U)
Lyall et al. 2006 [26]	90	Dukes C	>60	IHC	19	Ja (U)
Eigene Studie	114	UICC II-III	58	IHC	63	Nein (M)

Tabelle 23: Prognostische Relevanz der p53-Expression

IHC: Immunhistochemie, SSCP: single strand confirmation polymorphism, M: multivariate Analyse, U: univariate Analyse

4.2.3. Prognostische Relevanz des p21-Status

4.2.3.1. Häufigkeit und Tumorcharakteristika

In dieser Studie zeigten 26,3% der Tumoren eine positive p21-Expression. Eine ähnliche Expressionsrate wies Fu nach [47]. Andere Autoren berichten über Expressionsraten von 36% [32], 46-47% [32, 44, 67] bis hin zu 68% [39]. Häufiger wurde die p21-Expression in MSI-H Tumoren untersucht und es fiel auf, dass p21 hier in bis zu 100% exprimiert wird. Wohingegen in Tumoren mit MSI-L oder MSS Status nur eine 50%ige Expression von p21 vorlag [39, 51].

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass p21-negative Tumoren häufiger im Rektum als im Kolon lokalisiert sind. Die Untersuchung von Ricciardiello et al. ergab, dass eine verstärkte p21-

Expression im rechten Kolon zu beobachten war [51]. Schwandner zeigte einen Zusammenhang zwischen dem gehäuftem Auftreten von p21-positiven Tumoren in den UICC-Stadien I und II im Gegensatz zum UICC-Stadium III [32].

Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten keinen Zusammenhang zwischen dem p21-Status und Tumorcharakteristika nachweisen [40, 44]. Insgesamt gibt es bislang wenige Angaben in der Literatur bezüglich der p21-Expression und klinisch-pathologischen Parametern.

4.2.3.2. Einfluss von p21 auf die Prognose

In der zugrunde liegenden Studie ging ein negativer p21-Expressionsstatus sowohl für das rezidivfreie - als auch für das Gesamtüberleben mit einem Vorteil einher. Zu einem anderen Ergebnis kam Schwandner, der nachwies, dass ein negativer p21-Status mit einer höheren Rezidivrate assoziiert ist [44]. In einer anderen Studie korrelierte eine positive p21-Expression mit einem verbesserten rezidivfreien Überleben [32]. Mitomi registrierte einen Zusammenhang zwischen negativem p21-Status und einer Häufung von Lymphknoten- und/oder Lebermetastasen [68].

In der Studie von Lebe hatte eine positive p21-Expression beim Rektumkarzinom keinen Einfluss auf die Entwicklung von Rezidiven oder Fernmetastasen [33]. Einzelheiten der dazu erschienenen Studien sind der Tabelle 24 (S. 49) zu entnehmen.

In unserer Untersuchung wurde festgestellt, dass p21 nicht exprimierende Tumoren zwar mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben im Stadium II (38 vs. 92 Monate, $p = 0,001$) aber mit einem verlängerten Gesamtüberleben im Stadium III (79 vs. 51 Monate, $p = 0,003$) assoziiert sind. Hinzuweisen ist auf die sehr kleine Anzahl der p21-positiven Patienten im UICC-Stadium II ($n=6$, s. Tabelle 15, S. 33). Das Überleben stratifiziert nach der Lokalisation, ging in dieser Studie mit einem Vorteil für p21-negative Patienten mit Kolonkarzinomen einher (91 vs. 50 Monate, $p = 0,002$). Der prognostische Einfluss von p21 abhängig vom UICC-Stadium und der Lokalisation ist bislang nicht untersucht bzw. beschrieben worden.

In der durchgeführten multivariaten Analyse zeigte sich, dass der p21-Expressionsstatus einen unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben darstellt. Auch Mitomi und Koautoren kommen zu diesem Ergebnis [68]. Wobei in der zugrunde liegenden Studie ein negativer Expressionsstatus für eine verbesserte Prognose steht, in der Untersuchung von Mitomi hingegen steht die Downregulierung von p21 für die Anwesenheit von Metastasen und somit für eine schlechtere Prognose.

Referenz	N	Stadium	Follow up (Monate)	Methode	p21 Expression (in %)	Prognostischer Marker
Schwandner et al. 2002 [44]	97	UICC I-II	54	IHC	46	Ja (M)
Schwandner et al. 2002 [32]	160	UICC I-III	38	IHC	36	Ja (M)
Prall et al. 2004 [34]	184	UICC I-IV	k.A.	IHC	47	Ja (U)
Mitomi et al. 2005 [68]	211	Dukes B-D	kein	IHC	k.A.	Ja (M)
Eigene Studie	116	UICC II-III	58	IHC	26	Ja (M)

Tabelle 24: Prognostische Relevanz der p21-Expression

IHC: Immunhistochemie, M: multivariate Analyse, U: univariate Analyse, k.A.: keine Angabe

4.2.4. Expressionsstatus und Einfluss der adjuvanten Therapie auf die Prognose

4.2.4.1. Adjuvante Therapie und p53

In unserer Studie zeigten sich bezogen auf den p53-Status und die Durchführung einer adjuvanten Therapie keine Unterschiede im rezidivfreien – und Gesamtüberleben. In der Literatur existieren sowohl für die adjuvante als auch für die neoadjuvante Therapie widersprüchliche Ergebnisse. So fanden auch die Arbeitsgruppen um Elsaleh, Schelwies und Broll keine Assoziationen zwischen p53-Status und dem Ansprechen auf eine adjuvante Therapie [29, 69, 70]. Und auch die Arbeitsgruppen von Rau, Reerink und Lopez-Crapez konnten keine prognostische Relevanz des p53-Status für den Erfolg einer neoadjuvanten Therapie beim Rektumkarzinom feststellen [30, 45, 46].

Ahnen und Mitarbeiter hingegen fanden heraus, dass die p53-negativen Patienten ein längeres Überleben hatten als die p53-positiven [52] und auch Schwandner zeigte eine Abnahme der rezidivfreien Überlebensrate bei nukleärer Akkumulation von p53 [32]. In einer Studie an Rektumkarzinomen waren p53 Mutationen mit einer schlechteren Response auf die neoadjuvante Radiotherapie verbunden [66].

Die Untersuchung von Russo zeigte, dass p53 Mutationen mit einem besseren Überleben nach adjuvanter Chemotherapie assoziiert sind, wenn der Tumor im proximalen Kolon lokalisiert ist [31]. Einzelheiten zum Studiendesign der einzelnen Arbeiten sind in Tabelle 25 (S. 50) dargestellt.

Referenz	N	Stadium	Follow up (Monate)	p53-Expression (in %)	Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie
Ahnen et al. 1998 [52]	129	UICC II-III	96	63	- (a)
Elsaleh et al. 2000 [29]	388	Dukes C	60	28	= (a)
Schelwies et al. 2002 [69]	116	UICC III-IV	17	40	= (a)
Schwandner et al. 2002 [32]	160	UICC I-III	38	39	- (a)
Rau et al. 2003 [30]	66	Dukes B	40	43	= (n)
Reerink et al. 2004 [45]	34	k.A.	38	47	= (n)
Lopez-Crapez et al. 2005 [46]	70	UICC I-II	k.A.	56	= (n)
Eigene Studie	112	UICC II-III	58	63	= (a)

Tabelle 25: Positive p53-Expression und Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie

=: kein Unterschied zur Vergleichsgruppe, -: negativer Effekt,
n: neoadjuvant, a: adjuvant, k.A.: keine Angabe

4.2.4.2. Adjuvante Therapie und p21

Insgesamt existieren bislang wenige Arbeiten zum p21-Status und dessen Bedeutung für eine (neo-) adjuvante Therapie (siehe Tabelle 26, S. 51).

Ein negativer p21-Status ging in der zugrunde liegenden Studie mit einem verlängertem rezidivfreien und Gesamtüberleben nach Erhalten einer adjuvanten Therapie einher.

Rau kam zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei zu beachten ist, dass es sich hierbei um eine neoadjuvante Therapie handelte. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass ein negativer p21-Status beim Rektumkarzinom nach präoperativer Radiochemotherapie mit einem verbesserten rezidivfreien Überleben einhergeht [30]. Und die Ergebnisse von Reerink besagen, dass eine positive p21-Expression mit einem schlechteren Überleben nach neoadjuvanter Therapie assoziiert ist [45].

Im Gegensatz dazu beschreibt Schwandner eine Verbesserung des rezidivfreien Überlebens nach adjuvanter Therapie bei p21-positiven Tumoren [32].

Referenz	N	Stadium	Follow up (Monate)	p21-Expression (in %)	Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie
Schwandner et al. 2002 [32]	160	UICC I-III	38	36	+ (a)
Rau et al. 2003 [30]	66	Dukes B	40	35	- (n)
Reerink et al. 2004 [45]	34	k.A.	38	35	- (n)
Eigene Studie	114	UICC II-III	58	26	- (a)

Tabelle 26: Positive p21-Expression und Effekt der (neo-) adjuvanten Therapie

+: positiver Effekt, -: negativer Effekt,
n: neoadjuvant, a: adjuvant, k.A.: keine Angabe

4.2.5. Zusammenhänge zwischen p53 und p21

Wie eingangs dargestellt ist p53 ein transkriptioneller Aktivator von p21 (s. Abb.2, S. 10). In vorangegangenen Studien wurde bei kolorektalen Karzinomen ein Zusammenhang zwischen fehlender p53 und positiver p21 Expression beobachtet [39, 51]. Schwandner et al. zeigten ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen p21 und p53-Expression [32]. In einer anderen Studie hingegen ist eine positive p53 Expression mit einer ebenfalls positiven p21 Expression assoziiert [30]. Und in der vorliegenden Arbeit fanden sich hinsichtlich ihrer Expression keine Zusammenhänge zwischen p53 und p21.

Es erfolgte deshalb zur Überlebensanalyse eine Einteilung in Subgruppen. Hierzu ergab sich für Patienten mit p53+/p21- kolorektalen Karzinomen ein Vorteil für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben. Es zeigte sich sogar, dass diese Kombination einen unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben darstellt. Kürzlich wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen negativer p21 und positiver p53-Expression in kolorektalen Karzinomen beschrieben [71], wobei die Autoren nicht die Expression bezüglich des klinischen Verlaufs analysiert haben. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten Schwandner und Koautoren, dass Patienten mit p53+/p21- Tumoren mit einem geringeren rezidivfreien Überleben einhergehen als solche mit p53-/p21+ Tumoren [32].

In früheren Untersuchungen an soliden Tumoren, u. a. auch kolorektalen Karzinomen wurde p53 überwiegend als ungünstiger prognostischer Faktor bewertet [72, 73]. Jedoch zeigten neuere Studien, dass Patienten mit p53-positiven Tumoren ein längeres Gesamtüberleben haben [26, 52, 62, 65]. Auch die zugrunde liegende Arbeit konnte das bestätigen und zeigte darüber hinaus eine bessere Prognose für Patienten mit p21-negativen Tumoren. Die Bestimmung von p53 Alterationen allein hat, wie die Literatur zeigt, keine eindeutige signifikante Korrelation zum

Krankheitsverlauf bei kolorektalen Karzinomen ergeben. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass eine p53 Bestimmung in Kombination mit anderen molekularen Parametern eine prognostische Bedeutung haben könnte. Das Tumorsuppressorgen p53 übt seine Funktion überwiegend durch transkriptionelle Aktivierung von Targetgenen aus und bewirkt u. a. über p21 einen Zellzyklusarrest. Mutationen im p53-Gen bewirken einen Funktionsverlust als Transkriptionsfaktor, somit findet auch der eigene Abbau durch Mdm-2 nicht mehr statt, infolge dessen kommt es zu einer Akkumulation von p53. Abnormales p53 könnte so auch nicht mehr als transkriptioneller Aktivator für nachgeschaltete Gene wirken, was wiederum eine negative p21-Expression erklären würde.

Die Unterschiede bezüglich der prognostischen Relevanz in den bisherigen Studien können durch verschiedene Einflussfaktoren bedingt sein. Hierzu gehören die verschiedenen Antikörper für die immunhistochemischen Analysen, uneinheitliches Scoring der immunhistochemischen Färbungen sowie unterschiedliche Patientenkohorten (u. a. verschiedene adjuvante Therapien). Weiterhin spielen auch der p53-Mutationslokus und die Tumorlokalisation eine Rolle. Zu berücksichtigen ist auch, dass trotz p53 Mutation eine Expression stattfinden kann. Und eine immunhistochemisch nachgewiesene positive p53-Expression bedeutet nicht zwangsweise, dass p53 funktionell inaktiv ist [74]. Eine p53-Überexpression kann auch durch den p53-Wildtyp bedingt sein, beispielsweise durch Amplifikation oder Überexpression von HDM-Proteinen [75]. Da eine fehlende Expression von p21 [76] und auch Mutationen von p53 zur Apoptose führen können [77], ist in dieser Patientengruppe möglicherweise eine Konstellation gegeben, die sich günstig auf die Tumorprogression auswirkt.

Die Daten aus der Literatur und der vorliegenden Studie weisen auf eine potenzielle prognostische Relevanz für p53 und p21 beim kolorektalen Karzinom hin.

Ein Ansprechen auf die adjuvante Therapie ließ sich für keine der Subgruppen nachweisen. Da aber p21-negative Patienten von dieser Therapie profitierten, wurde geprüft, welchen Einfluss der p53-Status darauf hat. Nach Analyse des p53-Status der p21-negativen Tumoren zeigte sich, dass p21-/p53+ Patienten ein längeres Gesamtüberleben nach adjuvanter Therapie aufweisen als p21-/p53- Patienten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die fehlende p21 Expression kein Zellzyklusarrest vermittelt wird und somit ein Ansprechen der sich teilenden Zellen auf die adjuvante Therapie gewährleistet ist. Die Expression des p53 könnte trotz Mutation stattfinden, so dass funktionell inaktives p53 auch keine Apoptose bewirken würde und dadurch einen Effekt der adjuvanten Therapie ermöglichen könnte. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht untersucht und sollte daher in weiteren Studien geprüft werden.

4.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Das Tumorsuppressorgen p53 wird in ca. 63% exprimiert. Die positive Expression zeigt keinen Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Parametern. Patienten mit p53-positiven Tumoren weisen einen Vorteil im Gesamtüberleben auf. Ein positiver Effekt der adjuvanten Therapie in Abhängigkeit vom p53-Status lässt sich statistisch nicht nachweisen. Der Stellenwert des p53 als Prognoseparameter für die Klinik bleibt also weiterhin fraglich.

Der Zellzyklusregulator p21 wird in 74% nicht exprimiert. Eine negative Expression wird signifikant häufiger im Rektum beobachtet. Patienten mit negativem p21-Status entwickeln seltener ein Rezidiv und haben ein längeres Gesamtüberleben. Auch nach adjuvanter Therapie zeigen die nicht exprimierenden Tumoren eine deutlich bessere Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben. Ein negativer p21-Status stellt einen unabhängigen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben dar.

In der Subgruppenanalyse weisen Patienten mit dem Expressionsstatus p21-/p53+ ein besseres rezidivfreies – und Gesamtüberleben auf. Nach Durchführung einer adjuvanten Therapie zeigten lediglich die p21-negativen Patienten, die zusätzlich nach dem p53-Status stratifiziert wurden, in der Gruppe p21-/p53+ ein signifikant längeres Gesamtüberleben.

Es sollte berücksichtigt werden, dass die Standardtherapieverfahren sich seit Beginn der Studie geändert haben. So wird beim nodal-positiven Kolonkarzinom nach chirurgischer Resektion zusätzlich Oxaliplatin appliziert. Beim Rektumkarzinom wird derzeit bei Tumoren >T2 und/oder positivem Nodalstatus eine neoadjuvante Radio-Chemotherapie durchgeführt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Daten aus der Literatur und der vorliegenden Studie auf eine potenzielle prognostische Relevanz für p21 und p53 beim kolorektalen Karzinom hinweisen. In nachfolgenden Studien sollte dies weiter untersucht werden, um die individuell beste Therapie für jeden Patienten, abhängig vom Tumorprofil, zu gewährleisten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einführung

Es gibt in der Literatur widersprüchliche Angaben zum prognostischen Wert des Tumorsuppressorgens p53 beim kolorektalen Karzinom. Auch sein transkriptionelles Zielgen, der Zellzyklusregulator p21, wird hinsichtlich seiner Bedeutung für die Prognose und den Effekt einer adjuvanten Therapie kontrovers diskutiert.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von p53 und p21 und klinischen bzw. histopathologischen Parametern sowie dem rezidivfreien und Gesamtüberleben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen als auch deren Bedeutung für die adjuvante Therapie zu evaluieren.

Material und Methoden

Es wurden Nachsorgedaten von 125 Patienten mit sporadischem kolorektalen Karzinom im Stadium II-III nach UICC erfasst, die im Zeitraum von 1995-2001 in der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin behandelt worden sind. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug $51,8 \pm 2,5$ Monate.

Die Proteinexpression der Gene wurde mittels Immunhistochemie an den Tumorblöcken der Patienten untersucht. Die Berechnung der Überlebenszeiträume erfolgte mit der Kaplan Meier Methode.

Ergebnisse

Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 64% ($\pm 4,7\%$), die rezidivfreie Überlebensrate ergab 62% ($\pm 4,8\%$). Die Auswertung der immunhistochemischen Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens p53 zeigte eine Verteilung von 63,2% p53-positiven Patienten. Bei der Untersuchung von p21 zeigte sich in 73,7% eine negative Expression.

Patienten, die eine positive p53-Expression aufwiesen, hatten ein signifikant besseres Gesamtüberleben als p53-negative ($83,4 \pm 4,9$ vs. $60,3 \pm 5,1$ Monate, $p=0,048$). Die p21-negativen Patienten hatten mit $82,4 \pm 4,8$ Monaten sowohl ein besseres rezidivfreies Überleben ($p=0,02$) als auch ein besseres Gesamtüberleben mit $83,9 \pm 4,5$ Monaten ($p=0,005$) im Vergleich zu p21-positiven Patienten ($56,8 \pm 7,5$ bzw. $60,9 \pm 8,0$ Monate).

Eine Subgruppenanalyse ergab einen Vorteil der Gruppe p21-negativ/p53-positiv gegenüber allen anderen Kombinationen. Das rezidivfreie Überleben betrug in dieser Gruppe $86,5 \pm 5,9$ Monate ($p=0,007$), das Gesamtüberleben $94,5 \pm 5,0$ Monate ($p < 0,0001$).

Nach adjuvanter Therapie zeigten p21-negative Patienten einen Vorteil im Gesamtüberleben gegenüber denen ohne adjuvante Therapie ($90,7 \pm 4,7$ vs. $58,3 \pm 6,1$ Monate, $p=0,017$).

Patienten, die hinsichtlich ihrer Expression p21-negativ und zusätzlich p53-positiv waren, hatten im Vergleich zu p21-negativ/p53-negativ ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben nach Durchführung einer adjuvanten Therapie ($99,4 \pm 4,8$ vs. $66,9 \pm 6,8$ Monate, $p=0,012$).

Die multivariate Analyse ergab, dass das Alter, der Lymphknoten- und Metastasenstatus, das Auftreten eines Rezidives, der p21-Expressionsstatus sowie der Subgruppenstatus p21-/p53+ unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben darstellen.

Schlussfolgerung

Das Zellzyklusregulationsgen p21 ist in Bezug auf das Überleben und den Effekt einer adjuvanten Therapie ein wichtiger prognostischer Parameter. Die Kombination p21-/p53+ stellt eine günstige Subgruppe dar.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung(en)
bzw.	beziehungsweise
CDK	cyclin dependent kinases
CDKI	cyclin dependent kinases-inhibitor
CEA	carcinoembryonales Antigen
CRC	kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
etc.	et cetera
Gy	Gray
HNPCC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
HWZ	Halbwertszeit
IHC	Immunhistochemie
kum.	kumuliert
m	männlich
MMR	Mismatch-Repair
MMRG	Mismatch-Repair-Gen(e)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	high level Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	low level Mikrosatelliteninstabilität
MSS	mikrosatellitenstabil
n	Anzahl
OP	Operation
PCR	polymerase-chain-reaction
SSCP	single strand confirmation polymorphism
U	Univariate Analyse
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
w	weiblich

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert-Koch-Institut (2008) Gesundheitsberichterstattung. In:
2. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
3. Schmoll HJ, Höffken, K., Possinger, K. (1997) Kompendium Internistische Onkologie. Springer Verlag, Heidelberg.
4. Wittekind C, Tannapfel A (2003) [Regression grading of colorectal carcinoma after preoperative radiochemotherapy. An inventory]. *Pathologie* 24:61-65.
5. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2343-2351.
6. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R (2004) Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 351:1731-1740.
7. Ruschoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G, Muders M, Blasenbren-Vogt S, Rummele P, Muller A, Buttner R (2004) [Molecular pathology in hereditary colorectal cancer. Recommendations of the Collaborative German Study Group on hereditary colorectal cancer funded by the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe)]. *Pathologie* 25:178-192.
8. Daniel PT, Ganten, Ruckpaul (2003) Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Springer Verlag, Heidelberg.
9. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-305.
10. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
11. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
12. Haupt Y, Barak Y, Oren M (1996) Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J* 15:1596-1606.
13. Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ (1996) mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 16:2445-2452.
14. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362:857-860.
15. Wadgaonkar R, Collins T (1999) Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J Biol Chem* 274:13760-13767.
16. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387:299-303.
17. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.
18. Tao W, Levine AJ (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6937-6941.
19. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998) The alternative product from the human CDKN2A

- locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 17:5001-5014.
20. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92:713-723.
 21. Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523-526.
 22. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22:3551-3555.
 23. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, Piedbois P, Rotman N, Kouyoumdjian JC, Lubin R, Delchier JC, Soussi T (1997) Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 40:356-361.
 24. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532.
 25. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B (2001) P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1343-1349.
 26. Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI (2006) Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:1184-1191.
 27. Klump B, Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Gaco V, Gittinger FS, Sarbia M, Borchard F, Greschniok A, Gruenagel HH, Porschen R, Gregor M (2004) Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data and review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 19:23-42.
 28. Hilska M, Collan YU, VJ OL, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, Roberts PJ (2005) The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 48:2197-2208.
 29. Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N, Iacopetta B (2000) p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* 58:52-59.
 30. Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dorken B, Daniel PT (2003) Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 21:3391-3401.
 31. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N (2005) The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 23:7518-7528.
 32. Schwandner O, Bruch HP, Broll R (2002) p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 17:11-19.
 33. Lebe B, Sarioglu S, Sokmen S, Ellidokuz H, Fuzun M, Kupelioglu A (2005) The clinical significance of p53, p21, and p27 expressions in rectal carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13:38-44.
 34. Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M (2004) Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:111-121.
 35. Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, Walters R, Anne P, Mitchell E, Fry R, Boman B, Rose D, Fishel R, Curran W, Palazzo J (2004) Microsatellite status and cell cycle

- associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 24:3161-3167.
36. Hermanek P, Mansmann U, Altendorf-Hofmann A, Hermanek P, Jr., Riedl S, Staimmer D (1999) [Comparative study of oncological outcome quality in colorectal carcinoma--ranking by surrogate endpoint?]. *Chirurg* 70:407-414.
 37. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C (2008) [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol* 46:799-840.
 38. Junginger TH, Dieter Kurt; Sauer, Rolf; Hermanek, Paul (1999) Adjuvante Therapie beim Kolon- und Rektumkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt* 96:A-698-700.
 39. Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, Barusevicius A, Rose D, Kovatich AJ, Boman B, Fry R, Fishel R, Palazzo JP (2000) Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 31:1506-1514.
 40. Allal AS, Gervaz P, Brundler MA (2004) Cyclin D1, cyclin E, and p21 have no apparent prognostic value in anal carcinomas treated by radiotherapy with or without chemotherapy. *Br J Cancer* 91:1239-1244.
 41. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, Lanza G (2000) Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 89:2025-2037.
 42. Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M (2004) Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 111:921-928.
 43. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C (2004) Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 10:3490-3499.
 44. Schwandner O, Bruch HP, Broll R (2002) Prognostic significance of p21 and p27 protein, apoptosis, clinical and histologic factors in rectal cancer without lymph node metastases. *Eur Surg Res* 34:389-396.
 45. Reerink O, Karrenbeld A, Plukker JT, Verschueren RC, Szabo BG, Sluiter WJ, Hospers GA, Mulder NH (2004) Molecular prognostic factors in locally irresectable rectal cancer treated preoperatively by chemo-radiotherapy. *Anticancer Res* 24:1217-1221.
 46. Lopez-Crapez E, Bibeau F, Thezenas S, Ychou M, Simony-Lafontaine J, Thirion A, Azria D, Grenier J, Senesse P (2005) p53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: a prospective multilevel analysis. *Br J Cancer* 92:2114-2121.
 47. Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, Nita ME, Masaki T, Ishimaru G, Higuchi Y, Tsuruo T, Muto T (1998) Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 41:68-74.
 48. Lee M, Sup Han W, Kyoung Kim O, Hee Sung S, Sun Cho M, Lee SN, Koo H (2006) Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer. *Pathol Res Pract* 202:415-424.
 49. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA (1999) Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52:455-460.
 50. Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ (2005) Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:1163-1169.

51. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterini P, Biasco G, Martinelli GN, Roda E, Bazzoli F (2005) High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 11:4234-4240.
52. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, Jr., Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL, Jr. (1998) Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 58:1149-1158.
53. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE (2004) Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 10:3069-3075.
54. Smyth EF, Sharma A, Sivarajasingham N, Hartley J, Monson JR, Cawkwell L (2004) Prognostic implications of hMLH1 and p53 immunohistochemical status in right-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 47:2086-2091; discussion 2091-2082.
55. Lanza G, Gafa R, Maestri I, Santini A, Matteuzzi M, Cavazzini L (2002) Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Mod Pathol* 15:741-749.
56. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N (2001) Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48:821-829.
57. Gallego MG, Acenero MJ, Ortega S, Delgado AA, Cantero JL (2000) Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 43:971-975.
58. Tollenaar RA, van Krieken JH, van Slooten HJ, Bruinvels DJ, Nelemans KM, van den Broek LJ, Hermans J, van Dierendonck JH (1998) Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer* 77:1842-1847.
59. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B (2001) Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 44:364-372; discussion 372-363.
60. Diez M, Medrano M, Muguera JM, Ramos P, Hernandez P, Villeta R, Martin A, Noguerales F, Ruiz A, Granell J (2000) Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res* 20:3907-3912.
61. Kapiteijn E, Liefers GJ, Los LC, Kranenbarg EK, Hermans J, Tollenaar RA, Moriya Y, van de Velde CJ, van Krieken JH (2001) Mechanisms of oncogenesis in colon versus rectal cancer. *J Pathol* 195:171-178.
62. Lan YT, Chang SC, Li AF, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Lin JK (2007) p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 22:499-506.
63. Kastriakis WV, Ramchurren N, Rieger KM, Hess DT, Loda M, Steele G, Summerhayes IC (1995) Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* 11:647-652.
64. Yamaguchi A, Nakagawara G, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I (1993) p53 immunoreaction in endoscopic biopsy specimens of colorectal cancer, and its prognostic significance. *Br J Cancer* 68:399-402.
65. Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R, House A, Iacopetta B (1997) p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res* 3:1405-1411.

66. Rebeschung C, Gerard JP, Gayet J, Thomas G, Hamelin R, Laurent-Puig P (2002) Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma. *Int J Cancer* 100:131-135.
67. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, 3rd, Hamilton SR (2001) Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344:1196-1206.
68. Mitomi H, Mori A, Kanazawa H, Nishiyama Y, Ihara A, Otani Y, Sada M, Kobayashi K, Igarashi M (2005) Venous invasion and down-regulation of p21(WAF1/CIP1) are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology* 52:1421-1426.
69. Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, Scherubl H, Schindler I, Hermann S, Stein H, Buhr HJ, Riecken EO, Zeitz M, Dorken B, Daniel PT (2002) Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer* 99:589-596.
70. Broll R, Busch P, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Farke S, Bruch HP, Windhovel U (2005) Influence of thymidylate synthase and p53 protein expression on clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 20:94-102.
71. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ogawa A, Dorfman I, Loda M, Fuchs CS (2006) Down-regulation of p21 (CDKN1A/CIP1) is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *J Pathol* 210:147-154.
72. Lanza G, Jr., Maestri I, Dubini A, Gafa R, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L (1996) p53 expression in colorectal cancer: relation to tumor type, DNA ploidy pattern and short-term survival. *Am J Clin Pathol* 105:604-612.
73. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T, Koivula T, Virtanen S, Hakama M (1994) Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer* 70:293-296.
74. Munro AJ, Lain S, Lane DP (2005) P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 92:434-444.
75. Ramos YF, Stad R, Attema J, Peltenburg LT, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2001) Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res* 61:1839-1842.
76. Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1931-1936.
77. Bhonde MR, Hanski ML, Notter M, Gillissen BF, Daniel PT, Zeitz M, Hanski C (2006) Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. *Oncogene* 25:165-175.

8. DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank für die sehr gute Zusammenarbeit gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Privatdozent Dr. med. Martin Kruschewski (Chirurgische Klinik I, Charité Campus Benjamin Franklin, Direktor Prof. Dr. H.J. Buhr) sowie Frau Dr. med. Aurelia Noske (Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Direktor Prof. Dr. M. Dietel). Sie haben mir die Möglichkeit verschafft, an dieser Studie mitzuwirken und gaben mir bei der Bearbeitung des Themas wichtige gedankliche Anstöße. Bei Herrn Dr. Kruschewski bedanke ich mich sehr herzlich für die ständige und sehr engagierte Unterstützung und Beratung bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Loddenkemper vom Institut für Pathologie, Charité Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. H. Stein) für die Unterstützung bei der Auswahl und Bereitstellung der Tumorblöcke.

Ich danke meiner Kollegin Frau Kathrin Müller für die gute Zusammenarbeit bei der Eruiierung der Patientendaten.

Außerdem danke ich meinem Lebenspartner Marc Körner sowie meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung.

9. ERKLÄRUNG

„Ich, Sybille Lipka, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die prognostische Relevanz von p21 und p53 sowie deren Bedeutung als Response-Parameter für die adjuvante Therapie des kolorektalen Karzinoms selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. PUBLIKATIONSLISTE

Zeitschriftenbeiträge:

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

Vorträge:

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

Poster:

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