

Diplomarbeit

Analyse von p53, p63 und p73 beim kolorektalen Karzinom

eingereicht von

Marion Julia Pollheimer

Mat.Nr.: 0212272

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

Univ. Doz. Dr. med. Cord Langner

Graz, am 30.06.2009

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.06.2009

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer, Herrn Univ.-Doz. Dr.med. Cord Langner, für die tatkräftige und umfangreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Diplomarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt auch Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Peter Rehak, der mich bei der Aufschlüsselung und Auswertung der Daten sehr unterstützt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr.med.univ. Peter Kornprat.

Ich darf meinen Eltern, die nicht nur mein Studium finanziert haben, sondern auch ständig ein sehr großes Interesse an meiner Arbeit zeigten, ein sehr herzliches Dankeschön aussprechen.

Großer Dank gilt auch meinem Freund, Dominik, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir großen Rückhalt gegeben hat.

Weiters bin ich meiner Schwester, Verena Pollheimer, für ihre Mitarbeit bei der histologischen Auswertung unserer Daten sowie meinem Mitstudenten, Richard Lindtner, für die sorgfältige Erstellung des klinischen Follow-Ups sehr dankbar.

Bei Frau Elisabeth Grygar und Frau Margit Gogg-Kamerer möchte ich mich sehr herzlich für die Konstruktion der TMAs sowie deren Färbung bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei der Medizinischen Universität Graz für die Bewilligung eines großzügigen Förderstipendiums bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärungen

Zusammenfassung

Abstract

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

1.2. Formale Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

1.3. Pathologie des kolorektalen Karzinoms

1.4. Etablierte Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinom

1.5. Problemstellung

1.5.1. Molekulare Prognosefaktoren

1.5.2. Die P53-Genfamilie

2. Material und Methoden

2.1. PatientInnenkollektiv

2.2. Histopathologie

2.3. Follow-up

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. TMA-Konstruktion

2.4.2. Immunhistochemische Färbung

2.4.3. Auswertung der Immunhistochemie

2.5. Definitionen und statistische Analysen

3. Ergebnisse

3.1. Pathologische Daten

3.2. Ergebnisse der p53-Auswertung

3.2.1. Immunhistochemie

3.2.2. Follow-up

3.3. Ergebnisse der p63-Auswertung

3.4. Ergebnisse der p73-Auswertung

4. Diskussion

Abkürzungen und deren Erklärung

AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Adenomatous polyposis coli
CAP	College of American Pathologists
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp
Cis	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC	Deleted in colorectal cancer
EEC-Syndrom	Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting-Syndrom
EGF-R	Epidermal growth factor-Rezeptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HNPCC	Hereditäres, nicht polypöses Kolonkarzinom
IGF	Insulin-like growth factor
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	Loss of heterozygosity
MDM-2	murine double minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
OD	Oligomerisationsdomäne
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDEGF	Platelet-derived endothelial growth factor
RB	Retinoblastoma Protein
SAM	sterile alpha motif
TA-Domäne	Transaktivierungsdomäne
TMA	Tissue microarray
TGF	Transforming growth factor
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Zusammenfassung

Hintergrund:

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eines der häufigsten Malignome der westlichen Welt. Nach wie vor stellt die TNM-Klassifikation die Basis für die Risikostratifizierung von betroffenen PatientInnen dar. Dennoch werden präzisere Hilfsmittel benötigt, um eine Individualisierung der Behandlung zu erreichen. Bis jetzt wurde eine große Anzahl von molekularen Prognosefaktoren in aufwändigen Forschungsleistungen im Bereich der Biologie des KRK identifiziert. Der Tumorsuppressor p53, der in ungefähr 50% der Tumoren mutiert ist, scheint zusammen mit seinen Verwandten, p63 und p73, ein guter Kandidat für prognostische Zwecke zu sein. Im Hinblick auf ihre prognostische Wertigkeit und mögliche Korrelation mit anderen prognostisch relevanten klinisch-pathologischen Parametern beim KRK ist die Datenlage im Fall von p63 und p73 mangelhaft und im Falle von p53 widersprüchlich. Wir analysierten daher die immunhistochemische Expression von p53, p63 und p73 in einem großen PatientInnenkollektiv von chirurgisch entfernten KRK, deren Korrelation mit anderen histopathologischen Variablen, sowie deren Assoziation mit dem PatientInnenüberleben.

Methoden:

Eine Gesamtzahl von 381 Primärtumoren und 178 zugehörige Metastasen wurden immunhistochemisch unter Verwendung einer TMA-Technik im Hinblick auf ihre p53-, p63- und p73-Expression untersucht. Die Immunreaktivität der Tumorzellen für p53, p63 und p73 wurde in folgende Kategorien unterteilt: 0 negativ, 1+ (1-10%), 2+ (11-25%), 3+ (26-50%), 4+ (51-75%), 5+ (76-90%), 6+ (>90%). Die Expression der p53-Familienmitglieder wurde in einem semiquantitativen Ansatz im Hinblick auf ihre Assoziation mit der T-Klassifikation, Tumordifferenzierung, Lymphknotenbeteiligung, UICC-Stadium, Tumorgroße und Geschlecht unter Verwendung des Chi-Quadrat-Test oder Fisher's Exakt Test analysiert. Die prognostische Aussagekraft bezüglich progressionsfreien und krankheitsspezifischen Überlebens wurde mit der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-Rank-Test untersucht.

Ergebnisse:

Ausreichendes Tumorgewebe war in 370 (97%) von den 381 Primärtumoren, in 128 (94%) der 136 metastatisch befallenen Lymphknoten und in 39 (93%) der 42 Fernmetastasen vorhanden. Eine p53-Expression wurde in 261 (71%) der 370 Primärtumoren, in 100 (78%) der 128 metastatisch befallenen Lymphknoten und in 26 (67%) der 39 Fernmetastasen gefunden. Weder Primärtumoren noch Metastasen zeigten eine auswertbare nukleäre Anfärbung für p63 und p73, lediglich eine zytoplasmatische Färbung konnte für p63 und p73 in einzelnen wenigen Fällen beobachtet werden.

97 (71%) der 128 Lymphknotenmetastasen zeigten eine p53-Immunreaktion, 31 (24%) waren p53-negativ. Unter den 39 Fernmetastasen zeigten 26 (67%) eine p53-Expression und 13 (33%) waren p53-negativ. Eine hohe Übereinstimmung bestand zwischen den Färbeergebnissen von Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknoten- und Fernmetastasen. Wir wiesen eine signifikante Assoziation der p53-Expression mit folgenden histopathologischen Parametern nach: Tumordifferenzierung ($p < 0.001$), Lymphgefäßinvasion ($p < 0.001$), Anzahl befallener Lymphknoten ($p = 0.013$), Tumorgröße ($p = 0.002$), UICC-Stadium ($p = 0.036$) und Veneninvasion ($p = 0.01$). Eine Beziehung der p53-Expression mit dem PatientInnenüberleben, was sowohl das progressionsfreie als auch das krankheitsspezifische Überleben betrifft, bestand nicht.

Schlussfolgerung:

In unserem PatientInnenkollektiv bestand eine signifikante Korrelation der p53-Expression mit Merkmalen eines aggressiven Tumorphänotyps, wie Angioinvasion und Lymphknotenbefall. Es zeigte sich aber keine signifikante Assoziation mit dem PatientInnenüberleben. Weiters konnten wir keine nukleäre Anfärbung für p63 und p73 nachweisen.

Abstract

Background:

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in the western world. Risk stratification of CRC patients is mainly based on the TNM staging system. In order to individualize therapeutic decisions, however, more accurate tools are warranted. Extensive research in tumour biology has identified a large number of molecular markers as candidate prognostic factors. The tumour suppressor p53, known to be mutated in approximately 50% of CRCs, and its relatives, p63 and p73, appear to be good candidates for prognostic purposes. Literature data regarding the prognostic value of the p53-family members as well as their association with other prognostically relevant clinicopathological parameters in CRC are scarce, with respect to p63 and p73, and in parts contradictory. Our investigation aims to analyze the immunohistochemical expression of p53, p63 and p73 in a large sample of surgically resected CRC and to correlate protein expression with other histopathological variables as well as survival of affected patients.

Methods:

A total of 381 primary CRCs and 178 corresponding metastases were stained immunohistochemically for p53, p63 and p73 using a tissue microarray technique. The proportions of tumor cells positive for p53, p63 and p73 were scored as follows: 0 negative, 1+ (1-10%), 2+ (11-25%), 3+ (26-50%), 4+ (51-75%), 5+ (76-90%), 6+ (>90%). The expression of the p53-family members was analyzed semiquantatively with respect to their association with pT-classification, tumour differentiation, lymph node involvement, UICC-stage, angioinvasion, tumour size and sex using the chi-square test or Fisher's exact test. The prognostic impact on disease-free and cancer-specific survival was analyzed using the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test.

Results:

Sufficient tumour tissue was present in 370 (97%) of 381 primary CRCs, in 128 (94%) of 136 metastatic lymph nodes and in 39 (93%) of 42 distant metastatic cases, respectively. Nuclear p53 immunoreactivity was found in 261 (71%) of 370 primary CRC specimens, in 100 (78%) of 128 metastatic lymph nodes and 26 (67%) of 39

distant metastases, respectively. In none of the primary tumours and/or corresponding metastases evaluable nuclear staining for p63 and p73 was detected, only faint cytoplasmic staining was observed in single cases.

97 (71%) of 128 metastatic lymph nodes showed p53-immunoreaction, 31 (24%) were p53-negative. Among the 39 distant metastases 26 (67%) exhibited p53-overexpression and 13 (33%) were p53-negative. We detected high concordance rates between staining results of primary tumours and corresponding lymph node as well as distant metastases. p53 expression was significantly associated with tumour differentiation ($p < 0.001$), lymphatic invasion ($p < 0.001$), node status ($p = 0.013$), tumour size ($p = 0.002$), UICC-stage ($p = 0.036$) and venous invasion ($p = 0.01$). Regarding prognosis, no statistically significant differences in disease-free and cancer-specific survival between patients with p53-positive and patients with p53-negative tumours was found.

Conclusions:

In our patient cohort p53 was significantly associated with features suggestive of aggressive tumour growth, such as angioinvasion and lymphatic spread. However, p53 expression was not significantly associated with patient outcome. No nuclear staining for p63 and p73 was detected.

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist eines der häufigsten Karzinome der westlichen Welt [1]. Etwa 300.000 neue Erkrankungsfälle werden in Europa und den USA jährlich neu diagnostiziert und ungefähr 200.000 Betroffene versterben an diesem Malignom bzw. an seinen Folgen.

Die Inzidenzraten weisen international große Unterschiede auf: Während in Ländern der sog. dritten Welt niedrige Karzinomraten gefunden werden, (z.B. 3.4 Karzinomfälle pro 100.000 Menschen in Nigeria) können in den westlichen Zivilisationsländern hohe Erkrankungsfälle (z.B. 35.8 Fälle pro 100.000 Menschen in Connecticut / USA) verzeichnet werden [2].

Weltweit liegt das KRK bei Männern (nach Lungen-, Prostata- und Magenkarzinomen) an vierter und bei Frauen (nach Mamma- und Zervixkarzinomen) an dritter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen. Jährlich nimmt die Zahl der Erkrankten um etwa eine Million zu. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, dies betrifft vor allem Rektumkarzinome (Geschlechtsverhältnis 60:40) [3].

In den Vereinigten Staaten beträgt der prozentuelle Anteil an jährlich auftretenden Krebserkrankungen ungefähr 10%. Etwa 150.000 neu diagnostizierte und fast 50.000 Todesfälle wurden für das Jahr 2008 prognostiziert. [1].

In den Industrieländern hat die Anzahl Darmkrebsneuerkrankungen in den letzten 30 Jahren deutlich zugenommen. Mit einer jährlichen Anzahl von Neuerkrankungen (Inzidenz) in Höhe von 30–35 pro 100.000 Einwohner ist das KRK eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen in Mitteleuropa und ist für etwa 15% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt.

In Österreich werden jedes Jahr zwischen 4.800 und 5.000 maligne Tumore im Dickdarm diagnostiziert, das sind 14% aller Neuerkrankungen. Die KRK-Inzidenz liegt bei Männern nach dem Prostata- und Bronchuskarzinom an dritter und bei Frauen an zweiter Stelle hinter dem Mammakarzinom. 70% der Diagnosen werden im Alter zwischen 50 und 80 Jahren gestellt. Im Jahr 2002 verstarben mehr als 2.400 Menschen an einem KRK, davon 68% an einem Kolonkarzinom und 32% an einem Rektumkarzinom [4].

Im Hinblick auf die Mortalität waren in Österreich sinkende Absolutzahlen bei den Frauen und ein sinkendes Risiko für beide Geschlechter für das Jahr 2008 zu verzeichnen. Das Risiko, bis zum 75. Lebensjahr an einem KRK zu sterben, ging in den letzten 15 Jahren von 1.8% auf 1.3% zurück [4]. Diese Entwicklung lässt sich europaweit verzeichnen. Nach der umfassenden Eurocare-Studie, die die Krebsregister von 18 europäischen Ländern für den Zeitraum 1988 bis 1999 ausgewertet hat, erhöhte sich der Anteil der überlebenden KRK-PatientInnen fünf Jahre nach der Krebsdiagnose von 48 auf 54% [5].

1.2. Formale Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Die Kenntnis über die Entstehung und das Verhalten maligner Dickdarntumoren stellt eine Grundvoraussetzung in der Verbesserung des Therapieerfolgs betroffener PatientInnen dar. Molekulare Studien haben gezeigt, dass der natürliche Krankheitsverlauf nicht für alle KRK gleich ist.

Die Ätiopathogenese des KRKs ist multifaktoriell. Exogene Einflüsse (Umwelteinflüssen, Ernährung, körperliche Betätigung), welche genetische Veränderungen hervorrufen können, bilden zusammen mit dem individuellen Risiko ein KRK zu entwickeln (genetische Prädisposition) die ätiologische Grundlage von malignen Dickdarntumoren.

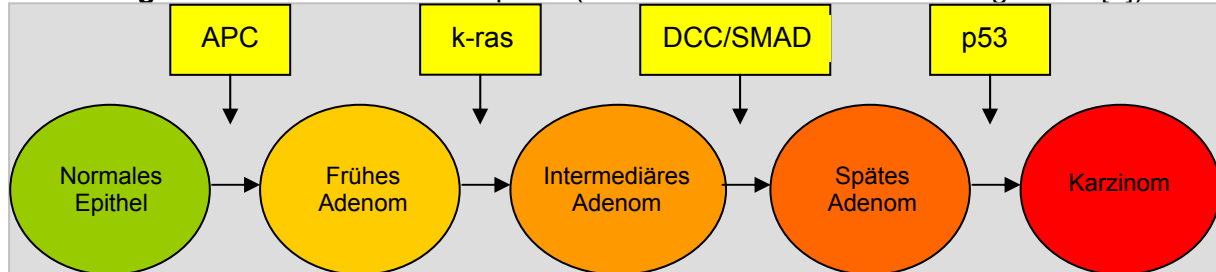
Zu 80% entwickeln sich KRK sporadisch, in den restlichen 20% ist eine familiäre Häufung nachzuweisen. In nur 5% aller KRK ist eine rein genetische Ursache auf dem Boden einer definierten hereditären Erkrankung zu detektieren. Beispiele hierfür sind das Lynch-Syndrom (hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome bzw. HNPCC-Syndrom), FAP (familiäre adenomatöse Polypose), Li-Fraumeni-Syndrom, Cronkhite-Canada-Syndrom und Peutz-Jeghers-Syndrom.

Zu den wesentlichen Risikofaktoren des sporadischen Karzinoms zählen: positive Familienanamnese, ballaststoffarme und proteinreiche Ernährung, Rauchen und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn).

Zwischen 70 und 90% aller KRK gehen aus Adenomen hervor. Adenome sind intraepitheliale Neoplasien des Drüsenepithels, die einen unterschiedlichen Ausprägungsgrad intraepithelialer Neoplasie (früher Dysplasie) aufweisen [5]. Das Entartungsrisiko ist vom Adenomtyp (tubulär vs. tubulovillös vs. villös), vom Grad der intraepithelialen Neoplasie, von der Wuchsform (sessil vs. gestielt) und von der

Adenomgröße abhängig. Villöse Adenome weisen das größte Entartungspotential auf, gefolgt von tubulovillösen und tubulären Adenomen.

Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz (modifiziert nach Fearon und Vogelstein [6])



Die Adenom-Karzinom-Sequenz, zuerst beschrieben von Fearon und Vogelstein [6], bezeichnet den Übergang eines gutartigen Kolonadenoms in ein Kolonkarzinom durch sukzessive stattfindende genetische Veränderungen (siehe Abbildung 1). Obwohl die Akkumulation von Mutationen den Hauptfaktor in der Kanzerogenese des KRKs darstellt, geht die Hypothese davon aus, dass ursächliche Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen in den meisten KRK in einer bestimmten Reihenfolge auftreten: Initial, während der Entwicklung von Polypen, kommt es zu Mutationen im APC-Gen. Diesen folgen K-ras-Mutationen beim Übergang in Adenome und p53-Mutationen vor der malignen Transformation.

Die Mechanismen der Kanzerogenese sind zum Teil bekannt. In den meisten Fällen findet man eine chromosomale Instabilität oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI), wobei beide Mechanismen von einander unabhängig stattfinden. Bei chromosomaler Instabilität (80-85%) werden genetische Aberrationen in Form von allelischen Verlusten, Amplifikationen, Translokationen nachgewiesen, sie sind die Basis für die DNA-zytometrisch nachweisbare Aneuploidie der Tumoren. Man findet häufig Mutationen in den Genen APC, K-ras, DCC/SMAD4 und p53 [5].

Bei MSI-Tumoren (10-15% der KRK) spielen Defekte in der Reparatur von DNA-Fehlpaarungen (sog. DNA-Mismatch) pathogenetisch die entscheidende Rolle. Bei sporadischen Karzinomen liegt meist ein epigenetisch bedingter Expressionsverlust (Promoterhypermethylierung) des DNA-Mismatch-Reparatur-Proteins MLH1 zu Grunde. Anders beim Lynch-Syndrom: Hier ist eine Keimbahnmutation in einem der fünf bekannten DNA-Mismatch-Reparatur-Gene (MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2) für die MSI verantwortlich. Die MSI führt zur Karzinomentstehung, indem das Auftreten von Replikationsfehlern in Tumor-relevanten Genen begünstigt wird (sog. Target-Gene) [5].

Eine Untergruppe von KRK, die durch DNA-Methylierung und Mikrosatelliteninstabilität charakterisiert ist, geht auf serratierte (gezahnte) Vorläuferläsionen, wie sessile serratierte Adenome und gemischte Polypen, zurück [7].

1.3. Pathologie des kolorektalen Karzinoms

Makroskopisch können KRK ulzerierte, polypoide, ringförmige oder stenosierende Wuchsformen aufweisen. Die meisten Karzinome des Kolon oder Rektum sind ulzerierte, gut umschriebene Tumoren mit erhabenem umgestülptem Randsaum. Die Beteiligung der Darmzirkumferenz kann eine Stenose oder Obstruktion der Lichtung zur Folge haben. Polypoide, hervortretende Formen, die für gewöhnlich weniger aggressiv sind, kommen seltener vor. Ihre bevorzugte Lokalisation ist das rechte Kolon.

Etwa 90% der KRK sind (konventionelle) Adenokarzinome, die häufigsten davon zeigen eine tubuläre Differenzierung. In ungefähr 10% kommen muzinöse Karzinome vor, die durch die Produktion von reichlich Muzin (Schleim) durch die Tumorzellen charakterisiert und dadurch definiert sind, dass der Tumor aus mehr als 50% Muzin besteht. Siegelringzellkarzinome machen nur 1% der primären Kolonkarzinome aus. Dieser Tumortyp setzt sich aus isolierten Tumorzellen zusammen, die intrazytoplasmatisches Muzin enthalten und definitionsgemäß die Hauptkomponente (mehr als 50%) des Tumors ausmachen müssen. Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse und kleinzellige Karzinome stellen sehr seltene Entitäten dar [8].

1.4. Etablierte Prognosefaktoren beim kolorektalen Karzinom

Prognosefaktoren sind Variable, die unabhängig von anderen Faktoren den Verlauf einer Erkrankung beeinflussen und dadurch eine prospektive Einschätzung des Krankheitsverlaufs zulassen. Sie stellen die Grundlage für Stratifizierungsprozesse und therapeutische Entscheidungen betroffener PatientInnen dar. Einen Überblick über etablierte konventionelle Prognoseparameter beim KRK gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Etablierte Prognosefaktoren beim KRK:

- TNM-Klassifikation der UICC/AJCC
- Lokale Tumorausbreitung (pT)
- Regionale Lymphknotenmetastasen (pN)
- Fernmetastasen (pM)
- Differenzierungsgrad (G)
- Blutgefäßinvasion (V1)
- Lymphgefäßinvasion (L1)
- Tumorzell dissoziation („Tumorbudding“) an der Invasionsfront
- Tumorkonfiguration an der Invasionsfront
- Vollständigkeit der Tumorresektion (R-Status)

TNM-Klassifikation:

Die zuverlässigste Prognoseeinschätzung des KRK basiert auf der Analyse der anatomischen Tumorausbreitung. Die TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) und der UICC (Union internationale contre le cancer) stellt den Goldstandard in der Stadieneinteilung des KRK dar, wird in nationalen, regionalen und lokalen Tumorregistern verwendet und ist der wichtigste Prognosefaktor beim KRK. Die 5-Jahresüberlebensrate für PatientInnen hängt maßgeblich vom TNM-Stadium ab [9, 10].

Die pathologische Klassifikation basiert auf der genauen mikroskopischen Beurteilung der resezierten Proben des Primärtumors. Im TNM-System bezieht sich die Bezeichnung „T“ auf die lokale Ausbreitung des Primärtumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Unter der Angabe „N“ wird der Status der regionalen Lymphknoten und unter „M“ das Vorhandensein hämatogener Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung berücksichtigt.

Die exakte Analyse regionärer Lymphknoten stellt einen der wichtigsten Aspekte für die optimale pathologische Stadieneinteilung des KRK dar. Obwohl spezielle Techniken, wie immunhistochemische Färbungen, die Detektion von isolierten Tumorzellen in regionären Lymphknoten erleichtern würden, wird auch weiterhin die Standard-HE-Histologie für die Festlegung des Lymphknotenstatus beim KRK von der UICC und der AJCC empfohlen.

Blut- und Lymphgefäßinvasion:

Neben der TNM-Klassifikation gibt es eine Reihe anderer prognostisch relevanter Faktoren beim KRK. Die Angioinvasion stellt einen kritischen Schritt in der metastatischen Kaskade, im Speziellen in der Bildung von Mikrometastasen und im Wachstum von Metastasen in den Sekundärlokalisationen dar [11].

In einigen Studien wurden mittels Multivariatanalysen sowohl die Lymph- als auch die Blutgefäßinvasion als unabhängiger, prognostisch ungünstiger Parameter identifiziert [12-15]. Andere Untersuchungen hingegen konnten die prognostische Signifikanz von Gefäßinvasionen nur in Univariatanalysen nachweisen oder machten keine Differenzierung zwischen Lymph- oder Blutgefäßen [16-18]. Dieser Umstand gestaltet es schwierig Studienergebnisse zu diesem Thema unter einen Nenner zu bringen.

Tumordifferenzierung („Grading“):

Der Differenzierungsgrad stellt einen weiteren prognostisch relevanten Faktor beim KRK dar. Derzeit gibt es jedoch keinen allgemein gültigen Konsens in der Graduierung von KRK. Während das College der amerikanischen Pathologen [19] eine zweistufige Einteilung vorschlägt, empfiehlt die WHO ein vierstufiges Graduierungssystem [20]. Beide basieren ausschließlich auf dem prozentuellen Anteil von Drüsenformationen. Demzufolge werden die Tumoren nach der WHO in die folgenden vier Differenzierungsgrade unterteilt:

- Grad 1: Hochgradig differenziert
- Grad 2: Mittelgradig differenziert
- Grad 3: Geringgradig differenziert
- Grad 4: Undifferenziert

Unter den in der Literatur angebotenen Graduierungssystemen [21,22] variieren die histopathologischen Kriterien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades stark. In einigen Studien wird die Tumordifferenzierung anhand einzelner histologischer Merkmale festgelegt, während andere Autoren eine große Zahl an mikroskopischen Kennzeichen anwenden. Die Heterogenität der Einteilungen kompliziert die Durchführung von Metaanalysen und erschwert prognostische Analysen. Nichtsdestotrotz wurde die unabhängige prognostische Signifikanz der Tumordifferenzierung in Multivariatanalysen beim KRK bestätigt [11,21,22].

Tumorzelldissoziation („Tumor-Budding“):

Die Tumorzelldissoziation beschreibt den Übergang von glandulären Karzinomstrukturen in Einzelzellformationen oder Anhäufungen von bis zu vier Tumorzellen an der Invasionsfront [23]

Die prognostische Relevanz der Tumorzelldissoziation wurde in einigen Studien aufgezeigt [23-27]. Im Einzelnen konnte nachgewiesen werden, dass der Grad der Tumorzelldissoziation an der Invasionsfront zur Abschätzung der Aggressivität von Rektumkarzinomen verwendet werden kann [24]. Der Grad des Tumor-Budding hat sich darüber hinaus bei der Abschätzung der metastatischen Lymphknotenbeteiligung als nützlich erwiesen [25].

Höher gradige Tumorzelldissoziation ist mit schlechterem PatientInnenüberleben assoziiert, was sowohl die Fünf- als auch die Zehn-Jahresüberlebensrate betrifft. Zu diesem Resultat kamen Hase und Mitarbeiter [26]. Weiters fanden sie heraus, dass das Auftreten von höhergradigem Budding mit starker biologischer Aktivität von KRK in Zusammenhang zu stehen scheint.

Laut Nakamura et al. [27] kann der Grad der Tumorzelldissoziation an der Invasionsfront als einfaches und nützliches histopathologisches Merkmal zur Vorhersage von Lungenmetastasen bei PatientInnen mit KRK nach kurativer Resektion verwendet werden und sollte zur Planung optimaler Behandlungsstrategien miteinbezogen werden .

Konfiguration der Tumorgrenze:

Die Konfiguration der Tumorgrenze – ursprünglich im Jahr 1987 von Jass und Mitarbeitern [28] beschrieben - konnte beim KRK als ein unabhängiger prognostisch ungünstiger Parameter identifiziert werden. Weiters wurde nachgewiesen, dass dieser Prognosefaktor bei der Vorhersage von Lebermetastasen hilfreich ist [11].

Grundsätzlich kann ein irreguläres, infiltratives Wachstumsmuster („infiltrativ“), vom glatt begrenzten, eher verdrängenden Wachstum („pushing, expanding“) unterschieden werden. Es hat sich gezeigt, dass Tumoren mit infiltrativem Wachstumsmuster eine deutlich schlechtere Prognose als solche mit verdrängendem Charakter aufweisen [11].

Molekulare Prognoseparameter:

Trotz gesicherter prognostischer Aussagekraft der eingangs aufgeführten konventionellen pathologischen Parametern, wie der TNM-Klassifikation, ist die Prognose der PatientInnen mit ähnlich konfigurierten Tumoren oft sehr heterogen. Um eine genauere Prognoseabschätzung und damit eine Individualisierung der Behandlungsstrategie zu erreichen, wurde nach zusätzlichen Prognosefaktoren gesucht. Die Erkenntnis, dass viele unterschiedliche genetische Aberrationen in der Entstehung des KRKs involviert sind, legt die klinische Relevanz molekularer Veränderungen nahe. Zu ihnen zählen genetische Alterationen, wie c-myc Amplifikation, her2/neu Überexpression, oder Verlust der Heterozygotie in bestimmten Chromosomenabschnitten (zum Beispiel 1p, 8p, 17p oder 18q), Faktoren für Proliferation und Angiogenese, Proteasen und deren Rezeptoren und die Expression von Plasmamembran-Glykoproteinen. Einen Überblick möglicher prognostisch relevanter Marker beim KRK gibt Tabelle 2. Bis jetzt hat sich aber keiner dieser Faktoren als Grundlage für die individuelle Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung von KRK-PatientInnen etablieren können [29].

In den letzten zehn Jahren richteten zahlreiche Forschungsgruppen ihr Augenmerk auf die Bedeutung der P53-Genfamilie, insbesondere von p53, in der Pathogenese und Prognose des KRK. Da P53 ein beim KRK sehr häufig mutiertes Gen darstellt, liegt der Verdacht nahe, dass auch die anderen Mitglieder dieser Genfamilie eine prognostisch relevante Rolle spielen können. Die Beziehung der P53-Familienmitglieder untereinander und deren klinische Relevanz ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Im Folgenden sollen die biologischen Grundzüge der Mitglieder der p53-Familie (p53, p63 und p73) sowie deren Bedeutung in der Pathogenese des KRK erläutert werden.

Tabelle 2: Molekulare Prognosefaktoren beim KRK

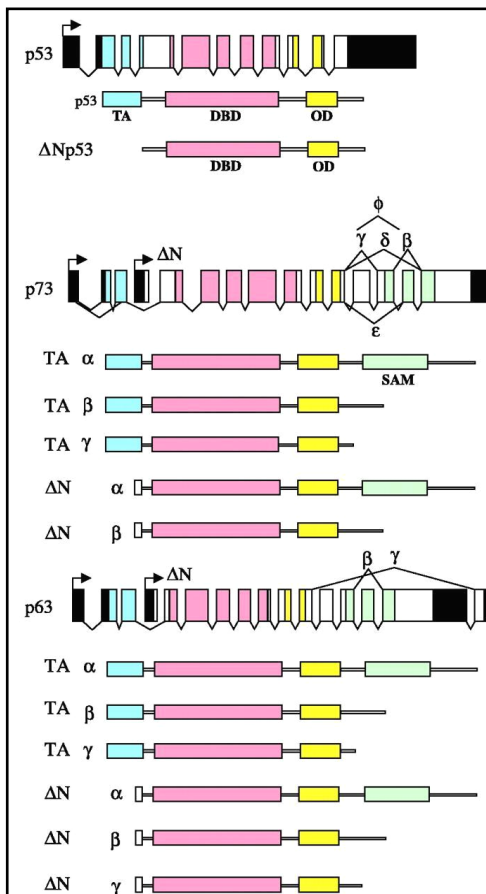
Onkogen	K-ras Her-2/neu c-myc IGF-I/IGF-II
Mikrosatelliteninstabilität	hMLH1 hMSH2
Tumorsuppressorgene	Adenomatous polyposis coli (APC) Deleted in colorectal cancer (DCC) P53 Zellzyklusregulatoren Zyklin D1 Zyklin E Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) P21 (WAF1/CIP1) P27 P16 Retinoblastoma-Protein (RB)
Zelladhäsion/Invasion	Cathepsin D Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) CD44 E-Cadherin B-Catenin Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
Proliferation/Apoptose	Bcl-2 BAX
Angiogenese	Vascular endothelial growth factor (VEGF) Platelet-derived endothelial growth factor (PD-EGF)

1.5. Problemstellung

1.5.1. Die P53-Genfamilie

Genarchitektur der p53-Familie

Abbildung 2: Genarchitektur der P53-Genfamilie (modifiziert nach Moll und Slade [30])



Die Mitglieder der p53-Familie weisen eine signifikante strukturelle Homogenität untereinander auf. Sie setzen sich aus drei unterschiedlichen Domänen zusammen: einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA-Domäne), einer zentralen DNA-bindenden Domäne (DBD) und einer C-terminalen Oligomerisationsdomäne (OD). Die größte Übereinstimmung unter den drei Familienmitgliedern lässt sich innerhalb der DBD feststellen. Die Gene können als verschiedene Proteine (Isoformen) exprimiert werden: Dementsprechend werden die langen Proteine (full-length), die eine TA-Domäne enthalten (TA-Isoform) von den ΔN -Proteinen mit fehlender TA-Domäne (ΔN -Isoform) unterschieden. Diese Variation der Genprodukte wird durch alternatives Spleißen und unter-

schiedliche Promotoren bzw. Promotorregionen generiert. Die Molekularstruktur der P63- und P73-Genprodukte ist wesentlich komplexer als jene des P53-Gens. So enthalten die p63- und p73-Proteine an ihrem COOH-Ende eine zusätzliche SAM (sterile alpha motif)-Domäne für Protein-Protein-Wechselwirkungen und weisen zwei Promotorregionen auf, die zur Synthese weiterer Proteinvarianten (α , β , γ) über die Verwendung alternativ gespleißter Exone genutzt werden [30,31]. Diese strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den p53-Familienmitgliedern ermöglichen funktionelle Interaktionen und die Regulation der Genexpression untereinander, die auch im Hinblick auf die Tumorentstehung relevant sind.

P53

Das P53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. Es kodiert für den kurzlebigen nukleären Transkriptionsfaktor p53. P53, erstmalig im Jahr 1979 beschrieben [31,32], ist das erste entdeckte Tumorsuppressorgen. Tumorsuppressorgene sind zelluläre Gene, deren Genprodukte einen hemmenden Effekt auf den Zellzyklus, die DNA-Replikation und die Zellteilung bewirken („Bremsen des Zellzyklus“). Definitionsgemäß bedingt der Funktionsverlust („loss of function“) eines Tumorsuppressorgens infolge einer fehlenden Bildung des Genprodukts oder Bildung eines defekten Genprodukts ein dereguliertes Wachstum.

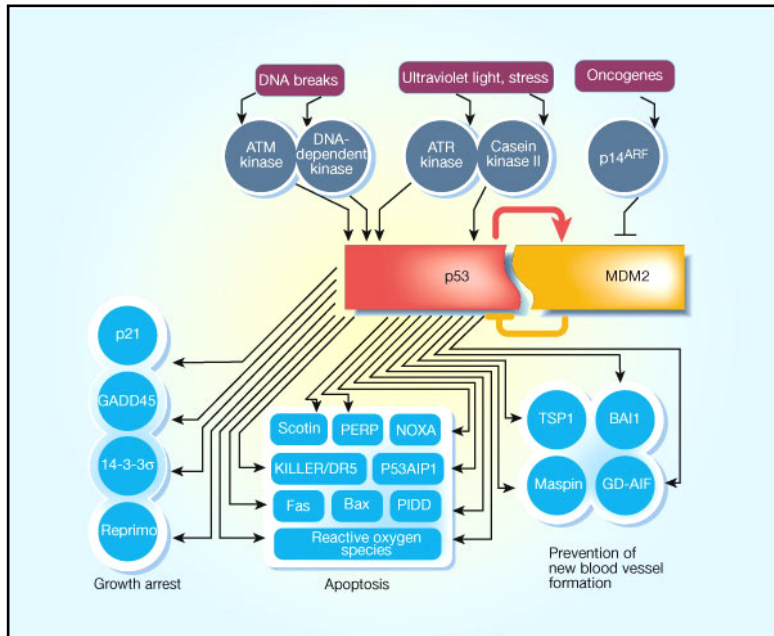
Bei Auftreten von genetischem Schaden im Genom einer Zelle wird p53 kurzfristig hochreguliert und aktiviert mehrere Zielgene, die folgendes bewirken:

- Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (G1-Arrest, Zellzyklusblockade)
- Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen
- Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) bei irreversiblen DNA-Schaden

P53 wird auf Grund seiner zellbiologisch essentiellen Funktionen als „Hüter des Genoms“ bezeichnet. Sein Genprodukt entscheidet darüber, ob eine Zelle nach genetischer Schädigung reparabel ist oder ob diese Zelle nicht mehr zur Vermehrung zugelassen wird. Abhängig vom Ausmaß des zellulären Schadens reicht das Spektrum der von p53 eingeleiteten Effekte von vorübergehender Zellzyklusblockade mit DNA-Reparatur bis hin zum irreversiblen Wachstumsstopp mit anschließender Apoptose [31]. Die Apoptose ist ein mehrstufiger Prozess (programmierter Zelltod), der einem physiologischen Selbstmord der Zelle gleichkommt.

Abgesehen vom Li-Fraumeni Syndrom, einer seltenen autosomal-dominant vererbten Krankheit, die mit P53-Keimbahnmutation und – darauf begründet – einem 50%igen Risiko im Alter von 30 Jahren an einem Krebsleiden zu erkranken einhergeht, findet man in den meisten PatientInnen somatische, auf die Tumorzellen beschränkte Mutationen des P53-Gens.

Abbildung 3: Das p53-Netzwerk (modifiziert nach Vogelstein [33])



Die Aktivierung des p53-Netzwerks (durch DNA-Schaden, UV-Licht und Onkogene) stimuliert Enzymaktivitäten, die p53 und dessen negativen Regulator, MDM2, beeinflussen. Das Ergebnis dieser Aktivierung ist eine Hochregulation des aktivierten p53-Proteins mit an-

schließender Expression von p53-Zielgenen, die in hemmende Prozesse der Zellproliferation involviert sind. Einige Zielgene inhibieren die Zellzyklusprogression (Zellzyklus-Arrest) oder die Entwicklung von Tumor versorgenden Blutgefäßen (Antiangiogenese), andere aktivieren die Apoptose. Eine negative Rückkoppelung erfolgt durch die Aktivierung von MDM-2. Die unterschiedlichen Komponenten dieses zellulären Netzwerks variieren von Zelltyp zu Zelltyp [33].

Mutationen im P53-Genlokus oder des P53-Gens sind die am häufigsten gefundenen genetischen Veränderungen im menschlichen Organismus [34]. Sie können einen Verlust oder eine Fehlfunktion des p53-Proteins zur Folge haben, sodass die betroffenen Zellen einerseits nicht in der Lage sind, ihre DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren oder den programmierten Zelltod zu beschreiten. So können sich im Laufe von mehreren Zellzyklen genetische Schäden anreichern; transformierte Zellen erfahren infolge der gestörten p53-Funktion Wachstumsvorteile in der Zellzykluskontrolle (Zellzyklusblockade) und weisen durch den Verlust von DNA-Reparaturmechanismen chromosomale Instabilität auf.

In vielen Tumoren, wie Kolon-, Lungen-, Mamma- und Magenkarzinomen, können Mutationen nachgewiesen werden, die zum Funktionsverlust des p53-Proteins führen. Dieses mutierte Protein reichert sich infolge verlängerter Lebensdauer (Halbwertszeit 4-12 Stunden) im Zellkern an und kann dadurch in den Tumorzellen immunhistochemisch (p53-Überexpression) nachweisbar werden. Im Normalgewebe hingegen ist p53 nicht detektierbar, da es nur in geringen Mengen exprimiert wird und eine extrem kurze Halbwertszeit (15-20 Minuten) aufweist.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Sequenzanalyse ermöglicht die direkte Untersuchung von Genmutationen. In über 90% handelt es sich bei P53-Alterationen um eine Punktmutation in den Exonen 5-8, die eines von 23.000 Nukleotiden im Gen verändert. Im Gegensatz zum Ras-Gen, bei dem nur drei von 189 Kodone Ziele onkogener Mutationen sind, können im P53-Gen in 300 von 393 Kodonen, die für die Synthese des Proteins verantwortlich sind, Mutationen vorkommen.

Die Immunhistochemie stellt eine etablierte, schnelle und günstige Methode für den Nachweis der p53-Proteinüberexpression im Tumorgewebe dar [35]. Verwertbar als Malignitätskriterium ist eine kräftige nukleäre Expression in Tumorzellen. Die Menge der gefärbten Zellkerne kennzeichnet die immunhistochemisch nachgewiesene p53-Überexpression [34].

Das p53-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der epithelialen Homöostase und in der Pathogenese des KRKs. Dabei scheinen P53-Mutationen besonders in den späten Stadien der Tumorentstehung, in erster Linie während der Konversion vom Adenom zum Karzinom, involviert zu sein [36,37]. In der Literatur wird die Inzidenz der p53-Abnormalitäten beim KRK mit 40-60% angegeben, diese Häufigkeit gilt sowohl für Positivität in immunhistochemischen Analysen als auch für den Nachweis von Genmutationen [37]. Es besteht aber bekanntermaßen keine unmittelbare Kongruenz zwischen der p53-Immunpositivität und assoziierten P53-Genmutationen. Das heißt, dass eine nukleäre p53-Expression in manchen Fällen auch ohne stattgefundene Genmutation und umgekehrt Genmutationen ohne Protein-Überexpression nachgewiesen werden können [35-40]. Die Konkordanz zwischen immunhistochemischen Techniken und genanalytischen Methoden in der Detektion von p53-Alterationen wird in der Literatur mit einer Spannweite von 51-79% angegeben [35,38-43].

Eine Literaturanalyse zeigt, dass P53-Abnormalitäten von klinischer Relevanz beim KRK sind, jedoch sind die Studienergebnisse diesbezüglich widersprüchlich [35-43]. Wir untersuchten daher mittels immunhistochemischer Analyse den prognostischen Stellenwert einer p53-Überexpression im Tumorgewebe im Hinblick auf das progressionsfreie und tumorspezifische Überleben von KRK-PatientInnen und deren Zusammenhang mit weiteren histopathologischen Parametern.

P63:

Das P63-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 3 lokalisiert und kodiert für drei unterschiedlich gespleißte Isoformen (α , β , γ). Durch verschiedene Promotorregionen kann einerseits die TAp63-Isoform und andererseits die Δ Np63-Variante generiert werden. Insgesamt entstehen aus dem p63-Genlokus sechs unterschiedliche p63-Isoformen (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , Δ Np63 α , Δ Np63 β und Δ Np63 γ) [44].

Trotz struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten von P53 und P63, gibt es klare Unterschiede zwischen ihnen: Während P53 häufig Mutationen in menschlichen Tumoren aufweist und als Prototyp eines Tumorsuppressorgens bezeichnet werden kann, findet man nur selten P63-Mutationen [44]. Auch die Voraussetzung eines Tumorsuppressorgens, nämlich der häufige Funktionsverlust in transformierten Zellen, der dereguliertes Tumorwachstum zur Folge hat, wird im Fall von P63 nicht erfüllt.

Die Mehrheit der Tumoren weist eine normale p63-Expression auf; allerdings zeigen einige Neoplasien auch eine Überexpression oder eine Amplifikation des p63-Genlokus (z.B. Bronchus- und Zervixkarzinome), was eher an die Merkmale eines Onkogens erinnert.

Es konnte festgestellt werden, dass die unterschiedlichen Isoformen von p63 verschiedene zelluläre Aufgaben erfüllen: Das TAp63-Protein ist, ähnlich wie p53, in der Lage an DNA zu binden und die Transkription von p53-Zielgenen zu aktivieren. Dies kann die Induktion der Zellzyklusblockade bzw. der Apoptose zur Folge haben [30,31]. Die Δ Np63-Variante kann entweder indirekt durch Bindung an die DNA oder über direkte Protein-Wechselwirkungen negative Effekte auf p53, p73 und auch p63 (TAp63-Protein) ausüben. Demzufolge ist eine Interaktion zwischen den Mitgliedern der p53-Familie möglich [30,31].

p63 zeigt eine stark variierende, gewebsspezifische Expression im Normalgewebe. Vorläuferzellen der Haut, Brust und Prostata weisen eine starke Expression der Δ Np63-Isoform auf, während das TAp63-Protein in diesen Gewebetypen kaum zu detektieren ist.

Molekulare Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass p63 essentiell an den Prozessen der Embryogenese beteiligt ist. In der epidermalen Morphogenese (Bildung der Haut und Hautanhangsgebilde) und in der Ausbildung der Gliedmaßen

spielt p63 eine entscheidende Rolle. Tiere mit fehlender p63-Expression zeigen schwere Störungen in der Extremitäten- und Epidermisentwicklung, bis hin zum Fehlen dieser, sowie kraniofaziale Malformationen. Außerdem überleben diese Tiere nur wenige Tage nach der Geburt. Auch beim Menschen haben Keimbahnmutationen des p63-Gens schwere autosomal dominant vererbte Krankheitsbilder, wie das Ectrodactyly-Ectodermal Dysplasia-Clefting-Syndrom (EEC-Syndrom), zur Folge.

Die Rolle des p63-Proteins in der Kanzerogenese ist komplex und noch nicht abschließend geklärt. Sicher ist, dass p63 nicht als typisches Tumorsuppressorgen bezeichnet werden kann. Wie bereits erwähnt, befindet sich der p63-Genlocus am langen Arm des Chromosom 3, innerhalb einer Region, die häufig in Plattenepithel-, Zervix- und Prostatakarzinomen Amplifikationen aufweist, was als Hinweis für die onkogene Wirkung von p63 gedeutet werden könnte [44].

Im Gegensatz zu p53 existieren nicht ausreichend Daten über die klinische Relevanz einer p63-Überexpression beim KHK. Zwar haben einige Studien [45-47] die Rolle des p63-Proteins in der neoplastischen Transformation und Progression thematisiert, jedoch gibt es bis dato nur zwei Arbeiten, die sich mit der p63-Immunreaktivität beim KHK beschäftigen haben [48,49].

P73:

Das P73-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert und kodiert für sieben durch alternatives Spleißen am C-Terminus (α , β , γ , δ , ϵ , ζ und η) und für vier durch alternatives Spleißen am N-Terminus entstandene Isoformen. Analog zu p63, kann durch variierende Promotorregionen das TAp73-Protein und die Δ Np73-Variante gebildet werden. Bis 2006 wurden vierzehn unterschiedliche p73-Proteine beschrieben [31].

Wie p63, wurde p73 initial für ein klassisches Tumorsuppressorgen gehalten. Diese Annahme stützte sich auf den Strukturhomologien mit p53 und der Genlokalisierung auf Chromosom 1, das in einer Vielzahl von Tumoren Deletionen aufweist. Maligne Tumore zeigen im Allgemeinen jedoch viel häufiger p73-Überexpressionen als p73-Expressionsverluste, was nicht mit den Merkmalen eines klassischen Tumorsuppressorgens konform geht.

Im Gegensatz zu p53 prädisponiert ein Mangel an p73 nicht unmittelbar zur Tumorentstehung. Molekulare Experimente haben gezeigt, dass p73 eine fundamentale Rolle in der Entwicklung neuronaler Strukturen spielt. Tiere mit fehlender p73-Expression entwickeln schwere zerebrale Fehlbildungen.

Die unterschiedlichen p73-Varianten erfüllen verschiedene Aufgaben: Die TAp73-Isoform kann, entsprechend der großen strukturellen Übereinstimmungen mit p53, durch spezifische Bindung an DNA und p53-Zielgene zur Aktivierung der Zellzyklusblockade und Induktion der Apoptose führen. Die Δ Np73-Variante ist in der Lage direkt spezifische Gene, welche von der TAp73-Isoform nicht induziert werden, zu aktivieren. Mittels DNA-Bindung oder Protein-Interaktion vermag die Δ Np73-Isoform antiapoptotische und onkogene Effekte auszuüben [31].

p73 wird nur zu einem geringen Ausmaß in normalen Zellen exprimiert, was die Detektion im Normalgewebe schwierig macht. Die häufigsten Veränderungen im Tumorgewebe entsprechen Überexpressionen der verschiedenen p73-Isoformen, dabei ist für gewöhnlich die TAp73-Variante betroffen. Eine signifikante p73-Überexpression wurde in einer Reihe von Tumoren, darunter vereinzelt auch in KRK, nachgewiesen [44]. Dies könnte für eine onkogene Wirkung von p73 sprechen. Wahrscheinlich existiert ein Expressionsgleichgewicht zwischen den proapoptotischen Proteinen, TAp73 und p53, und der antiapoptotischen Δ Np73-Proteinvariante. Diese Balance scheint eine entscheidende Rolle in der physiologischen zellulären Antwort auf genetische Schädigungen zu spielen.

Die p73-Expression beim KRK stellt, ähnlich wie p63, kein gut erforschtes Gebiet dar. Derzeit gibt es nur zwei Studien, die sich mit der prognostischen Relevanz einer p73-Überexpression beim KRK beschäftigen [50,51]. Wir untersuchten mittels Immunhistochemie den prognostischen Stellenwert einer p73-Überexpression im Hinblick auf progressionsfreies und tumorspezifisches Überleben bei KRK-PatientInnen und deren Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern.

2. Material und Methoden

2.1. PatientInnenkollektiv

Während des Zeitraums vom 1. Jänner 1984 bis 31. Dezember 2005 wurde eine Gesamtzahl von 7909 kolorektalen Karzinomen von 7564 PatientInnen (4095 Männer, 3469 Frauen; Ratio 1.2:1) in der Kolonkarzinomdatenbank am Institut für Pathologie der Medizinische Universität Graz zusammengestellt. Von diesen wurde eine Zufallsstichprobe von 400 PatientInnen (5%) für das Zeitfenster von Jänner 1992 (Einführung der computergestützten Datenerfassung) bis Dezember 2000 erhoben, mit dem Ziel ein Follow-Up von minimal fünf Jahren zu erreichen. Die Erhebung der Follow-Up Daten wurden von meinem Mitstudenten (Cand. med. Richard Lindtner) sorgfältig vorgenommen. Folgende PatientInnen wurden von der Untersuchung ausgeschlossen:

- PatientInnen, die mit einer endoskopischen Polypektomie wegen eines risikoarmen („low risk“) T1-Karzinoms behandelt wurden, nahmen auf Grund fehlender Daten im Hinblick auf den Lymphknotenstatus nicht an der Analyse teil.
- PatientInnen mit Rektumkarzinom, die eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, wurden wegen mutmaßlicher Therapie-bezogenen Veränderungen der T-Klassifikation (und auch anderer Parameter) von den Untersuchungen ausgenommen.
- PatientInnen mit synchronen oder metachronen Zweitkarzinomen im Kolon oder Rektum wurden nicht in die Analyse einbezogen, weil bei Tumorprogress der Verantwortliche der Tumoren nicht bestimmbar ist.
- PatientInnen mit konkurrierenden invasiven Karzinomen anderen Ursprungs wurden aus demselben Grund ebenfalls nicht berücksichtigt.

2.2. Histopathologie

Eine Gesamtzahl von 381 Tumoren der insgesamt 400 PatientInnen (95%) stand für die histopathologische Re-Evaluierung zur Verfügung (bei den übrigen 19 Fällen waren die Originalschnitte und/oder Paraffinblöcke im Archiv nicht auffindbar). Das Kollektiv umfasst 215 Männer (56%) und 166 Frauen (44%) (Ratio: 1.3:1) mit einem

medianen Erkrankungsalter von 68.5 Jahren und einem Mittelwert von 69.9 Jahren (Spannweite 28-93).

Die Analyse der histopathologischen Schnittpräparate wurde von drei Untersuchern (Univ. Doz. Dr. med. Cord Langner, Cand. med. Verena Pollheimer und Cand. med. Marion Pollheimer) unabhängig von einander in Bezug auf folgende histopathologische Parameter vorgenommen:

- TNM-Klassifikation, gemäß UICC 2002 [8]
- Differenzierungsgrad, gemäß aktueller WHO-Klassifikation [19]
- Histologischer Tumortyp (beinhaltet auch die Festlegung von muzinösen und plattenepithelialen Anteilen), gemäß aktueller WHO-Klassifikation [19]
- Anzahl resezierter Lymphknoten
- Anwesenheit von Lymph- oder Blutgefäßinvasionen (L1 bzw. V1)
- Konfiguration der Tumorgrenze an der Invasionsfront (nach Jass)
- Tumorzelldissoziation an der Invasionsfront (sog. Budding)
- Grad der Entzündung innerhalb des Tumors
- Anteil von eosinophilen Granulozyten an den Entzündungszellen
- Vorhandensein von neutrophil-granulozytärer Entzündung (inkl. Abszesse)
- Grad der vorhandenen Nekrose
- Grad der vorhandenen Desmoplasie
- Anwesenheit einer perineuralen Invasion

Das Tumorstadium wurde anhand der UICC 2002 Richtlinien der TNM-Klassifikation [8] durchgeführt. Die Tumordifferenzierung wurde nach den WHO-Kriterien [19], nach dem Ausmaß der glandulären Differenzierung, festgelegt. Sowohl Tumorgröße als auch Tumorlokalisation wurde der Krankengeschichte entnommen. Ein Mittelwert von 4.5 (Medianwert 4, Spannweite 1-17) in Paraffin gebettete Gewebsblöcke waren für die Analyse verfügbar. In 352 von den 381 (92%) Fällen waren zumindest drei Blöcke vorhanden.

Alle drei Untersucher analysierten die pathologischen Schnittpräparate unabhängig von einander und waren bezüglich des klinischen Verlaufes der PatientInnen geblindet, weil das Follow-Up von einem anderen Studenten (nachträglich!) durchgeführt wurde.

Die postoperative Therapie betroffener PatientInnen richtete sich nach dem UICC-Stadium: PatientInnen im Stadium I und II erhielten keine adjuvante

Behandlung, während PatientInnen im Stadium III mit 5-Fluorourazil/Folsäure gemäß Mayo Clinic-Regime therapiert wurden.

2.3. Follow-Up

Das Follow-Up inkludierte eine routinemäßig durchgeführte physikalische Untersuchung mit Anamnese, eine Laborkontrolle mit Bestimmung des Blutbilds, der Leberenzyme, des CEA und CA 19-9 alle drei Monate für die ersten drei Jahre und danach in einem sechsmonatigem Intervall. Ein Thoraxröntgen und ein Abdomenultraschall wurden alle sechs Monate in den ersten drei Jahren und in den darauffolgenden Jahren einmal jährlich durchgeführt. Bei PatientInnen mit Rektumkarzinomen wurde alle zwölf Monate ein Computertomogramm des Beckens vorgenommen.

Die Studie wurde im April 2007 von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt.

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. TMA-Konstruktion

Nach der histopathologischen Analyse erfolgte die Untersuchung von p53, p63 und p73 durch Immunhistochemie mit Hilfe einer Tissue Microarray (TMA)-Methode. Die TMAs wurden mittels eines manuellen Tissue-Array Instruments (*Beecher, Silver Spring, USA*) konstruiert.

Bei der Konstruktion der TMAs wurden jeweils zumindest 3 repräsentative Gewebestücken (Durchmesser 0,6mm) aus den primären Tumorblöcken (formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe), von unterschiedlichen Tumorabschnitten und wo vorhanden auch aus zugehörigen Lymphknoten- und Fernmetastasen, in einen TMA-Block überführt. Insgesamt wurden acht TMA-Blöcke mit zusammen 2760 Stenzen erstellt. Darunter waren 1907 Stenzen der 381 Primärtumoren (im Mittel und Median 5 Stenzen pro Tumor, Spannweite 3-14) und 853 Stenzen von 211 Metastasen (im Mittelwert 4.6 und Median 4 Stenzen pro Metastase, Spannweite 3-12).

Die 381 PatientInnen teilten sich wie folgt auf: 220 nur mit Primärtumor, 119 mit Primärtumor und Lymphknotenmetastase, 18 mit Primärtumor und Fernmetastase und 24 mit sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastase. Von den 381 Primärtumoren mussten letztlich 2 wegen im Archiv nicht auffindbarer Tumorblöcke aus der Auswertedatei entfernt werden. Somit standen am Ende 379 Primärtumoren für die immunhistochemische Analyse zur Verfügung.

Folgende Verteilung konnte für die Lokalisation der Fernmetastasen gefunden werden: Am häufigsten waren die Leber (insgesamt fünfzehn Mal und einmal mit einer ovariellen Mitbeteiligung) und das Peritoneum (zwölf Fälle, zweimal die Eierstöcke und einmal die Haut mitbetroffen) von einem metastastischen Befall betroffen. Bei weiteren fünf PatientInnen zeigten das Cerebrum, in drei Fällen der Gastrointestinaltrakt (zweimal der Dünndarm und einmal der Magen) Fernmetastasen. Die Lunge war in zwei weiteren Fällen das Ziel der Metastasierung. Am seltensten (je einmal) standen Tumorabsiedelungen in der Milz, den Ovarien, oder im Knochen für die weitere Aufarbeitung und Auswertung zur Verfügung.

2.4.2. Immunhistochemische Färbung

Vier µm dicke TMA-Schnitte wurde in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert sowie für fünf Minuten mit 1%igem Hydrogenperoxid behandelt. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde anschließend durch fünfminütige Inkubation mit *Dako Real™ (S2023) Peroxidase Blocking Solution (DAKO, Glostrup, Dänemark)* blockiert. Zur Vorbehandlung wurden die Paraffinschnitte weiters in *Epitope Retrieval Solution Dako (K5207)* für vierzig Minuten bei 98.5°C im Wasserbad belassen und anschließend zwanzig Minuten abgekühlt.

Zur Detektion von p53 wurden die Schnitte in einem ersten Schritt bei 98.5°C in *Epitope Retrieval Solution Dako (K 5207)* für vierzig Minuten vorbehandelt und danach zwanzig Minuten in einem Wasserbad ausgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte für dreißig Minuten mit dem monoklonalen Maus-Antikörper DO-7 (*m-a-human p53 Protein, Clone DO-7, Dako*) in einer Verdünnung von 1:100 in *Dako Real™ Antibody Diluent* für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion von p63 wurden die Schnitte für fünfundzwanzig Minuten in *Dako Target Retrieval Solution pH 9.0, (S 2367)* vorbehandelt und zwanzig Minuten in einem Wasserbad ausgekühlt. Danach erfolgte die Inkubation der Schnitte für

dreißig Minuten mit dem monoklonalen Maus-Antikörper BC4A4 (*P63 monoclonal Antibody, Clone BC4A4 Biocare*) in einer Verdünnung von 1:200 in *Dako RealTM Antibody Diluent* für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion von p73 wurden die Schnitte in der Mikrowelle bei 150 W und mit Natrium-Zitratpuffer (pH 6.0) für 40 Minuten vorbehandelt und danach für zwanzig Minuten ausgekühlt. Weiters wurden die Schnitte mit dem monoklonalen Maus-Antikörper p73-Protein alpha (*Clone 24, Novocastra, NCL-p73*) in einer Verdünnung von 1:30 in *Dako RealTM Antibody Diluent (S 2022)* für sechzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion der Immunreaktion wurde *Dako RealTM Detection System, Peroxidase/DAB+Rabbit/Mouse* bei Raumtemperatur für fünfzehn Sekunden appliziert. Das verwendete Chromogen war für p53 und p63 *Dako (K3464) AEC Substrate Solution* und wurde für zehn Minuten angewendet. Für die Färbung der p73-Immunreaktion wurde *Dako RealTM DAB+ Chromogen (K 5001)* für zehn Minuten angewendet.

Nach einer Kerngegenfrbung mit Hämatoxylin nach Mayer für eine Minute wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließend Xylol dehydriert.

Zur Detektion der Primrantikrperbindung wurde *Dako RealTM Detection System, Peroxidase/DAB+Rabbit/Mouse (K 500111)* bei Raumtemperatur für fünfzehn Minuten appliziert. Nach einer Gegenfärbung mit *Hämatoxylin Mayer Labonord* für eine Minute wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließend mit Xylol dehydriert.

Positiv- und Negativkontrollen (durch *Dako ChemMate Antibody Diluent, Code No. S2022* ersetzter Primärantikörper) wurden als Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Färbung bei jeder Frbereihe mitgeführt. Für p53 wurde ein Kolonkarzinom mit bekannter p53-Immunreaktion, für p63 nicht-neoplastisches Prostatagewebe und für p73 normales Tonsillengewebe als Positivkontrollen verwendet.

2.4.3. Auswertung der Immunhistochemie

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen, hinsichtlich klinisch-pathologischer Daten geblindeten Beobachtern (Univ.-Doz. Dr.

med. Cord Langner und Cand. med. Marion Pollheimer) auf ihre Immunreaktivität in einem semiquantitativen Ansatz untersucht. Alle Tumorzellkerne, die eine deutliche braunrote Färbung aufwiesen, wurden als positiv gewertet (Überexpression). Zytoplasmatische Färbungen wurden in die Analyse nicht miteinbezogen. Die Immunreaktivität wurde in folgenden Kategorien (bestimmt durch den Mittelwert aller Stenzen eines PatientInnen) dokumentiert: **0**, keine Reaktivität; **1**, 1-10% der Tumorzellen positiv; **2**, 11-25% positiv; **3**, 26-50% positiv; **4**, 51-75% positiv; **5**, 76-90% positiv und **6**, >90% der Tumorzellen positiv.

Für eine bessere statistische Auswertbarkeit führten wir eine weitere Stratifizierung durch: **Score 0**: 0-10% (geringe Expression) **Score 1**: 11-50% (mittelgradige Expression) und **Score 2**: >50% (hochgradige Expression). In Anlehnung an Zlobec et al. [52,53] wurde ein Cut-off-Level von 10% gefärbter Tumorzellkerne in die statistische Analyse einbezogen.

2.5. Definitionen und statistische Analysen

Im Rahmen des Follow-Ups wurde die Analyse des progressionsfreien und das tumorspezifischen Überlebens durchgeführt. Krankheitsprogress wurde definiert entweder als Auftreten von lokalem Tumorrezidiv (jedes nachweisbare Rezidiv im Follow-Up, ob alleine oder in Kombination mit generalisiertem Krankheitsrückfall) oder als Auftreten von systemischem Tumorrezidiv (jede nachweisbare Fernmetastase im Follow-Up, außer Lokalrezidiv).

Tumoren, die im Zäkum bis zum Querkolon lokalisiert waren, wurden als rechtsseitige und Tumoren der linken Flexur, des absteigenden Kolons und des Sigmas als linksseitige KRK definiert. Tumoren, die vom rektosigmoidalen Übergang oder im Rektum ausgingen, wurden als rektale KRK zusammengefasst.

Assoziationen zwischen dem immunhistochemisch nachgewiesenen Ausmaß der p53-, p63-, und p73-Expression und anderen histopathologischen Parametern, wie T-Klassifikation, Tumordifferenzierung, N-Klassifikation, UICC-Stadium, Angioinvasion und Tumorgöße wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder Fisher's Exakt-Test analysiert.

Das progressionsfreie und das tumorspezifische Überleben wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mittels Log-Rank-Test verglichen. Für die Multivariatanalyse wurde das Cox's proportional Hazards Regressionsmodell

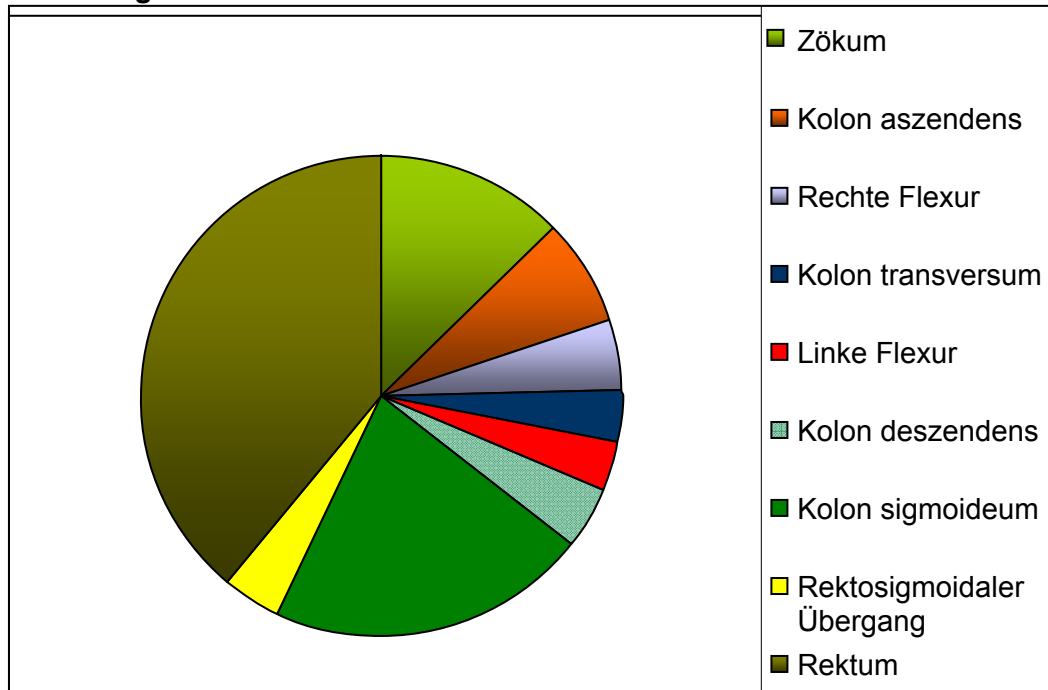
verwendet. Alle angegebenen p-Werte sind zweiseitig mit signifikanten Werten bei $p < 0.05$.

Alle statistischen Analysen wurden durchgeführt mit: Hintze, J. (2007). (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, U.S.A. www.ncss.com)

3. Ergebnisse

3.1. Pathologische Daten

Abbildung 4: Tumorlokalisation



Gemäß unserer Definition zeigten die Tumoren folgende Lokalisationen: 107 (28%) der 381 Karzinome waren im rechten Kolon, 108 (28%) im linken Kolon und die restlichen 164 (43%) Tumoren im Rektum lokalisiert (siehe Abb.4).

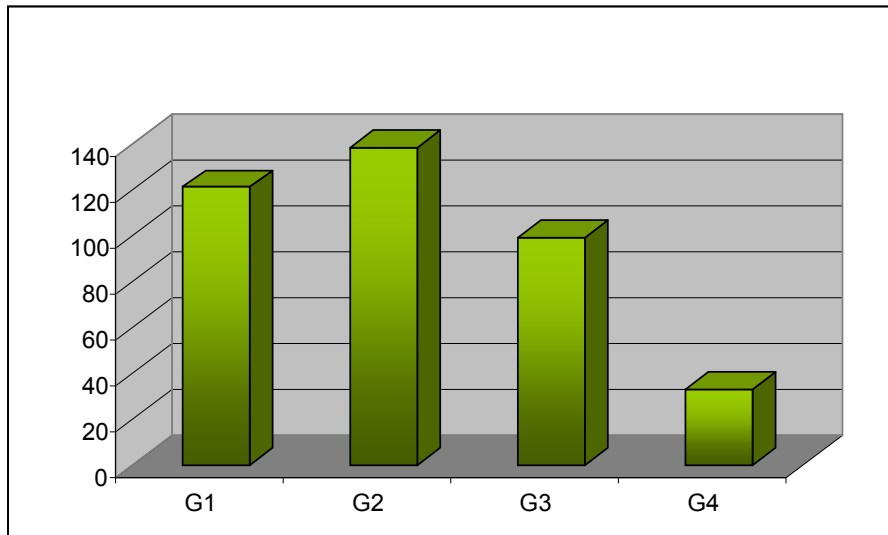
Tabelle 3: Übersichtstabelle des PatientInnenkollektivs

pT	N (%)	pN	n (%)	UICC	n (%)	G	n (%)
pT1	28 (7%)	pN0	213 (56%)	I	82 (22%)	G1	121 (32%)
pT2	70 (18%)	pN1	83 (22%)	II	125 (33%)	G2	138 (36%)
pT3	218 (57%)	pN2	85 (22%)	IV	151 (40%)	G3	99 (26%)
pT4	65 (17%)			V	23 (6%)	G4	23 (6%)

28 (7%) PatientInnen wiesen ein pT1-, 70 (18%) ein pT2-, 218 (57%) ein pT3- und 65 (17%) ein pT4-Karzinom auf. Eine Lymphknotenbeteiligung konnte in 168 (44%) der Tumoren nachgewiesen werden. Diese gliedern sich in 83 (22%) KRK mit metastatischem Befall von 1-3 Lymphknoten (pN1) und 85 (22%) Tumoren mit

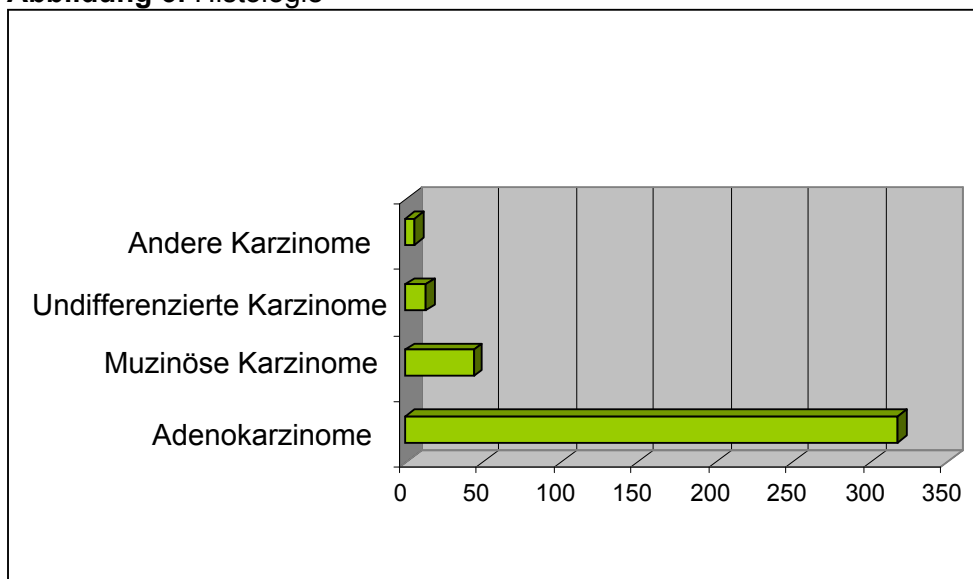
Metastasen in mehr als 4 Lymphknoten (pN2). 82 PatientInnen (22%) wurden im UICC-Stadium I, 125 (33%) im UICC-Stadium II, 151 (40%) im UICC-Stadium III und 23 (6%) im UICC-Stadium IV operiert (siehe Tabelle 3).

Abbildung 5: Tumordifferenzierung



121 (32%) Tumoren zeigten einen hohen (G1), 138 (36%) einen mittleren (G2) und 99 (26%) einen niedrigen Differenzierungsgrad (G3). In den verbleibenden 23 (6%) Fällen wurden undifferenzierte Karzinome (G4) nachgewiesen (siehe Abb.5).

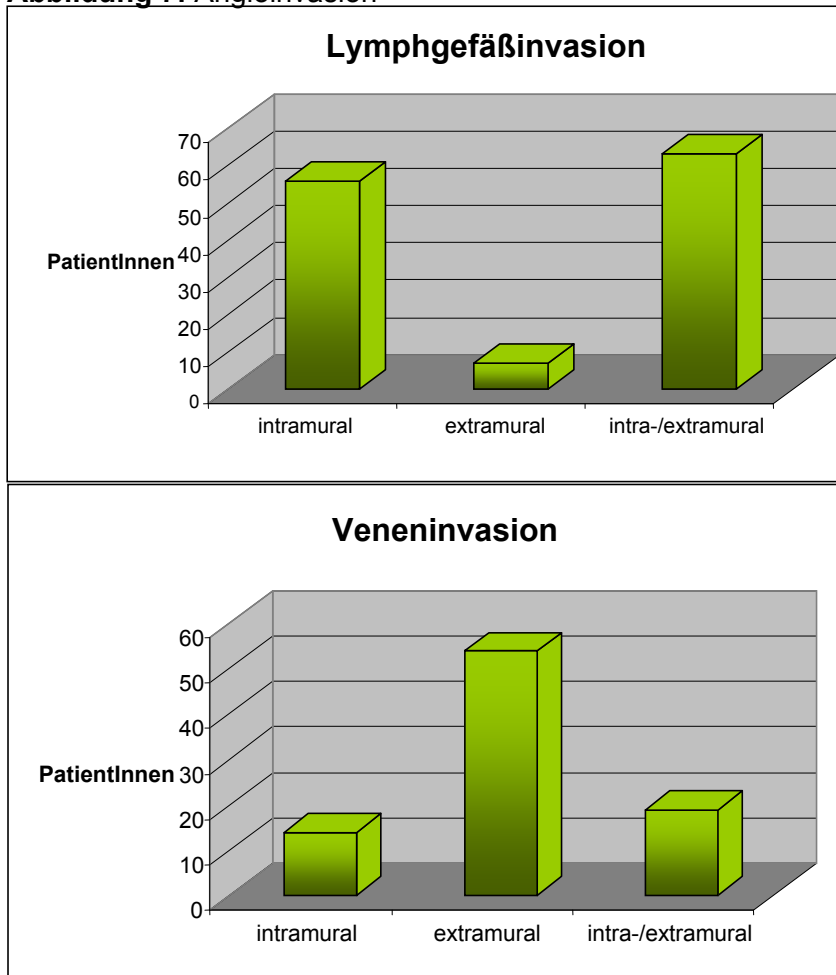
Abbildung 6: Histologie



Mittels histologischer Evaluierung detektierten wir 318 (84%) konventionelle Adenokarzinome, 44 (12%) muzinöse Adenokarzinome, 13 (3%) undifferenzierte

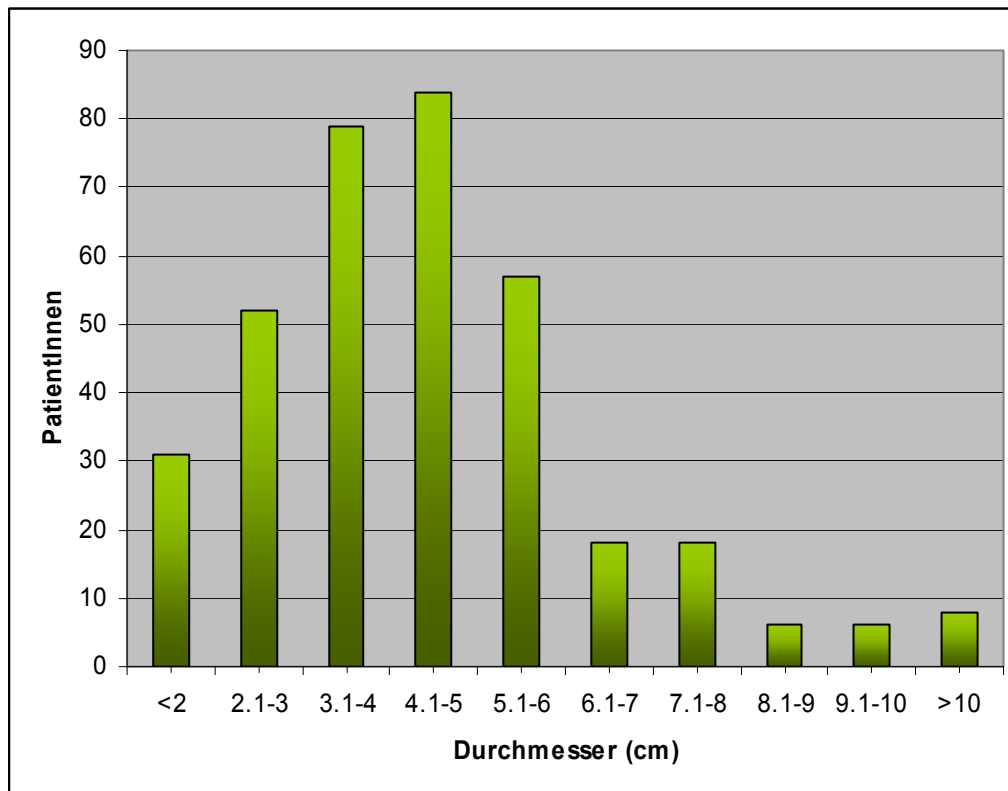
Karzinome, drei (1%) Siegelringzell-Karzinome, zwei (0.5%) medulläre Karzinome sowie ein (0.3%) adenosquamöses Karzinom (siehe Abb.6).

Abbildung 7: Angioinvasion



Weiters wiesen wir in 158 (41%) KRK eine Lymph- oder Blutgefäßinvasion nach. Davon präsentierten sich 126 (33%) Tumoren mit Lymphgefäßinvasionen, wobei 56 (44%) intramural, 7 (6%) extramural und 63 (50%) in beiden Lokalisationen detektiert wurden. Eine Blutgefäßinvasion wurde in 87 (23%) Fällen gefunden. Von diesen waren 14 (16%) intramural, 54 (62%) extramural und 19 (22%) kombiniert intra- und extramural gelegen (siehe Abb.7).

Abbildung 8: Tumorgröße



Die Tumoren variierten in ihrem Durchmesser von 0.6 bis 16 cm. Der Medianwert lag bei 4.5 cm, der Mittelwert bei 4.7 cm. 31 (9%) Tumoren zeigten eine Größe von bis zu 2 cm, 52 (14%) von 2.1 bis 3 cm, 79 (22%) von 3.1 bis 4 cm, 84 (23%) von 4.1 bis 5 cm, 57 (16%) von 5.1 bis 6 cm, 18 (5%) von 6.1 bis 7 cm, weitere 18 (5%) von 7.1 bis 8 cm, 6 (2%) von 8.1 bis 9 cm, 6 (2%) von 9.1 bis 10 cm sowie 8 (2%) einen Durchmesser von mehr als 10 cm. In 22 (6%) Fällen war die Tumorgröße nicht bekannt (siehe Abb.8).

3.2. Ergebnisse der p53-Auswertung

3.2.1. Immunhistochemie

Eine nukleäre p53-Expression wurde in 261 (71%) der 370 Primärtumoren gefunden. In 109 Fällen (29%) war keine nukleäre p53-Immunreaktion zu detektieren. Die semiquantitative Analyse zeigte eine p53-Immunpositivität von weniger als 10% der Tumorzellen in 68 (26%), von 11 bis 25% in 20 (8%), von 26 bis 50% in 23 (9%), von 51 bis 75% in 24 (9%), von 76 bis 90% in 67 (26%) und von mehr als 90% in 59

(23%) der 261 p53-positiven Primärtumoren (siehe Tabelle 4). Die Abbildungen 9 und 10 zeigen Beispiele für eine starke und eine schwache p53-Immunreaktion.

Tabelle 4: Nukleäre p53-Expression

Nukleäre p53-Expression		
Kategorie	Prozentueller Anteil positiver Tumorzellen	n (%)
0	0%	109 (29%)
1	1-10%	68 (18%)
2	11-25%	20 (5%)
3	26-50%	23 (6%)
4	51-75%	24 (6%)
5	76-90%	67 (18%)
6	>90%	59 (15%)
Nicht auswertbar	-	11 (3%)

Von den 370 Primärtumoren zeigten 177 (48%) KRK eine nukleäre p53-Expression von 0 bis 10% (Score 0), 43 (12%) eine p53-Expression von 11-50% (Score 1) und 150 (41%) eine p53-Expression von >50% (Score 2) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: p53-Expression in Primärtumor, Lymphknoten- und Fernmetastase

Nukleäre p53-Expression			
	Score 0	Score 1	Score 2
Primärtumor (n=370)	177 (48%)	43 (12%)	150 (41%)
Lymphknotenmetastase (n=128)	52 (41%)	22 (17%)	54 (42%)
Fernmetastase (n=39)	19 (58%)	5 (13%)	15 (38%)

Abbildung 9: Starke p53-Expression in einem klassischen Adenokarzinom (Score 6)
(Original x 200)

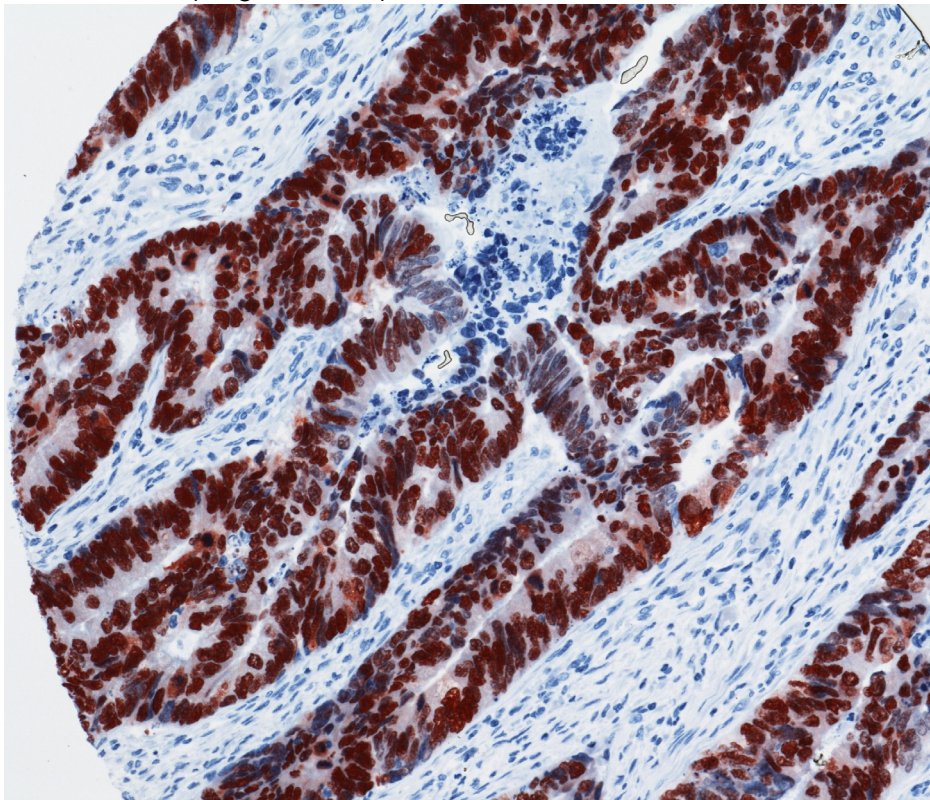
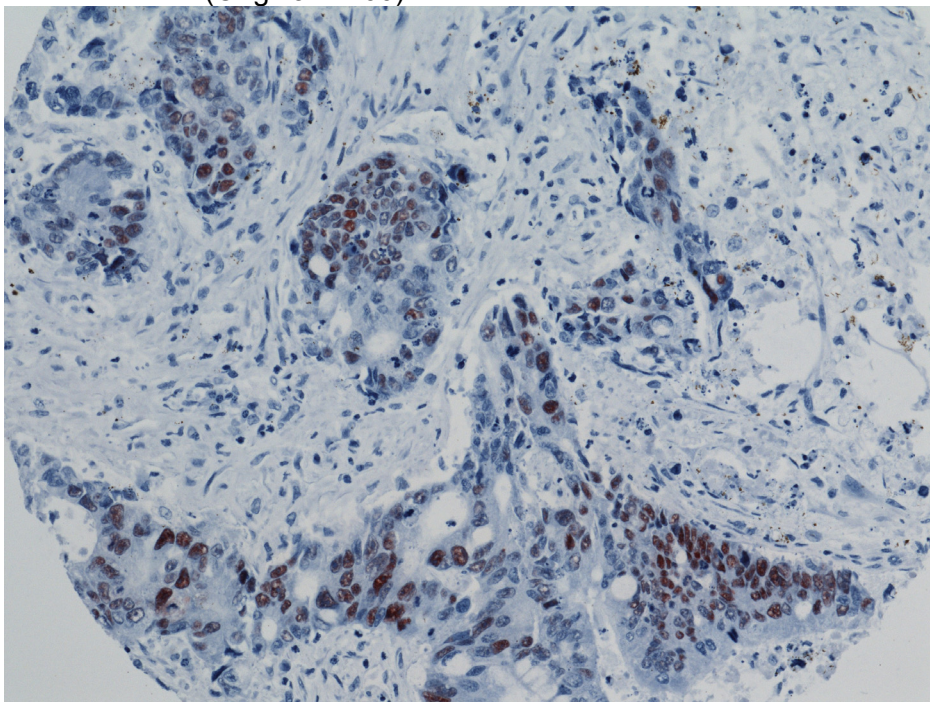


Abbildung 10: Schwache p53-Expression in einem klassischen Adenokarzinom (Score 2)
(Original x 200)



Korrelation der p53-Expression mit histopathologischen Parametern

Wir führten eine Korrelationsanalyse der Ergebnisse der semiquantitativen p53-Immunreaktion mit klinisch-pathologischen Parametern, wie dem Geschlecht, der T-Klassifikation, Tumordifferenzierung, N-Klassifikation, UICC-Stadium, Angioinvasion und Tumorgröße, durch. Einen Überblick über die Ergebnisse der Assoziation der p53-Expression mit histopathologischen Parametern gibt Tabelle 6.

Wir erzielten hochsignifikante Ergebnisse für die Korrelation zwischen der p53-Expression mit der Tumordifferenzierung und dem Nachweis von Lymphgefäßinvasionen ($p < 0.001$). Darüberhinaus wiesen p53-positive Tumoren in einem signifikant höheren Anteil positive Lymphknoten ($p = 0.013$) und eine Veneninvasion ($p = 0.01$) auf. Eine starke Assoziation wurde im Hinblick auf die Tumorgröße ($p = 0.02$) und schwächere Korrelationen mit der T-Kategorie ($p = 0.068$) und dem UICC-Stadium ($p = 0.036$) beobachtet. Keine Assoziation konnte wir im Hinblick auf das PatientInnengeschlecht verzeichnen ($p = 0.2$).

Nach Gruppierung der Daten nach geringgradiger (0-10%) und hochgradiger (>50%) p53-Expression führten wir eine weitere Analyse mittels Fisher's Exakt-Test durch. Dieser ergab keine signifikanten Resultate und relativiert somit unsere Ergebnisse im Hinblick auf die Korrelation mit histopathologischen Parametern.

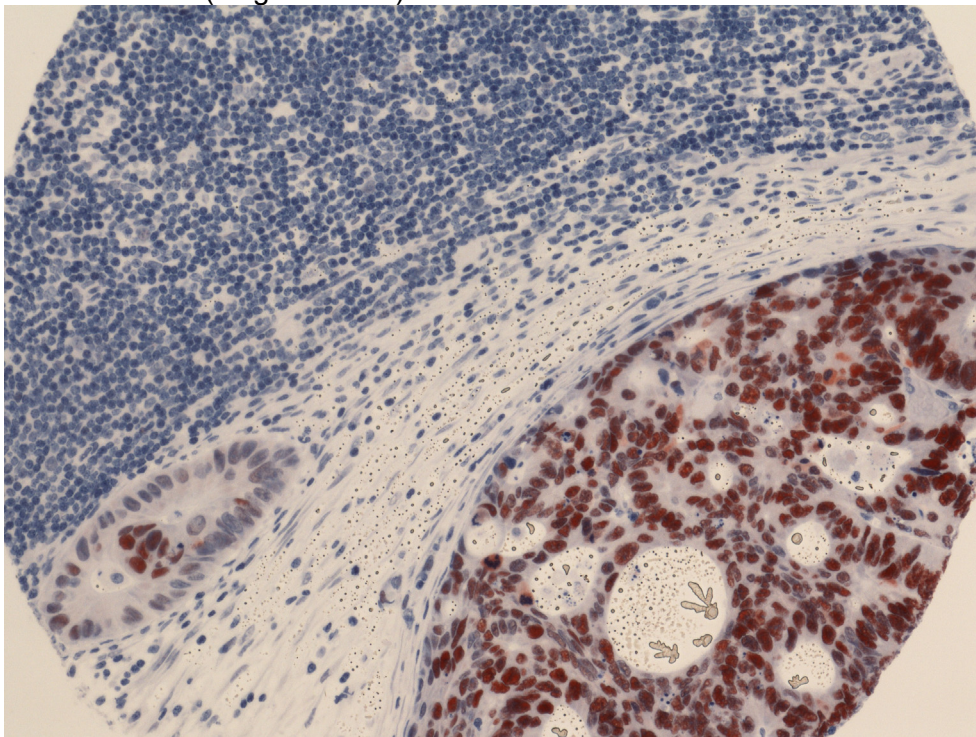
Tabelle 6: Korrelation der p53-Expression mit klinikopathologischen Parametern

	P53-Expression			p-Wert
	Score 0	Score 1	Score 2	
Geschlecht				
Männlich (n=210)	96 (46%)	21 (10%)	93 (44%)	0.2
Weiblich (n=160)	81 (51%)	22 (14%)	57 (36%)	
T-Klassifikation				
T1 (n=26)	10 (38%)	3 (12%)	13 (50%)	0.068
T2 (n=67)	34 (51%)	4 (6%)	29 (43%)	
T3 (n=213)	101 (47%)	21 (10%)	91 (43%)	
T4 (n=64)	31 (48%)	14 (22%)	19 (30%)	
Tumordifferenzierung				
G1 (n=144)	92 (64%)	10 (7%)	42 (29%)	<0.001
G2 (n=141)	55 (39%)	16 (11%)	70 (50%)	
G3 (n=61)	18 (30%)	12 (20%)	31 (51%)	
G4 (n=24)	12 (50%)	5 (21%)	7 (29%)	
N-Klassifikation				
N neg. (n=207)	112 (54%)	18 (9%)	77 (37%)	0.013
N pos. (n=163)	65 (40%)	25 (15%)	73 (45%)	
Tumorstadium				
I (n=80)	41 (51%)	6 (8%)	33 (41%)	0.036
II (n=121)	66 (55%)	12 (10%)	43 (36%)	
III (n=149)	61 (41%)	19 (13%)	69 (46%)	
IV (n=20)	9 (45%)	6 (30%)	5 (25%)	
Lymphatische Invasion				
L0 (n=250)	128 (51%)	20 (8%)	102 (41%)	<0.001
L1 (n=125)	49 (39%)	28 (22%)	48 (38%)	
Venöse Invasion				
V0 (n=284)	145 (51%)	26 (9%)	113 (40%)	0.01
V1 (n=86)	32 (37%)	17 (20%)	37 (43%)	
Tumorgröße				
≤ 4.5 cm (n=191)	86 (45%)	15 (8%)	90 (47%)	0.002
> 4.5 cm (n=157)	81 (52%)	27 (17%)	49 (31%)	

Vergleich Primärtumor und zugehörige Metastasen

In 143 (39%) Fällen der insgesamt 370 Primärtumoren standen auch Blöcke von Lymphknotenmetastasen für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung. Abbildung 11 zeigt ein Beispiel einer p53-positiven Lymphknotenmetastase. Von diesen zeigten 97 (68%) Lymphknotenmetastasen p53-Immunpositivität, 31 (22%) waren p53-negativ und 15 (10%) wurden als nicht auswertbar eingestuft.

Abbildung 11: Lymphknotenmetastase mit p53-positiver KRK-Metastase
(Original x 200)



Von den 128 auswertbaren Lymphknotenmetastasen zeigten 52 (41%) eine p53-Immunreaktivität von 0 bis 10% (Score 0), 22 (17%) von 11 bis 50% (Score 1) und 54 (42%) von mehr als 50% (Score 2) (siehe Tabelle 5). In 97 (97%) von 100 Fällen mit positivem Primärtumor waren auch die Lymphknotenmetastasen p53-positiv. In 30 von 41 (73%) Fällen mit negativem Primärtumor zeigten die Lymphknotenmetastasen eine negative p53-Immunreaktion und waren in nur 5 (12%) Fällen positiv. Vergleicht man die p53-Immunreaktivität in den Primärtumoren mit der p53-Immunreaktivität in den Lymphknotenmetastasen, so findet man in 45 von 128 (35%) PatientInnen gleiche Positivergebnisse. In 30 (23%) PatientInnen zeigte der Primärtumor eine stärkere und in 23 (18%) PatientInnen eine schwächere

p53-Immunreaktion als die zugehörige Lymphknotenmetastase. In den restlichen 30 (23%) Fällen waren Primärtumor und Lymphknotenmetastase gleichsinnig p53-negativ.

In 42 (11%) der insgesamt 370 Primärtumoren standen Blöcke von Fernmetastasen für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung. Von diesen zeigten 26 (62%) Fernmetastasen p53-Immunpositivität, 13 (31%) waren p53-negativ und 3 (7%) wurden als nicht auswertbar eingestuft. Von den 39 auswertbaren Fernmetastasen war in 19 (58%) Fällen eine p53-Expression von 0 bis 10% (Score 0), in 5 (13%) Fällen eine p53-Expression von 11 bis 50% (Score 1) und in 15 (38%) Fällen eine p53-Expression von mehr als 50% (Score 2) nachweisbar (siehe Tabelle 5). In 25 von 29 (86%) Fällen mit positivem Primärtumor waren auch die Fernmetastasen positiv für p53. In 13 von 13 (100%) Fällen mit negativem Primärtumor zeigten die Fernmetastasen eine negative p53-Immunreaktion. Vergleicht man die p53-Immunreaktivität in den Primärtumoren mit der Immunreaktivität in den Fernmetastasen, so kann man in vier von 39 (10%) PatientInnen die gleichen Positivergebnisse nachweisen. In 16 (41%) PatientInnen zeigte der Primärtumor eine stärkere und in 5 (13%) PatientInnen eine schwächere p53-Immunreaktion als die zugehörige Fernmetastase. In den restlichen 13 Fällen (33%) waren Primärtumor und Fernmetastase gleichsinnig negativ.

Korrelation der p53-Expression mit der Tumorlokalisierung

Wir detektierten eine signifikant häufigere Assoziation einer nukleären p53-Expression mit distaler und rektaler Tumorlokalisierung (siehe Tabelle 7a und 7b).

Tabelle 7a: Korrelation der p53-Expression mit der Tumorlokalisierung

	Score 0	Score 1	Score 2	p-Wert
Rechtes Kolon (n=104)	61 (59%)	12 (12%)	31 (30%)	0.005
Linkes Kolon (n=106)	53 (50%)	15 (14%)	36 (34%)	
Rektum (n=160)	63 (39%)	15 (9%)	82 (51%)	

Tabelle 7b: Korrelation der p53-Expression mit der Tumorlokalisation

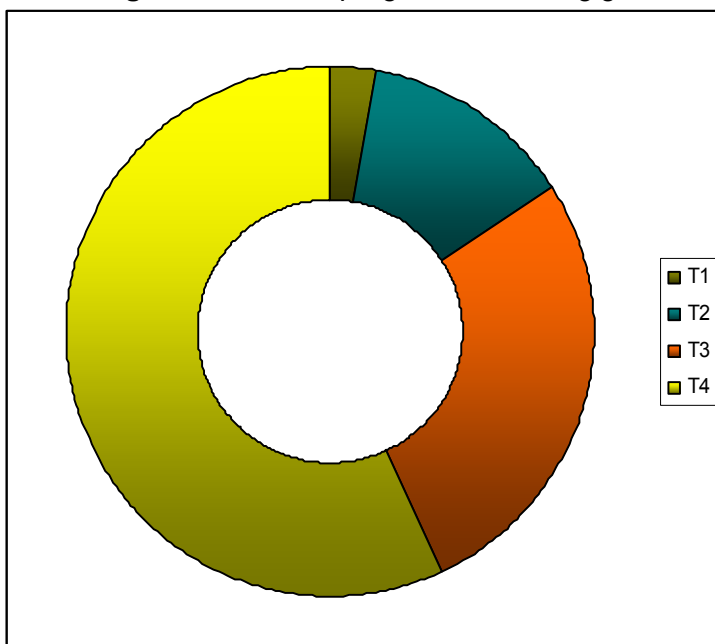
	Score 0	Score 1	Score 2	p-Wert
Kolon (n=210)	114 (54%)	27 (13%)	67 (32%)	0.001
Rektum (n=160)	63 (39%)	15 (9%)	82 (51%)	

3.2.2. Follow-up

Analyse des PatientInnenüberlebens

Daten zum klinischen Verlauf waren von 350 der 381 PatientInnen (92%) verfügbar. Nach mittlerer und medianer Follow-Up-Zeit von 56 und 45 Monaten, konnte ein Krankheitsprogress in 141 der 350 PatientInnen (40%) nachgewiesen werden: 118 (34%) verstarben an dem Karzinom, 11 (3%) sind derzeit mit Metastasen am Leben, 7 (2%) zeigen keinen Hinweis auf Krankheitsprogression nach Metastatektomie und weitere 5 (1%) PatientInnen, die sich in initial schlechter Verfassung auf Grund fortgeschrittener Tumorerkrankung präsentiert hatten, verstarben innerhalb von 30 Tagen nach der Operation. Die mittlere Zeit bis zur Progression war 15 Monate (Medianwert 7, Spannweite 0-88).

Abbildung 12: Krankheitsprogress in Abhängigkeit von der T-Kategorie



Der Krankheitsprogress verhielt sich in Abhängigkeit von der T-Kategorie folgendermaßen: Ein Patient (4%) von 28 PatientInnen mit einem pT1-Karzinom, 13 (19%) von 68 mit pT2-Karzinomen, 77 (40%) von 195 mit pT3-Karzinomen und 50 (83%) von 60 mit pT4-Karzinomen zeigten einen Progress ihrer Tumorerkrankung (siehe Abbildung 12).

Korrelation der p53-Expression mit dem PatientInnenüberleben

Das progressionsfreie Überleben von PatientInnen mit p53-positivem Karzinom lag nach 120 Monaten bei 58% und bei PatientInnen mit p53-negativem Karzinom bei 60% (siehe Abb. 13). Betrachtet man die PatientInnen mit einer p53-Expression von <10% und >10%, findet man nach 10 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 64% und 55% (siehe Abb. 14). In beiden PatientInnenkollektiven mit p53-Expressionen von <50% und >50% ergab sich nach 10 Jahren ein äquivalentes progressionsfreies Überleben von 56% (siehe Abb. 15).

Das krankheitsspezifische Überleben von PatientInnen mit p53-negativen Karzinomen lag nach 10 Jahren bei 59% und bei PatientInnen mit p53-positiven Karzinomen bei 61% (siehe Abb. 16). Bei Betrachtung der PatientInnen mit einer p53-Expression von <10% und >10%, findet man nach 10 Jahren ein krankheitsspezifisches Überleben von 61% und 55% (siehe Abb. 17). In dem PatientInnenkollektiv mit einer p53-Expression von <50% ergab sich nach 10 Jahren ein krankheitsspezifisches Überleben von 56% und 60% für die Gruppe mit einer p53-Expression von >50% (siehe Abb. 18).

In unserem PatientInnenkollektiv zeigte die p53-Überexpression keine statistisch signifikante Beziehung mit dem PatientInnenüberleben, was sowohl das progressionsfreie als auch das krankheitsspezifische Überleben betrifft (siehe Abb. 13 bis 18).

Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer p53-Expression ($p=0.41$)

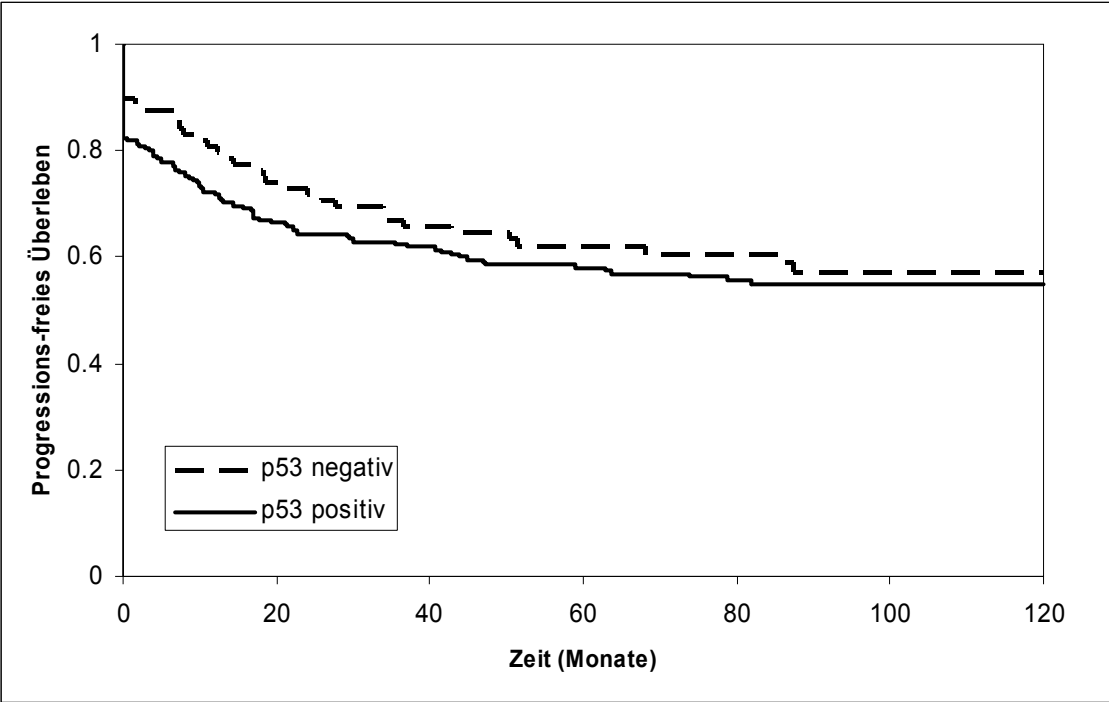


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer p53-Expression von >10% ($p=0.17$)

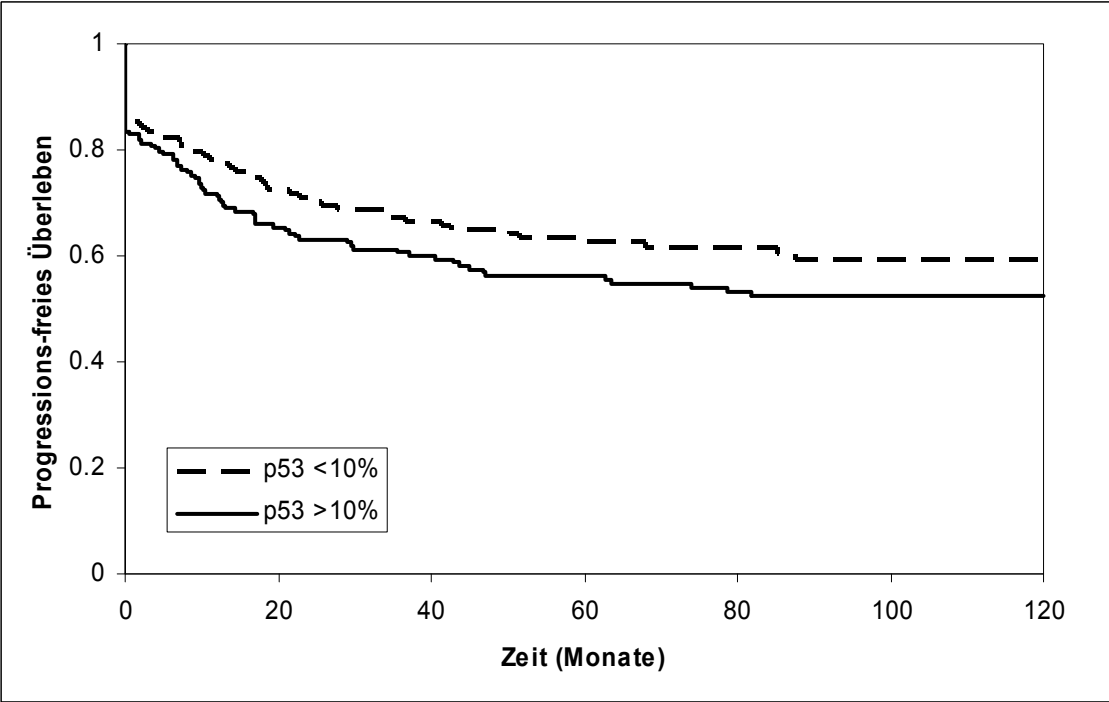


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben bezüglich einer p53-Expression von >50% ($p=0.93$)

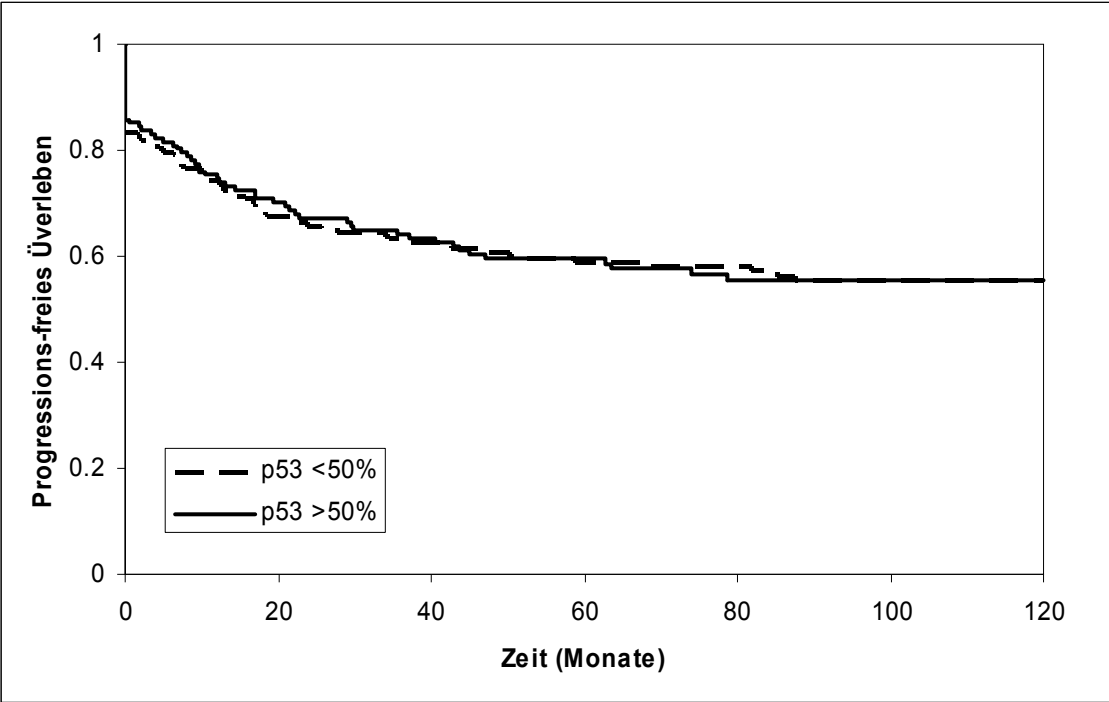


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer p53-Expression ($p=0.53$)

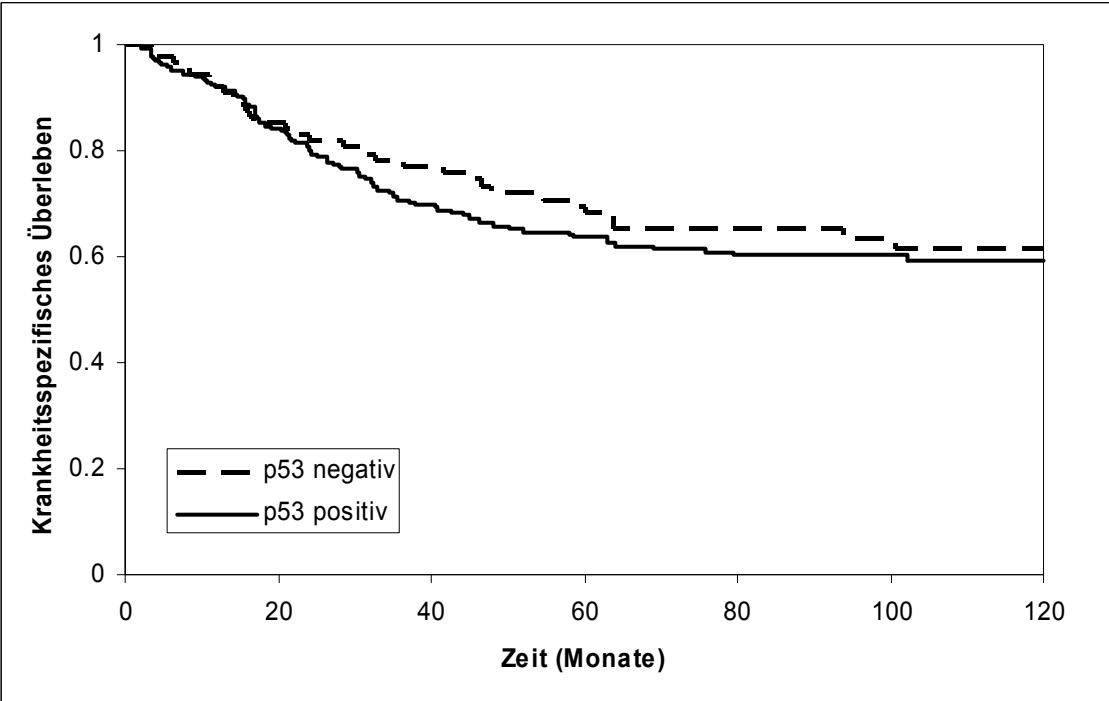


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer p53-Expression von >10% (p=0.26)

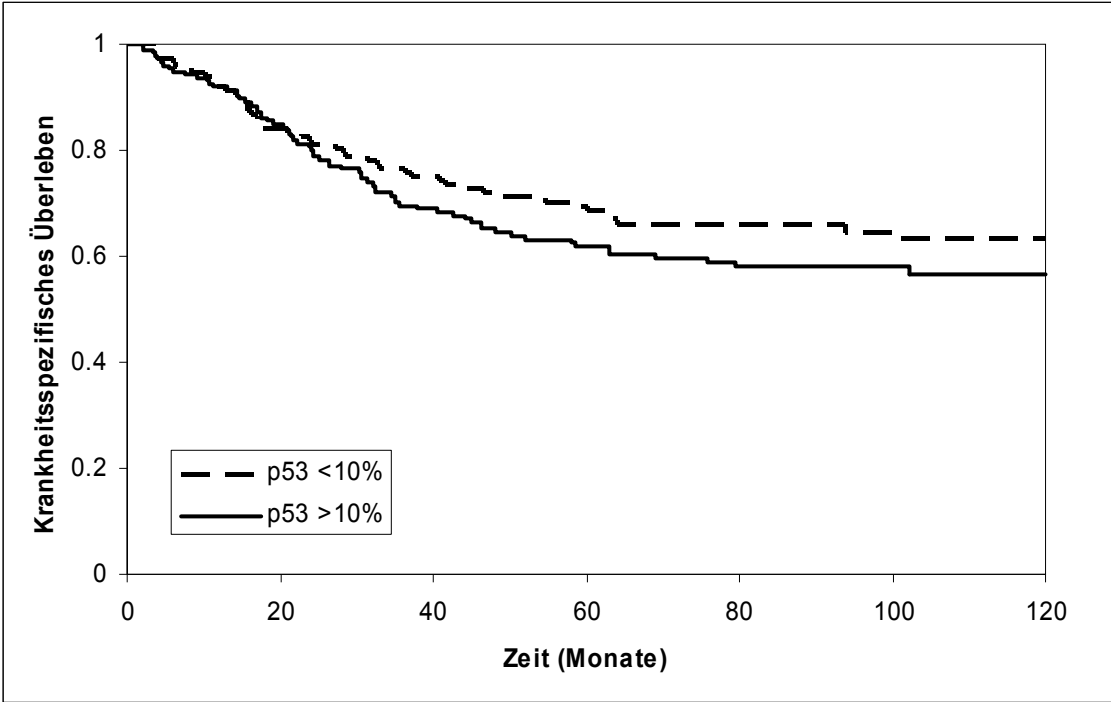
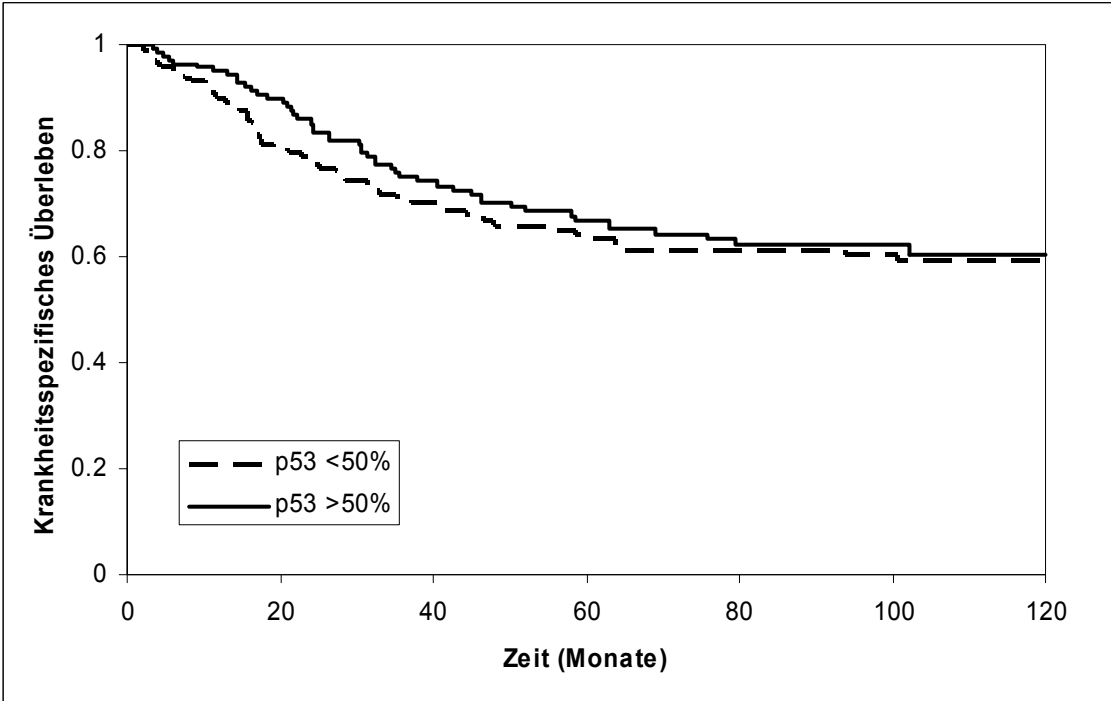


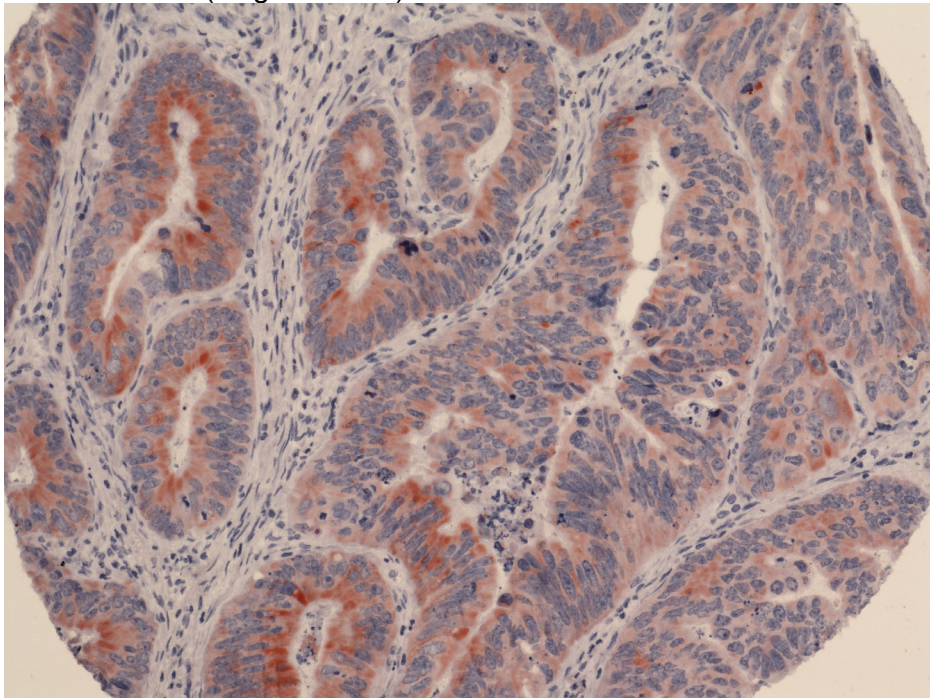
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurven für das krankheitsspezifische Überleben bezüglich einer p53-Expression von >50% (p=0.52)



3.3. Ergebnisse der p63-Auswertung

Alle 370 Tumorschnitte, die bezüglich ihrer p63-Expression als auswertbar bewertet wurden, zeigten durchgehend keine nukleäre p63-Anfärbung, lediglich eine zytoplasmatische Anfärbung wurde in einzelnen Fällen beobachtet (siehe Abb.19). Auf Grund dieses Negativergebnisses wurde keine Korrelationsanalyse der p63-Expression mit histopathologischen Parametern oder dem PatientInnenüberleben durchgeführt.

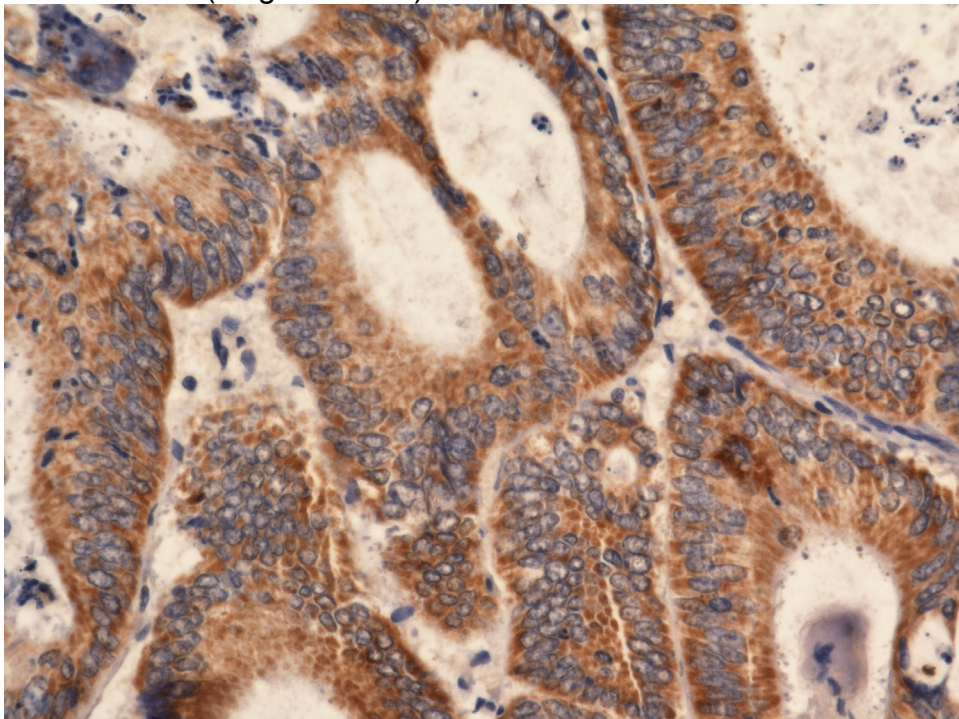
Abbildung 19: zytoplasmatische p63-Färbung in einem klassischen Adenokarzinom
(Original x 200)



3.4. Ergebnisse der p73-Auswertung

Alle 370 Tumorschnitte zeigten keine nukleäre p73-Immunreaktion. Es bestand in 135 (36%) von 370 Fällen lediglich eine flauere zytoplasmatische Anfärbung, die als Färbeartefakt (unspezifische Reaktion) interpretiert wurde. Aus diesem Grund wurde keine Korrelationsanalyse mit anderen histopathologischen Parametern und dem PatientInnenüberleben durchgeführt.

Abbildung 20: zytoplasmatische p73-Anfärbung in einem klassischen Adenokarzinom (Original x 400)



Diskussion

Derzeit stellt die histopathologische Begutachtung mit Ermittlung des Tumorstadiums und der Vollständigkeit einer operativen Resektion sowie die Festlegung des Lymphknotenstatus die nützlichste und am weitesten verbreitete Methode dar, um prognostische Aussagen für KRK-PatientInnen zu treffen. Dieser Prozess ist die Basis für alle weiteren Therapieentscheidungen und Stratifizierung von PatientInnen für Studienzwecke. Nach wie vor werden PatientInnen, die adjuvante Chemotherapie benötigen, über ihr Tumorstadium, das sich seit seiner Einführung vor über 70 Jahren wenig verändert hat, definiert [54]. Jedoch wurde erkannt, dass sich Tumoren mit gleichem Stadium im Hinblick auf Tumoraggressivität und PatientInnenüberleben oft sehr heterogen verhalten. Dieser Umstand macht darauf aufmerksam, dass dringend zusätzliche Prognosefaktoren unabhängig vom Tumorstadium benötigt werden, um eine genauere Prognoseabschätzung und Individualisierung von Behandlungsstrategien zu erreichen.

Die Assoziation mit unterschiedlichen Tumorbiomarkern und dem Verhalten von KRK wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. In diese Analysen wurden eine Reihe von potentiell prognostisch bedeutsamen Parametern, darunter Proteine verantwortlich für Tumorentstehung und Tumorprogression, Zelltod, Tumorinvasion und Metastasierung miteinbezogen. Allerdings wurde bis jetzt keiner dieser Faktoren in die routinemäßigen Therapieentscheidungen aufgenommen [54].

Gegenstand unserer Untersuchung waren die Mitglieder der P53-Genfamilie. Wir untersuchten mittels Immunhistochemie die klinische Relevanz einer Expression von p53, p63 und p73 hinsichtlich des progressionsfreien und krankheitsspezifischen Überlebens von KRK-PatientInnen.

Mutationen im P53-Gen sind die häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren [34]. Das P53-Gen ist am kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (17p13.1) und kodiert für den kurzlebigen Transkriptionsfaktor p53. Seine Funktionen umfassen die Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der DNA-Synthese sowie des programmierten Zelltodes. Diese essentiellen Aufgaben brachten p53 den Beinamen „Hüter des Genoms“. Tabelle 8 zeigt eine Zusammenschau der Funktionen der einzelnen Mitglieder der p53-Familie.

Tabelle 8: Funktionen der p53-Familienmitglieder

	p53	p63	p73
Antwort auf DNA-Schaden	+++	-/+	++
Apoptose/Zellzyklus-Blockade	+++	+	++
Entwicklung von Zellen	-	Extremitäten- und Hautbildung	ZNS-Entwicklung

p53 ist im Hinblick auf seine prognostische und prädiktive Relevanz bei KRK-PatientInnen sehr gut untersucht. Dementsprechend groß ist die Anzahl der Analysen, die den Einfluss von P53-Mutationen auf KRK-PatientInnen analysierten. Die meisten Studien zum Thema sind jedoch retrospektiv und auf Grund geringer PatientInnenzahl ($n < 100$) weniger gut geeignet, um klinisch relevante Beziehungen zum PatientInnenüberleben aufzuzeigen [37]. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von P53-Mutationen variieren in der Methodik und der Definition positiver Testergebnisse. Diese methodischen Unterschiede machen eine vergleichende Interpretation der Ergebnisse schwierig [55]. Die meisten Forschungsgruppen bedienen sich jedoch immunhistochemischer Analysen, um das alterierte p53-Protein sichtbar zu machen. Dabei beeinflusst die Wahl des Antikörpers die Inzidenz positiver Testresultate entscheidend. Der Grund für diese Unterschiede ist bis dato unklar. Die unterschiedlichen Antikörper und Antigenauffindungstechniken wurden für die Immunhistochemie evaluiert. Der von uns verwendete DO-7 Antikörper wird als der sensitivste und spezifischste für die Detektion zu Grunde liegender P53-Genmutationen beschrieben [38, 56]. Die Mehrheit der Arbeitsgruppen betrachtet ausschließlich die nukleäre p53-Immunreaktion als Marker für abnormales p53. Allerdings haben bis dato fünf Studien [57-61] die klinische Signifikanz der zytoplasmatischen p53-Expression aufgezeigt.

Die Primärtumoren unseres PatientInnenkollektivs zeigten in mehr als 70% eine positive nukleäre Immunreaktion für p53. Ähnlich hohe Inzidenzraten fanden Gallego und Mitarbeiter mit 68% [62], Belluco et al. mit 72% [63] und Smith und Mitarbeiter mit 76% [64]. In den meisten Fällen wird in der Literatur eine Inzidenz von 40-60% angegeben [37]; diese Häufigkeit gilt sowohl für den Nachweis einer

Immunpositivität in immunhistochemischen Analysen als auch für den Nachweis von P53-Genmutationen.

Wir schlossen sowohl Lymphknoten- als auch Fernmetastasen in unsere Untersuchungen mit ein und wiesen eine Übereinstimmungsrate zwischen p53-positivem Primärtumor und zugehöriger Lymphknotenmetastase von fast 100% nach. In mehr als 70% der PatientInnen mit p53-negativem Primärtumor waren die Lymphknotenmetastasen auch p53-negativ. Bezüglich der Übereinstimmung zwischen Primärtumor und Fernmetastase konnten wir in fast 90% positive Ergebnisse verbuchen. In 100% waren Primärtumor und Fernmetastase gleichermaßen p53-negativ. Einige Autoren widmeten sich ebenfalls dieser Fragestellung [65-68] und erzielten ähnlich hohe Konkordanzraten: Im Jahr 2000 verglichen McKay und Mitarbeiter [65] die immunhistochemische p53-Expression von Primärtumoren mit der der zugehöriger Lymphknotenmetastasen. In ihrer Untersuchung betrug die Konkordanz der p53-Immunreaktivität zwischen Primärtumor und zugehöriger Lymphknotenmetastase über 90%. Andere wiesen immunhistochemisch [66], mittels Durchflusszytometrie [67] oder Gensequenzanalyse [68] Konkordanzraten von 70% bis 90% nach. Die hohe Übereinstimmungsrate der p53-Expression im Primärtumor und der Lymphknotenmetastase in unserer Untersuchung lässt den Schluss zu, dass p53-Mutationen allgemein vor der Tumorzell dissemination stattfinden.

Bezüglich der Übereinstimmungsrate der p53-Expression zwischen Primärtumor und zugehöriger Fernmetastase existieren wenige Arbeiten [69-72]. In einem rezenten holländischen Artikel [69] wurde die p53-Expression an KRK-Primärtumoren und Lebermetastasen immunhistochemisch untersucht. Unter den Primärtumoren waren mehr als 70% und unter den Lebermetastasen mehr als 60% p53-positiv. Die Korrelation zwischen Primärtumor und Lebermetastase zeigte statistische Signifikanz. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Belluco [63] und Yoa und Ko-Autoren [70]. Kastrinakis et al. [71] wiesen eine häufigere p53-Expression in den Lebermetastasen als im Primärtumor nach (ein Drittel der Lebermetastasen zeigte im Gegensatz zum Primärtumor p53-Überexpression). Diese Unterschiede in den Ergebnissen können in der unterschiedlichen PatientInnenzahl und/oder in der Verwendung anderer p53-Antikörper begründet sein.

Hinsichtlich der Assoziation mit prognostisch relevanten histopathologischen Parametern, konnten wir eine schwache Korrelation der p53-Immunpositivität mit der

T-Klassifikation und dem UICC-Stadium nachweisen. Die p53-Überexpression zeigte indes eine hochsignifikante Assoziation mit der Tumordifferenzierung und dem Nachweis von Lymphgefäßinvasionen, eine weniger starke signifikante Assoziation mit dem Vorhandensein von positiven Lymphknoten und Veneninvasionen, sowie eine starke Assoziation mit der Tumorgröße, die in der Regel nicht als signifikanter Parameter bezüglich PatientInnenüberleben angesehen wird. Zur Relativierung unserer Resultate nahmen wir eine Gruppierung der Daten nach geringgradiger (0-10%) und hochgradiger (>50%) p53-Expression mit anschließender Durchführung eines Fisher's Exakt-Tests vor. Die Signifikanz unserer Testergebnisse im Chi-Quadrat-Test konnte mittels Fisher's Exakt-Test nicht bestätigt werden. In den meisten Studien finden die Autoren keine Korrelation der p53-Expression mit dem UICC-Stadium, der T-Klassifikation und dem Lymphknotenstatus [36, 104]. Signifikante Ergebnisse werden im Hinblick auf die Tumordifferenzierung angegeben: Mit steigendem Differenzierungsgrad der Tumoren wird ihre nukleäre p53-Expression häufiger [36]. Beispielsweise fanden Lan et al. [104] eine signifikante Korrelation der p53-Expression mit gut und mittelgradig differenzierten KRK. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Soong und Mitarbeiter [74], Bouzourene et al [75].

Wir machten die Beobachtung, dass Tumoren im Rektum eine signifikant häufigere p53-Expression aufweisen als Tumoren im restlichen Dickdarm. Diese signifikante Beziehung von p53-Abnormalitäten mit der Tumorlokalisierung (Kolon vs. Rektum) wurde von einigen Autoren bereits beschrieben [36, 72-76]. Der Grund für dieses Phänomen ist bisweilen nicht bekannt, jedoch werden alternative Pathomechanismen in der Entstehung von Kolon- und Rektumkarzinomen als mögliche Erklärungen diskutiert.

Im Jahr 2007 postulierte Jass [77] die Theorie, dass basierend auf der zu Grunde liegenden genetischen Instabilität und dem Vorhandensein einer DNA-Methylierung fünf unterschiedliche Pfade in der Entstehung von KRK identifiziert werden können. Demnach schlägt Jass fünf molekulare Subtypen des KRKs vor, die sich in molekularen, klinischen und morphologischen Merkmalen von einander unterscheiden. P53-Mutationen kommen am häufigsten in der Gruppe 4, also in MSI-stabilen, aneuploiden, linksseitigen, gut differenzierten Tumoren mit deutlicher Nekrose vor.

Bezüglich der prognostischen Aussagekraft fanden wir keine Beziehung der p53-Expression mit dem PatientInnenüberleben, was sowohl das progressionsfreie

als auch das krankheitsspezifische Überleben betrifft. Eine Vielzahl von Forschungsgruppen hat sich bis dato mit der prognostischen Signifikanz von p53-Abnormalitäten beim KRK beschäftigt. Die meisten Resultate deuten auf einen ungünstigen Einfluss der p53-Überexpression auf das Überleben von KRK-PatientInnen hin [41, 59, 64, 75-97]. Tabelle 9 gibt einen Überblick über jene Studien, die einen ungünstigen Einfluss der p53-Expression auf das Überleben von KRK-PatientInnen nachweisen. Zum Beispiel untersuchten Yamaguchi und Mitarbeiter [80] an 100 KRK-PatientInnen den prognostischen Stellenwert einer p53-Expression mittels Immunhistochemie für einen Zeitraum von bis zu vier Jahren. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass PatientInnen mit p53-positiven Tumoren eine fünffach höhere Rezidivrate und relatives Risiko aufweisen, an dem Tumor zu sterben als solche mit p53-negativen Tumoren. Ähnliche Resultate wurden mittels direkter Sequenzanalyse erzielt [99].

Wie anfangs beschrieben, erschweren methodische Unterschiede im Studiendesign Vergleiche und Interpretationen der einzelnen Ergebnisse. Sun und Mitarbeiter [59] wiesen beispielsweise anfangs einen positiven prädiktiven Wert der zytoplasmatischen p53-Expression beim KRK nach. In einer nachfolgenden, an der gleichen PatientInnenkohorte durchgeführten Analyse kamen die Autoren nach einer längeren Follow-Up-Zeit zu dem Ergebnis, dass sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische p53-Expression einen schlechten Einfluss auf das PatientInnenüberleben hat. Vergleichbar ungünstige Effekte einer immunhistochemischen p53-Überexpression wurden von anderen Forschungsgruppen beschrieben [84,85].

Tabelle 9: Immunhistochemische Studien, die einen ungünstigen Einfluss der p53-Expression auf das Überleben von KRK-PatientInnen nachweisen

Referenz	N	UICC-Stadium	Statistik	Follow-Up (Mon.)
78	109	I-IV	Univariat	45
75	122	II	Multivariat	67
79	83	I-IV	Univariat	41
80	100	I-IV	Univariat	20
81	78	I-IV	Univariat	42
82	107	I-IV	Univariat	60
83	293	I-IV	Multivariat	36
59	293	I-IV	Multivariat	24
84	144	I-IV	Univariat	120
85	166	II	Univariat	35
86	171	I-IV	Multivariat	60
87	107	I-IV	Multivariat	62
88	293	I-IV	Univariat	60
64	100	I-IV	Univariat	24
89	124	I-IV	Univariat	Archivgewebe
90	160	I-III	Univariat	60
91	79	III	Multivariat	60
92	116	III-IV	Multivariat	60
93	190	I-III	Multivariat	60
41	191	I-IV	Multivariat	60
94	134	I-III	Multivariat	60
95	504	I-IV	Multivariat	60
96	69	IV	Multivariat	100
97	229	II-III	Multivariat	84

Im Einklang mit unserem Negativergebnis bezüglich der prognostischen Wertigkeit der p53-Expression konnte in einer australischen Arbeit [100] an 995 KRK-PatientInnen mit Dukes' B und C Tumoren ebenfalls kein prognostischer Zusammenhang von p53-Veränderungen mit dem PatientInnenüberleben festgestellt werden. In einem deutschen Übersichtsartikel von Klump und Mitarbeitern [36] wurde

in über 50% der 49 untersuchten Studien ebenfalls keine Korrelation der p53-Expression mit dem PatientInnenüberleben gefunden. Ähnliche Resultate wurden auch von anderen Forschungsgruppen, die Immunhistochemie allein [101,102] oder zusammen mit Sequenzanalysen [57] verwendet hatten, erzielt.

Weniger Studien weisen einen prognostisch günstigen Stellenwert einer p53-Überexpression nach [99, 74, 96, 101, 102]. Soong und Mitarbeiter [99] konnten anhand einer umfassenden Studie an 556 Fällen mittels Uni- und Multivariatanalysen nachweisen, dass eine p53-Überexpression als unabhängiger Marker für verbessertes PatientInnenüberleben angesehen werden kann. Dieses Ergebnis wurde sowohl von Ahnen [97] in einer Untersuchung an 229 PatientInnen als auch kürzlich von Lan und Mitarbeitern [104] an 258 PatientInnen allerdings nur in Univariatanalysen bestätigt.

Die Frage nach dem prognostischen Stellenwert einer p53-Überexpression beim KRK bleibt dennoch weiterhin ungelöst. Munro und Mitarbeiter [105] veröffentlichten im Jahr 2005 eine systematische Literaturübersicht über all jene Studien, die sich mit der Beziehung von p53-Veränderungen und dem Überleben von KRK-PatientInnen bis zum Jahr 2005 beschäftigt hatten. Insgesamt wurden 168 Studien mit Überlebensdaten von 18.766 PatientInnen identifiziert. Zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Überblickstudie zählen:

- i) PatientInnen mit abnormalem p53-Protein, entweder mittels Immunhistochemie oder DNA-Sequenzanalyse nachgewiesen, weisen ein erhöhtes Risiko auf an dem KRK zu versterben.
- ii) Die relative Risikoerhöhung betrug mittels immunhistochemisch nachgewiesener p53-Veränderung 1.32 (95% CI, 1.23-1.42) und mittels Genanalyse 1.31 (95% CI, 1.19-1.90).
- iii) Das p53-Protein hat keinen Einfluss auf das Überleben von chemotherapierten PatientInnen. In PatientInnen mit rektalen Karzinomen korreliert das abnormale p53 mit dem Strahlentherapieversagen (RR, 1.49, 95% CI, 1.25-1.77).
- iv) Kein Zusammenhang konnte zwischen der Metastasierungswahrscheinlichkeit und dem immunhistochemischen p53-Status nachgewiesen werden.

In einer ähnlichen, internationalen Studie von Russo und Mitarbeitern [43] wurden mehr als 3.500 KRK-PatientInnen von 25 unterschiedlichen Forschungsgruppen hinsichtlich der prognostischen und prädiktiven Signifikanz von P53-Genmutationen untersucht. Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Übersichtsstudie von Munro und Mitarbeitern [105], wurden ausschließlich P53-Genmutationen in die Analyse einbezogen. Die wesentlichsten Ergebnisse sollen im Folgenden erwähnt werden:

- i) Bei PatientInnen mit proximalen Tumoren waren Mutationen im Exon 5 von P53 mit schlechtem PatientInnenüberleben assoziiert.
- ii) Bei PatientInnen mit distalen Tumoren waren Gendeletionen, die zum Verlust einer Aminosäure führen, mit schlechtem PatientInnenüberleben vergesellschaftet.
- iii) PatientInnen mit Wildtyp-P53 weisen nach adjuvanter Chemotherapie ein besseres Überleben auf als solchen, die nur chirurgisch therapiert wurden.

Obwohl diese Übersichtsstudien einen prognostischen Einfluss von p53-Abnormalitäten auf das Überleben von KRK-PatientInnen vermuten lassen, wurde dieser Zusammenhang von der europäischen Arbeitsgruppe für Tumormarker (EGTM) als bestenfalls moderat eingestuft [37]. Aus diesem Grund wird die routinemäßige Bestimmung des p53-Status von der EGTM derzeit nicht empfohlen.

Die Immunhistochemie stellt eine etablierte, schnelle und günstige Methode für den Nachweis der p53-Proteinüberexpression im Tumorgewebe dar [35]. Nichtsdestotrotz, können P53-Mutationen, die zu fehlerhaftem Spleißen oder zu Verkürzung des Genprodukts führen, mittels Immunhistochemie oft nicht nachweisbar sein. Derartige Mutationen findet man in menschlichen Tumoren mit einer Häufigkeit von etwa 20% [55]. Diese problematische Korrelation von P53-Mutationen und der immunhistochemisch nachweisbaren Überexpression des veränderten nukleären p53-Proteins wurde in einigen Studien beschrieben [35,36,38-40]. Die mangelhafte Übereinstimmung zwischen Genmutationen und der Detektion von Protein-Überexpressionen im immunhistochemisch untersuchten Tumorgewebe stellt ein quantitativ bedeutsames Phänomen dar [36]. Klump et al. [36] finden auf diese Fragestellung folgende Erklärungen: Allelische Mutationen, die zu keiner Proteinstabilisierung führen, können sich der immunhistochemischen Nachweisbarkeit entziehen. Rasterschubmutationen können die Produktion von verkürzten Proteinen zur Folge haben, die nicht mittels Immunhistochemie

detektierbar sind. Umgekehrt wurden posttranskriptionale Stabilisierungsprozesse beschrieben, die ohne zu Grunde liegende Mutationen, einen immunhistochemischen Nachweis des Wildtyp-p53-Proteins bewirken. Vereinfacht ausgedrückt, kann eine nukleäre p53-Überexpression in manchen Fällen auch ohne stattgefundene Genmutation und umgekehrt Genmutationen ohne folgende Protein-Überexpression nachgewiesen werden [35,36,38-40]. In der Literatur werden Übereinstimmungen zwischen immunhistochemischen Techniken und genanalytischen Methoden in der Detektion von p53-Alterationen mit einer Spannweite von 50-80% angegeben [35,38-43]. Im Jahr 2000 beschäftigen sich Kaserer und Mitarbeiter [35] eingehend mit diesem Thema: Die Autoren verglichen unterschiedliche Färbemuster in der Immunhistochemie (Färbemuster A: Anfärbung aller Tumorzellkerne vs. Färbemuster B: Vereinzelt nukleäre Anfärbung) mit dem P53-Mutationsstatus. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Färbemuster A signifikant häufiger in Tumoren mit mutiertem P53 als in Tumoren mit Wildtyp-P53, in denen Färbemuster B vorherrschend war, nachweisbar war. Laut den Autoren darf letzteres demnach nicht als Marker einer P53-Genmutation verwendet werden.

Abschließend soll bemerkt werden, dass keine Nachweismethode für p53-Mutationen, die in KRK-Studien verwendet werden, eine Genauigkeit von 100% aufweist. Unter den gängigen Techniken stellt die direkte DNA-Sequenzierung den Goldstandard in der Mutationsanalyse dar [55]. Petersen und Mitarbeiter [106] führten eine Metaanalyse über die Beziehung von P53-Mutationen und dem Überleben von über 4400 KRK-PatientInnen durch: Studien, die immunhistochemische Methoden angewendet hatten, zeigten einen signifikanten Einfluss des p53-Status auf das progressionsfreie Überleben betroffener PatientInnen. Im Gegensatz dazu, wurde in Arbeiten, die DNA-Sequenzierungsverfahren verwendet hatten, eine signifikante Beeinflussung des Gesamtüberlebens von KRK-PatientInnen nachgewiesen.

P63, das am langen Arm von Chromosom 3 lokalisiert ist, stellt ein weiteres Mitglied der P53-Genfamilie dar. Bekannt ist, dass das p63-Protein eine Schlüsselrolle in der Regulation der epithelialen Differenzierung und Proliferation einnimmt. Obwohl initial als Tumorsuppressorgen postuliert, ist mittlerweile klar, dass p63 nicht als klassischer Tumorsuppressor angesehen werden kann. Das P63-Gen kodiert für multiple Isoformen, die unterschiedliche zelluläre Aufgaben erfüllen. Das TAp63-Protein ist, ähnlich wie p53, in der Lage an DNA zu binden und die

Transkription von p53-Zielgenen zu aktivieren. Dies kann die Induktion der Zellzyklusblockade bzw. der Apoptose zur Folge haben. Im Gegensatz dazu, ist die Δ Np63-Variante in der Lage negative Effekt auf p53, p73 und auch p63 (TAp63-Protein) auszuüben [30,31]. Die endgültige Bezeichnung, Onkogen oder Tumorsuppressor, steht demnach noch zur Debatte. Im Normalgewebe konnte eine starke nukleäre Expression für p63 in der Basalzellschicht von Platten- und Übergangsepithelien als auch in basalen Zellen des Respirationstrakts, von Prostata- und Brustdrüsengewebe detektiert werden. P63-Mutationen werden, im Gegensatz zu P53-Mutationen, selten in menschlichen Tumoren nachgewiesen.

In unserer Untersuchung zeigten alle Proben von Primärtumoren und zugehörigen Metastasen, die bezüglich ihrer p63-Expression als auswertbar eingestuft wurden, keine nukleäre p63-Immunreaktion. Lediglich eine zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen konnte beobachtet werden. Auf Grund dieses Negativergebnisses wurde keine Korrelationsanalyse p63-Expression mit histopathologischen Parametern oder dem PatientInnenüberleben durchgeführt. Die Datenlage über die prognostische Relevanz der nukleären p63-Überexpression beim KRK ist verglichen mit p53 eher mangelhaft. Zwar haben einige Studien [45-47] die Rolle des p63-Proteins in der neoplastischen Transformation und Tumorprogression thematisiert, jedoch gibt es bis dato insgesamt nur zwei Arbeiten, die sich mit der p63-Immunreaktivität beim KRK beschäftigen [48,49]. Gegenstand einer Studie von Carneiro und Mitarbeiter [48] war der Zusammenhang der p63-Expression mit histopathologischen Parametern, wie histologischer Typ und Differenzierungsgrad, in kolorektalen Adenomen (n=30) und Adenokarzinomen (n=30). In acht der 30 Adenome (27%) und in sechs der 30 Adenokarzinome (20%) konnte eine nukleäre p63-Anfärbung nachgewiesen werden. Die p63-Expression zeigte eine starke Assoziation mit villösen Adenomen und schlecht differenzierten Adenokarzinomen. Die Autoren schlossen daraus, dass p63 als Parameter für eine schlechte Differenzierung in KRK angesehen werden könnte. Weiters prüften Owens und Mitarbeiter [49] mittels Immunhistochemie die Nützlichkeit von p63 in der Unterscheidung zwischen analen Plattenepithelkarzinomen (n=24), kolorektalen neuroendokrinen Tumoren (n=32) und kolorektalen Adenokarzinomen (n=68). Im Einklang mit unseren Ergebnissen waren auch alle von ihnen untersuchten KRK p63-negativ. Insgesamt kamen die Autoren zu dem Schluss, dass p63 als hochspezifisches und nützliches Hilfsmittel in der Diagnostik von Karzinomen des

Analkanals verwendet werden kann. Die Wahl verschiedener p63-Antikörper bietet keine Erklärung dieser unterschiedlichen Testergebnisse der p63-Immunreaktivität beim KRK, denn alle Forschungsgruppen, unsere eingeschlossen, verwendeten den gleichen p63-Antikörper.

Das P73-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 lokalisiert und kodiert für verschiedene durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen. Analog zu p63, kann durch variierende Promotorregionen das TAp73-Protein und die Δ Np73-Variante gebildet werden [30,31]. Wie p63, wurde p73 initial für ein klassisches Tumorsuppressorgen gehalten, was sich auf Strukturhomologien mit p53 stützte. In Tumoren werden jedoch viel häufiger p73-Überexpressionen als p73-Expressionsverluste, die nicht mit den Merkmalen eines klassischen Tumorsuppressorgens konform gehen, nachgewiesen. Darüber hinaus prädisponiert ein Mangel an p73 nicht unmittelbar zur Tumorentstehung. Es hat sich gezeigt, dass p73 eine fundamentale Rolle in der Entwicklung neuronaler Strukturen spielt. Wie bei p63 erfüllen die unterschiedlichen p73-Varianten verschiedene zelluläre Aufgaben: Die TAp73-Isoform kann, entsprechend der großen strukturellen Übereinstimmungen mit p53, durch spezifische Bindung an DNA und p53-Zielgene zur Aktivierung der Zellzyklusblockade und Induktion der Apoptose führen. Die Δ Np73-Variante ist in der Lage direkt spezifische Gene, welche von der TAp73-Isoform nicht induziert werden, zu aktivieren. Mittels DNA-Bindung oder Protein-Interaktion vermag die Δ Np73-Isoform antiapoptotische und onkogene Effekte auszuüben [30,31].

p73 wird zu einem geringen Ausmaß in normalen Zellen exprimiert, was die Detektion im Normalgewebe schwierig macht. Die häufigsten Veränderungen im Tumorgewebe entsprechen Überexpressionen der verschiedenen p73-Isoformen, dabei ist für gewöhnlich die TAp73-Variante betroffen. Eine signifikante p73-Überexpression wurde in einer Reihe von Tumoren, darunter auch in KRK, nachgewiesen [44].

In unserer Untersuchung zeigten alle Stenzen, die bezüglich ihrer p73-Expression als auswertbar bewertet wurden, durchgehend keine nukleäre sondern lediglich zytoplasmatische p73-Anfärbung. Der Grund für unser Färbeergebnis kann einerseits in der Wahl eines zu wenig affinen Antikörpers und andererseits in der immunhistochemischen Färbemethode begründet sein.

Die p73-Expression beim KRK stellt, ähnlich wie p63, ein bis dato wenig erforschtes Gebiet dar. Derzeit gibt es nur zwei Studien [50,51], die sich mit dem prognostischen Stellenwert einer p73-Überexpression beim KRK beschäftigt haben.

Im Jahr 2001 untersuchten Liu und Mitarbeiter [50] mittels Immunhistochemie die klinisch-pathologische Relevanz der p73-Überexpression an 92 KRK-Fällen. In ihrer Arbeit zeigte die p73-Expression keine Korrelation mit pathologischen Parametern, wie der Tumordifferenzierung, dem Krankheitsstadium, der Tumorlokalisation oder der Tumorgöße. Allerdings wiesen sie eine signifikante Assoziation zwischen der Verteilung der p73-Immunreaktion und der Rezidivrate nach. Im Hinblick auf eine Korrelation mit dem PatientInnenüberleben zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen geringgradiger (0-50% nukleäre p73-Expression) und hochgradiger (>50% nukleäre p73-Expression) p73-Immunreaktion: In Fällen mit hochgradiger p73-Expression wurde eine kürzere Überlebenszeit beobachtet. Kein signifikanter Unterschied konnte im Hinblick auf das rezidivfreie PatientInnenüberleben detektiert werden. Zusammenfassend muss jedoch erwähnt werden, dass die Resultate dieser japanischen Analyse im Hinblick auf die geringe PatientInnenzahl (n=92) und das Fehlen einer Multivariatanalyse mit Vorbehalt betrachtet werden sollten.

In einer umfassenderen Arbeit von Sun et al. [51] wurde die prognostische Rolle der p73-Überexpression an 221 primären KRK untersucht. Die Teilergebnisse dieser schwedischen Studie sollen im Folgenden erwähnt werden: Eine nukleäre p73-Anfärbung konnte signifikant häufiger in Primärtumoren (67%) und Metastasen (95%) verglichen mit Normalgewebe (19%) nachgewiesen werden. PatientInnen mit p73-positiven Tumoren zeigten eine signifikant kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu jenen mit p73-negativen Tumoren. Dies wurde auch speziell für die Gruppe der linksseitigen Tumoren nachgewiesen. In einer anschließenden Multivariatanalyse blieb die prognostische Signifikanz der p73-Expression sowohl in der Gruppe aller PatientInnen als auch in der Gruppe der linksseitigen Tumoren bestehen.

Für die P53-Genfamilie, die in kausalem Zusammenhang mit der Pathogenese von KRK zu stehen scheint, kann eine prognostische Signifikanz angenommen werden. Jedoch sind die Daten in vielen Aspekten widersprüchlich. Die von uns am KRK gewonnenen Daten sind im Hinblick auf ihre p53-Expression und teils auch bezüglich ihrer p63-Expression im Einklang mit den Ergebnissen der aktuellen Literatur. Im Widerspruch zu unseren Resultaten konnten andere

Forschungsgruppen verwertbare Daten im Hinblick auf p73 produzieren. Dies kann auf die Verwendung eines zu wenig affinen Antikörpers oder direkt auf Färbemethoden zurückzuführen sein. Um diese Frage zu klären, sind weitere Studien, die neue Einblicke in die molekularen Veränderungen von KRK ermöglichen, nötig.

Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58:71-96.
2. Hauser H. Das Kolorektale Karzinom – Teil I: Epidemiologie, Präkanzerosen, Primär- und Sekundärprävention. *J Gastroenterol Hepatol Erkr* 2004; 6-11.
3. Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008* World Health Organization. Lyon: IARC Press, 2008
4. STATISTIK AUSTRIA. Bundesanstalt Statistik Österreich *Statistisches Jahrbuch 2008* Firmenbuch: FN 191155k, Firmenbuchgericht: Handelsgericht Wien Firmensitz: Wien.
5. De Angelis R, Francisci S, Baili P, Marchesi F, Roazzi P, Belot A, Crocetti E, Pury P, Knijn A, Coleman M, Capocaccia R; EUROCORE Working Group. The EUROCORE-4 database on cancer survival in Europe: data standardisation, quality control and methods of statistical analysis. *Eur J Cancer.* 2009 Apr;45:909-930.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61:759-767.
7. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol.* 2001 Aug;54:206-214.
8. Fletcher CDM, *Diagnostic Histopathology of Tumors*, 3rd Edition ed. Boston: Churchill Livingstone Elsevier. 2007
9. Sobin LH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors*. 6th ed. New York: Wiley-Liss inc., 2002
10. Quirke P, Williams GT, Ectors N et al. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol.* 2007 Jul;8:651-657.
11. Compton CC. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol.* 2003 Apr;16:376-388.
12. Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F et al. From Dukes through Jass: pathological prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol.* 1994 May;25:498-505.
13. Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. Multivariate analysis of prognostic factors for operable rectal cancer. *Lancet.* 1984 Sep 29;2:733-736.

14. Heys SD, Sherif A, Bagley JS et al. Prognostic factors and survival of patients aged less than 45 years with colorectal cancer. *Br J Surg*. 1994 May;81:685-688.
15. Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T et al. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 1991 Jul;214:11-18.
16. Carlon CA, Fabris G, Arslan-Pagnini C et al. Prognostic correlations of operable carcinoma of the rectum. *Dis Colon Rectum*. 1985 Jan;28:47-50.
17. Horn A, Dahl O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1991 Sep;34:798-804.
18. Lee YT. Local and regional recurrence of carcinoma of the colon and rectum: I. Tumour-host factors and adjuvant therapy. *Surg Oncol*. 1995;4:283-293.
19. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, Hammond ME, Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, Nielsen ML, Sargent DJ, Taylor CR, Welton M, Willett C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124:979-994.
20. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics. Tumors of the Digestive System*, Lyon: IARC Press, 2000:105-119.
21. Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2000 Feb;36:121-126.
22. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 2002 Sep;41:59-81.
23. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan;50:151-162.
24. Ueno H, Murphy J, Jass JR et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002 Feb;40:127-132.

25. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K et al. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer*. 1989 Feb 1;63:539-543.
26. Hase K, Shatney C, Johnson D et al. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1993 Jul;36:627-635.
27. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S et al. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005 Sep-Oct;52:1432-1435.
28. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*. 1987 Jun 6;1:1303-1306.
29. Turner RR, Li C, Compton CC. Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13:6871s-6876s.
30. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2004 Jul;2:371-386.
31. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*. 2006 Jun;13:962-972.
32. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979 Mar 15;278:261-263.
33. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979 May 17;1:43-52.
34. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Nature. Surfing the p53 network. 2000 Nov 16;408:307-310.
35. Kaserer K, Schmaus J, Bethge U et al. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. *J Pathol* 2000 190: 450-456.
36. Klump B, Nehls O, Okech T et al. Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? Original data an review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2004 19:23-42.

37. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on tumor markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43:1348-1360.
38. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human Mutation* 2003 21:271-276.
39. Cripps KJ, Purdie CA, Carder PJ et al. A study of stabilisation of p53 protein versus point mutation in colorectal carcinoma. *Oncogene* 1994 9:2739-2743.
40. Dix B, Ribbins P, Carrello S et al. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1994 70:585-590.
41. Kressner U, Inganäs M, Byding S et al. Prognostic Value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999 17;2:593-599.
42. Veloso M, Wrba F, Kaserer K et al. p53 gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2000 437:241-247.
43. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRC Collaborative Study Group. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005 23;30:7518-7528.
44. Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: Defining the network. *Oncogene*. 2007 Aug 9;26 5169-5183.
45. Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R et al. P63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2005;2:187-194.
46. Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R et al. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch* 2004;4:332-339.
47. Tannapfel A, Schmelzer S, Benicke M et al. Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001;2:163-170.
48. Carneiro FP, Ramalho LN, Britto-Garcia S et al. Immunohistochemical expression of p16, p53, and p63 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum*. 2006 49:588-594.

49. Owens SR, Greenson JK. Immunohistochemical staining for p63 is useful in the diagnosis of anal squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2007;31:258-290.
50. Liu L, Cui X, Sakaguchi T et al. Expression of p73 in colorectal carcinoma: Clinicopathological relevance. *J Int Med Res* 2001;29:297-303.
51. Sun XF. P73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinomas. *Clin Can Res* 2002;8:165-170.
52. Zlobec I, Terracciano L, Jass JR et al. Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2007 Oct;451:763-769.
53. Zlobec I, Steele R, Michel RP et al. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2006 Sep;19(9):1236-42.
54. Hoff PM. *J Clin Oncol.* Is there a role for routine p53 testing in colorectal cancer? 2005 Oct 20;23:7395-7396.
55. Anwar S, Frayling IM, Scott NA et al. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg.* 2004 Oct;91:1275-1291.
56. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ et al. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol.* 1994 Jan;172:5-12.
57. Bosari S, Viale G, Bossi P et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1994 May 4;86:681-687.
58. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer.* 2001 May 1;92:338-341.
59. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet.* 1992 Dec 5;340:1369-1373.
60. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H et al. Prognostic significance of p53 nuclear and cytoplasmic overexpression in right and left colorectal adenocarcinomas. *Eur J Cancer.* 1996 Oct;32A:1963-1967.
61. Flamini G, Curigliano G, Ratto C et al. Prognostic significance of cytoplasmic p53 overexpression in colorectal cancer. An immunohistochemical analysis. *Eur J Cancer.* 1996 May;32A:802-806.

62. Belluco C, Guillem JG, Kemeny N et al. p53 nuclear protein overexpression in colorectal cancer: a dominant predictor of survival in patients with advanced hepatic metastases. *J Clin Oncol*. 1996 Oct;14:2696-2701.
63. Gallego MG, Aceñero MJ, Ortega S et al. Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2000 Jul;43:971-975.
64. Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer*. 1996 Jul;74:216-223.
65. McKay JA, Douglas JJ, Ross VG et al. Expression of cell cycle control proteins in primary colorectal tumors does not always predict expression in lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar;6:1113-1118.
66. Sun XF, Carstensen JM, Stål O et al. c-erbB-2 oncoprotein in relation to DNA ploidy and prognosis in colorectal adenocarcinoma. *APMIS*. 1995 Apr;103:309-315.
67. Kimura O, Sugamura K, Kijima T et al. Flow cytometric examination of p53 protein in primary tumors and metastases to the liver and lymph nodes of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1996 Dec;39:1428-1433.
68. Zhang JS, Caplin S, Bosman FT et al. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. *Int J Cancer*. 1997 Mar 17;70:674-678.
69. Menon AG, Tollenaar RA, van de Velde CJ et al. p53 and HLA class-I expression are not down-regulated in colorectal cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21:79-85.
70. Yao J, Goh HS, Smith DR et al. p53 mutations in primary colorectal adenocarcinomas and liver metastases. *Br J Surg*. 1996 Sep;83:1245-1256.
71. Kastrinakis WV, Ramchurren N, Rieger KM et al. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene*. 1995 Aug 17;11:647-652.
72. Lan YT, Chang SC, Li AF et al. p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007 May;22:499-506.
73. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I et al. DNA ploidy and S-phase fraction, but not p53 or NM23-H1 expression, predict outcome in colorectal cancer

74. Paluszkiwicz P, Berbeć H, Pawłowska-Wakowicz B et al. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. *Cancer Detect Prev.* 2004;28:252-259.
75. Bouzourene H, Gervaz P, Cerottini JP et al. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2000 May;36:1008-1015.
76. Soong R, Grieu F, Robbins P et al. p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997 Aug;3:1405-1411.
77. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology.* 2007 Jan;50:113-130.
78. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O et al. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1992 Apr;102:1136-1141
79. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW et al. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA.* 1989 Jun 2;261:3099-3103.
80. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer.* 1992 Dec 15;70:2778-2784.
81. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P et al. Increased p53 protein content of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J Cancer.* 1992 Oct;66:758-764.
82. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A et al. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 1992 Sep;66:558-562.
83. Sun XF, Carstensen JM, Stål O et al. Prognostic significance of p53 expression in relation to DNA ploidy in colorectal adenocarcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423:443-448.
84. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T et al. Overexpression of p53 and long-term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer.* 1994 Aug;70:293-296.

85. Laing JT, Cheng YM, Chang KJ et al. Reappraisal of K-ras and p53 gene mutations in the recurrence of Dukes' B2 rectal cancer after curative resection. *Hepatogastroenterology*. 1999;46:830-837.
86. Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M et al. Evaluation of multiple biopathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer*. 1999 Dec 22;84:545-52.
87. Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF et al. p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node--positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 1994 Oct;12(10):2043-2050.
88. Zhang Hong. Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999 Dec;5:4126-4132.
89. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H et al. Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol*. 1992 Feb;97:244-249.
90. Schwandner O, Bruch HP, Broll R. p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis*. 2002 Jan;17:11-19.
91. Cascinu S, Graziano F, Catalano V et al. An analysis of p53, BAX and vascular endothelial growth factor expression in node-positive rectal cancer. Relationships with tumour recurrence and event-free survival of patients treated with adjuvant chemoradiation. *Br J Cancer*. 2002 Mar 4;86:744-749.
92. Schelwies K, Sturm I, Grabowski P et al. Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer*. 2002 Jun 1;99:589-596.
93. Diez M, Medrano M, Mugüerza JM et al. Influence of tumor localization on the prognostic value of P53 protein in colorectal adenocarcinomas. *Anticancer Res*. 2000 Sep-Oct;20:3907-3912.
94. Manne U, Myers RB, Moron C et al. Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 1997 Jun 20;74:346-358.
95. Nitti D, Belluco C, Montesco MC et al. Nuclear p53 protein expression in resected hepatic metastases from colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Eur J Cancer*. 1998 May;34:851-855.

96. Manne U, Weiss HL, Myers RB et al. Nuclear accumulation of p53 in colorectal adenocarcinoma: prognostic importance differs with race and location of the tumor. *Cancer*. 1998 Dec 15;83:2456-2467.
97. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res*. 1998 Mar 15;58:1149-1158.
98. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1994 Jan;106:42-48.
99. Soong R, Powell B, Elsaleh H et al. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer*. 2000 Oct;36:2053-60.
100. Scott N, Sagar P, Stewart J et al. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer*. 1991 Feb;63:317-319.
101. Lanza G Jr, Maestri I, Dubini A et al. p53 expression in colorectal cancer: relation to tumor type, DNA ploidy pattern and short-term survival *Am J Clin Pathol*. 1996 May;105:604-612.
102. Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT et al. Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br J Cancer*. 1999 Sep;81:122-126.
103. Dix BR, Robbins P, Soong R et al. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer*. 1994 Dec 15;59:747-751.
104. Lan YT, Chang SC, Li AF et al. p53 protein accumulation as a prognostic marker in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007 May;22:499-506.
105. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005 Feb 14;92:434-444.
106. Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C et al. The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum*. 2001 Mar;44:322-333.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marion Julia Pollheimer

Geboren am: 21.10.1983 in Braunau/Inn

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: österreichisch

Schulbildung:

1990 bis 1994: Besuch der Volksschule Lochen (Oberösterreich)

1994 bis 1998: Besuch der Hauptschule Munderfing (Oberösterreich)

1998 bis 2002: Besuch des BORG Neumarkt/Wallersee (Salzburg)

2002 bis 2009 Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz, Österreich

Studienbegleitende Tätigkeit:

2006 bis 2009: Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Pathologie Graz der MUG

Diplomarbeit:

Analyse von p53, p63 und p73 beim kolorektalen Karzinom

Famulaturen:

LKH Graz (Radiologie)

LKH Graz (Pulmologie)

LKH Graz (Pathologie)

BHB Linz (Neurologie)

Vertiefte Ausbildungen, Spezielle Studienmodule:

Innere Medizin

Tumor- und Neurobiologie

Prognosefaktoren in der Tumorbiologie

Chronobiologie und Chronomedizin

Magnetresonanz in der Neuroradiologie

Onkologische radiologische Fallbesprechung

Alpinmedizin

Erkrankungen des Knochens und der Gelenke
Der Krebspatient im interdisziplinären Betreuungskonzept
Klinisch-topografische Anatomie der Eingeweide
Klinisch-topografische Anatomie der Extremitäten

Praktisches Jahr:

Abteilung für Rheumatologie Graz: 10 Wochen
Allgemeinmedizin-Famulatur in der Lehrpraxis von Dr. Erika Niederberger: 5 Wochen
Abteilung für Gynäkologie, LKH Graz: 5 Wochen
Abteilung für Kinderchirurgie, LKH Graz: 10 Wochen

Sprachen: Deutsch, Ausgezeichnet in Wort und Schrift
Englisch, Sehr Gut in Wort und Schrift