

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter (Betreuer: Dr. A. H. Marx)

p53-Alterationen in Kolonadenomen: Beziehung zu Zellproliferation und Klinik

Dissertation

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

Roselyne Oelsner
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.01.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: 1. Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebaş

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Izbicki

INHALTSVERZEICHNIS

ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
1. EINLEITUNG.....	6
1. 1 THEORETISCHE BETRACHTUNG.....	6
1. 1. 1 <i>Morphologische Veränderungen des Kolonepithels</i>	6
1. 1. 2 <i>Klinisches Prozedere und Therapie</i>	8
1. 1. 3 <i>Molekulare Veränderungen: Adenom-Karzinom-Sequenz</i>	9
1. 2 PRAKTISCHE BEDEUTUNG UND FRAGESTELLUNG	11
1. 3 ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	12
2. MATERIAL UND METHODEN.....	13
2. 1 PATIENTEN UND TUMORKOLLEKTIV	13
2. 2 TMA- HERSTELLUNG	13
2. 3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....	15
2. 4 MUTATIONSANALYSE	18
2. 4. 1 <i>Isolation genomischer DNA aus Gewebe</i>	18
2. 4. 2 <i>Polymerasenketten-Reaktion (PCR)</i>	19
2. 4. 3 <i>DNA Sequenzierung</i>	21
2. 5 STATISTIK	22
3. RESULTATE	23
3. 1 p53-IMMUNHISTOCHEMIE DER KOLONADENOME	23
3. 2 p53-MUTATIONSANALYSE DER KOLONADENOME	31
3. 3 KI-67 IMMUNHISTOCHEMIE DER KOLONADENOME	40
4. DISKUSSION	43
4. 1 ERGEBNISSE UND METHODISCHE ASPEKTE	43
4. 1. 1 <i>Nukleare p53-Akkumulation in Kolonadenomen</i>	43
4. 1. 2 <i>p53-Mutationen der Kolonadenome</i>	48
4. 1. 3 <i>p53-Immunhistochemie im Vergleich zu Mutationsanalyse</i>	50
4. 1. 4 <i>Proliferationsverhalten</i>	52
4. 2. KLINISCHE KONSEQUENZ – SCHLUSSFOLGERUNG	53
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	55
6. LITERATUR	57

7. ANHANG	66
7.1 ERGEBNISSE DER P53-IMMUNHISTOCHEMIE IN KORRELATION ZU TUMORKLINIK IN ABHÄNGIGKEIT VOM GRADING	66
DANKSAGUNG	68
LEBENS LAUF	69
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	70

Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Kolonkarzinom gehört weltweit zu den häufigsten Krebsarten. Vorläuferläsionen des Darmkrebses sind die Kolonadenome. Durch eine rechtzeitige Adenomabtragung kann ein Karzinom verhindert werden, indem die Adenom-Karzinom-Sequenz unterbrochen wird.

Wichtigster Schritt in dieser Karzinogenese ist die Inaktivierung des p53-Gens, welches als spätes Ereignis für die Umwandlung der Adenome in Kolonkarzinome mitverantwortlich ist. p53 ist an der Entstehung vieler Krebsarten beteiligt und das bisher wichtigste bekannte Tumorsuppressorgen. Eine mutationsbedingte Inaktivierung führt zur Konformationsänderung des p53-Proteins mit Verlust seiner zentralen Funktion in der Kontrolle des Zellwachstums.

Diese Arbeit untersucht ob und inwieweit das p53-Protein als Biomarker für eine Abschätzung der Entartungswahrscheinlichkeit eines Kolonadenoms dienen kann. Dazu sollte die Häufigkeit abnormer nuklearer p53-Akkumulationen mittels DNA-Sequenzierung und Immunfärbungen bestimmt und in Beziehung zu histopathologischen Prognoseparametern und insbesondere dem gleichzeitigen Vorkommen von invasiven Karzinomen gesetzt werden.

Studien bezüglich einer abnormen nuklearen p53-Akkumulation in Kolonadenomen kamen häufig aufgrund niedriger Fallzahlen zu keinem eindeutigen Ergebnis. In dieser Arbeit soll mithilfe eines großen Kollektivs ein repräsentatives Ergebnis erzielt und eine Klärung dieser Fragestellung erfolgen.

1. Einleitung

1.1 Theoretische Betrachtung

Darmkrebs ist in Industrieländern bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung. Laut dem World Cancer Report (2008) der WHO liegt die Inzidenz jährlich bei schätzungsweise 945.000 weltweit. In Deutschland erkrankten 2002 ungefähr 35.600 Männer und 35.800 Frauen neu (Robert Koch Institut, 2006). Mit bundesweit ca. 30.000 Sterbefällen jährlich ist Darmkrebs auch die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Umso wichtiger ist es, das Entstehen durch präventivmedizinische Maßnahmen zu verhindern. Adenokarzinome sind mit 90 - 95 % aller Darmtumoren am häufigsten, 10-15 % machen muzinöse Karzinome und andere seltene Karzinomtypen aus. Entsprechend des Differenzierungsgrades der Zellen werden die Karzinome in gut differenzierte (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenzierte -bzw entdifferenzierte (G4) Tumoren unterteilt. Das Grading korreliert mit der Prognose.

Mehr als 90 % der Kolonkarzinome entstehen aus Vorläuferläsionen, den sog. Adenomen [85]. Diese sind primär gutartige Neubildungen des Drüseneithels, die maligne entarten können. Bei mindestens 25 % der Männer und 15 % der Frauen, die sich einer Koloskopie unterziehen, werden ein oder mehrere Adenome entdeckt [52].

Das Entstehen wird durch mehrere Risikofaktoren begünstigt: hohes Alter [57, 90], positive Familienanamnese [102], fett- und fleischreiche Ernährung [55, 105], Rauchen und Alkohol [30, 93, 94] sowie eine langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) [14, 87]. Einer ballaststoff-, mineral- und vitaminreichen Ernährung (Calcium, Selen, Folsäure u. a) [7, 66] werden protektive Eigenschaften zugesprochen. In einigen Studien erwiesen sich auch Nichtsteroidale Antirheumatika und postmenopausale Hormonpräparate als präventiv [2, 10, 77].

5-10 % der Karzinome sind genetisch bedingt: Dazu gehören die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom-Syndrom (HNPCC, Lynch-syndrom) [1, 15, 26, 53].

1.1.1 Morphologische Veränderungen des Koloneithels

Die makroskopisch meist als Epithelwucherungen erscheinenden Adenome (neoplastische Polypen) werden endoskopisch häufig als Zufallsbefund entdeckt, da sie

selten Beschwerden (Blutung, Obstipation, abdominale Schmerzen) bereiten. Nach ihrem histologischen Wachstumsmuster werden Adenome in tubulär, villös und tubulovillös eingeteilt:

Tubuläre Adenome: Aufbau aus verzweigten Tubuli (> 75 %), häufig gestielt.
Vorkommen: > 75 % aller Adenome

Villöse Adenome: Aufbau aus finger- oder zottenartigen Auffaltungen (> 75 %), (Zotten). Vorkommen: < 5 % aller Adenome

Tubulovillöse Adenome: Zusammensetzung aus mehr als 25 %, aber weniger als 75 % villösen Anteilen. Vorkommen: 10 – 25 % der Adenome

Davon abgegrenzt werden sog. serratierte Adenome (sessiles serratiertes Adenom, traditionelles serratiertes Adenom).

Erste morphologische Veränderungen zu einem Adenom sind sog. „aberrant crypt foci“ (ACF). Diese sind Cluster von abnormal großen, leicht erhabenen, intestinalen Mukosakrypten, die über weitere Veränderungen „Mikroadenome“ und letztlich Adenome bilden [3]. Mikroskopisch sind Adenome durch Ausreifungsstörungen, Zellatypien und Architekturstörungen charakterisiert, welche sich primär auf das Epithel beschränken. Da diese Veränderungen progredient sind, werden entsprechend des Ausprägungsgrades verschiedene Gradeinteilungen bestimmt. Historisch existierte die Einteilung in leicht-, mittel- und hochgradige „Dysplasien“. Leichtgradig verändert ist die Läsion bei dichtstehenden, länglichen Epithelzellen mit stäbchenförmigen Kernen und vermehrt nachweisbaren Mitosen. Eine „hochgradige Atypie“ besteht bei starken Zellatypien, komplexer werdender Zytoarchitektur und Auftreten eines prominenten Polaritätsverlusts der Kerne. Eine „mittelgradige Dysplasie“ bezeichnete ein Zwischenstadium. Da diese Diagnosen hauptsächlich auf subjektive Kriterien der einzelnen Pathologen beruhen, traten häufig Interobserver- Schwankungen beim Grading dieser Vorläuferneoplasien auf. Diese Unterschiede waren nicht nur unter westlichen Pathologen bekannt [13, 21, 24, 57], sondern besonders deutlich zwischen westlichen und japanischen [79, 80]. Dies war Anlass für die Erarbeitung einer neuen Klassifikation auf einem Weltkongress in Wien [81] mit der Konsequenz, dass Adenome nur noch in zwei Kategorien, nämlich „low grade-“ und „high grade“ eingeteilt werden. Die „low grade“ Adenome entsprechen den früheren leicht- und

mittelgradigen „Dysplasien“, die „high grade“ Adenome den ehemals hochgradigen „Dysplasien“. Intraepitheliale Karzinome (sog. Carcinoma in situ) bzw. intramukosale Karzinome ohne Infiltration der Lamina muscularis mucosae werden von den „high grade“ Adenomen unterschieden, haben aber eine ähnliche Prognose wie diese und werden daher genau so behandelt. Da die Abgrenzung der Kategorie „high grade“ zum intramukosalen Karzinom weiterhin schwierig war und noch ist, wurde die Klassifikation modifiziert [82] (Abbildung 1). Zudem wurde der Begriff „Dysplasie“ in der WHO Klassifikation des Jahres 2000 durch den Begriff „intraepitheliale Neoplasie“ abgelöst. Aufgrund der weiter bestehenden erheblichen Interobserver-Variabilität bei der Einteilung der Adenome wären Biomarker hilfreich, die eine objektive Unterscheidung dieser Entitäten ermöglichen. Eine genaue Einteilung der Präkanzerosen ist unerlässlich für das klinische Prozedere und Einschätzung der Prognose.

Abbildung 1: Wiener Klassifikation und ihre modifizierte Version (aus Sugai et al. 2002 [91])

Vienna or Modified Vienna Classification of Gastrointestinal Neoplasia		
	Vienna classification	Modified Vienna classification
Category 1	Negative for neoplasia/dysplasia	Negative for neoplasia/dysplasia
Category 2	Indefinite for neoplasia/dysplasia	Indefinite for neoplasia/dysplasia
Category 3	Non-invasive low grade neoplasia (low grade adenoma/dysplasia)	Low grade neoplasia (low grade adenoma/dysplasia)
Category 4	Non-invasive high grade neoplasia	Intramucosal borderline neoplasia
	4.1 High grade adenoma/dysplasia	4.1 High grade adenoma/dysplasia
	4.2 Non-invasive carcinoma (carcinoma <i>in situ</i>)	4.2 Intramucosal carcinoma, well differentiated
	4.3 Suspicion of invasive carcinoma	
Category 5	Invasive neoplasia	Definite carcinoma
	5.1 Intramucosal carcinoma	5.1 Intramucosal carcinoma, moderately or poorly differentiated
	5.2 Submucosal carcinoma or beyond	5.2 Submucosal carcinoma or beyond

1. 1. 2 Klinisches Prozedere und Therapie

Zur prophylaktischen Diagnostik ist die Koloskopie Mittel der Wahl mit einer hohen Sensitivität und Spezifität bei korrekter Durchführung und der Möglichkeit einer therapeutischen Intervention. Bei Entdeckung von Polypen im Rahmen von Darmkrebs-Screeningverfahren (z.B. okkultes Bluttest, Sigmoidoskopien) soll gemäß der S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ eine vollständige Koloskopie erfolgen, um alle Läsionen zu entdecken [83]. Alle neoplastischen Polypen sollen dann mittels Polypektomie oder Mukosaresektion komplett entfernt werden, welches die Karzinominzidenz deutlich senkt [101]. Als Grundlage für die Festsetzung von post-

Polypektomie Kontrolluntersuchungen dient u.a. die Einteilung der Adenome gemäß dem „Low-Risk/ High-Risk-Adenom-Konzept“:

„Low-Risk-Adenom-Situation“: 1 - 2 Adenome unter 1 cm Größe mit einer „low grade“ intraepithelialen Neoplasie. Das Nachsorgeintervall beträgt hier 5 Jahre.

„High-Risk-Adenom-Situation“: 3 - 10 Adenome/ mindestens 1 Adenom \geq 1 cm/ villöse Adenomhistologie oder mind. 1 Adenom mit „high grade intraepithelialer Neoplasie. Vorausgesetzt es liegt eine komplette Resektion vor, dann beträgt das Nachsorgeintervall hier 3 Jahre. Bei unauffälliger erster Kontrolle erweitert sich das Intervall auf 5 Jahre.

Bei Polypen mit histologisch nachgewiesener beginnender karzinomatöser Infiltration der Lamina muscularis mucosae (pT1-Karzinome) kann von einer onkologisch-chirurgischen Komplett- Resektion abgesehen werden, wenn

- der Polyp restlos entfernt worden ist,
- der Resektionsrand nicht involviert ist (R0),
- das Karzinom gut bis mäßig differenziert ist (G1, G2) und
- kein Hinweis auf eine Gefäß- und/oder Lymphinvasion besteht (L0).

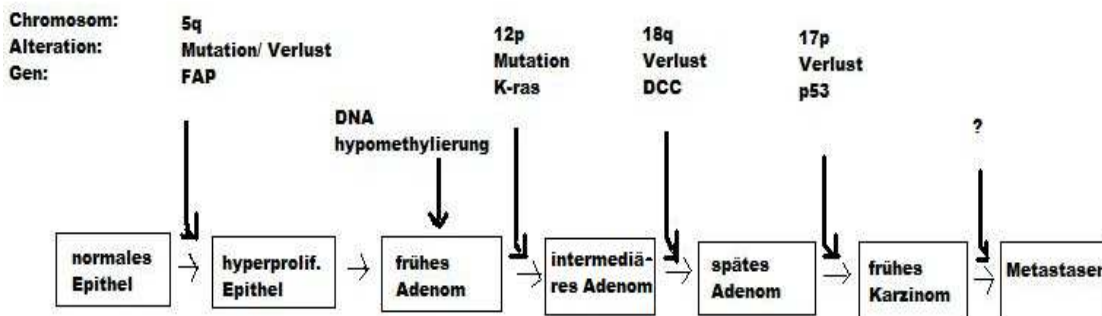
Wenn eine vollständige Resektion gesichert ist, soll eine endoskopisch lokale Nachsorge bei diesen Risikopatienten nach 6 Monaten und nach 2 Jahren geschehen.

Die Risikostratifizierung ist prognoserelevant, sie korreliert mit dem Auftreten von metachronen Adenomen. Da auch eine Koloskopie als invasive Methode ein gewisses Risiko birgt, ist die genaue Malignitätseinschätzung zur optimalen Planung der Therapie- und Nachkontrollen essentiell.

1. 1. 3 Molekulare Veränderungen: Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Pathogenese des Kolonkarzinoms wurde als erstes durch das „Vogelstein Modell“ erklärt. Abbildung 2 zeigt **die Adenom-Karzinom-Sequenz**, ein von Fearon und Vogelstein (1990) entwickeltes Modell, das sequenzielle genetische Ereignisse bei der Entwicklung eines Kolonkarzinoms aus einem Adenom beschreibt [23].

Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz (nachgebildet nach Fearon und Vogelstein, 1990)
 Mutation oder Verlust des FAP-Gens führt zu Defiziten der Zelladhäsion und des Zytoskeletts mit nachfolgender Hyperproliferation des Epithels. DNA-Hypomethylierungen fördern mitotische Non-Dysjunctions und zusätzlich genomische Instabilität. Dauerhafte Stimulation von Wachstumssignalen entstehen durch K-ras Mutationen. Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen werden durch Alterationen am DCC Genlocus (deleted in colorectal cancer) verursacht. Als spätes Ereignis gilt eine inaktivierende Mutation des p53-Gens mit entscheidender Beeinträchtigung der Zellintegrität.



Seitdem wurden eine Vielzahl an Tumorsuppressorgenen wie DPC4, MADR2 (18q), DNA Reparaturgenen und Genereignissen wie Deletionen auf Chromosomen 1q, 4p, 6p, 8p, 9q und 22q charakterisiert, die auch an der Karzinogenese beteiligt zu sein scheinen [56].

Wichtigste Veränderungen sind solche in sog. „Regulatorgenen“ des Zellzyklus, am bedeutendsten sind Onkogene und Tumorsuppressorgene.

Das p53-Tumorsuppressorgen, benannt nach dem Molekulargewicht seines Proteinprodukts, ist aufgrund seiner Beteiligung an drei grundsätzlichen Mechanismen, die den Organismus vor zellulären Schäden und Störungen schützen, das bisher wichtigste bekannte Tumorsuppressorgen. Es ist an der Zellzykluskontrolle, an der Apoptose und an der Erhaltung der genetischen Stabilität beteiligt. p53 wird bei DNA-Schäden einer Zelle aktiviert und initiiert mit seiner DNA-Bindungsdomäne die Transkription von Proteinen. Diese arretieren den Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase der Zelle, um einen Reparaturmechanismus vor der Replikation zu ermöglichen. Ist der Zellschaden irreparabel, so leitet p53 den programmierten Zelltod ein. So wird verhindert, dass Genominstabilitäten in Tochterzellen übertragen werden und Mutationen begünstigen. Der Funktionsverlust dieses Gens ist somit für jede Tumorentwicklung von zentraler Bedeutung. Deshalb ist p53 in fast der Hälfte aller

Krebserkrankungen inaktiviert [35]. Bei Kolonkarzinomen liegt in 50 bis 75 % der Fälle ein p53- Funktionsverlust vor, in Adenomen ist die Häufigkeit geringer [23, 98].

Der Mechanismus eines Funktionsverlustes ist häufig eine Punktmutation auf einem Allel, gepaart mit einer Deletion des anderen Allels [5, 48] (LOH, loss of heterozygosity). Häufig finden sich auch p53-Mutanten, die dominant negative Effekte auf die Wildtyp p53-Proteine ausüben, so dass die Mutation eines Allels ausreicht um eine p53-Dysfunktion zu erreichen [37, 99]. In einigen Studien hat sich eine p53- Alteration in Kolonkarzinomen als Marker für ein ungünstiges Tumorstaging- und grading herausgestellt [17, 60, 63].

1. 2 Praktische Bedeutung und Fragestellung

Obwohl fast alle Karzinome aus Adenomen entstehen, gehen weniger als 10 % der Adenome in Karzinome über [52]. Die Herausforderung ist es, die Gene zu finden, die bei einer Veränderung den Adenomen ein hohes Risiko verleihen, maligne zu entarten.

Bisher konzentrierten sich daher Versuche darauf, die Rolle von p53-Alterationen in Kolonadenomen in solch prognostischer Hinsicht zu erfassen. Nach Vogelstein sind „high grade“ Adenome häufiger p53-verändert als „low grade“ Adenome. In der Forschung gibt es dafür Hinweise wie auch für eine Abhängigkeit des Malignitätspotenzials von Histologie, Adenomgröße und Alter sowohl Tumorlokalisation als auch Nachbarschaft zum Karzinom (siehe Abschnitt 4).

Es stellt sich die Frage, ob diese ungünstigen klinisch-pathologischen Größen auch mit dem Vorkommen von p53-Alterationen positiv korrelieren. Gibt es in der Praxis Anhaltspunkte dafür, dass p53-veränderte Adenome maligner sind als unveränderte? Kann die p53-Bestimmung bei der Adenombeurteilung helfen? Würde sich eine solche Annahme bewahrheiten, gäbe es einen verlässlichen Marker zur Objektivierung des bisher nur subjektiv eingeschätzten Malignitätspotenzials von Kolonadenomen.

Eine eindeutige Studienlage bezüglich des Zusammenhangs zwischen p53 und klinisch-pathologischen Parametern fehlt noch, oft auch durch geringe Fallzahlen der Untersuchungen bedingt.

Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit in einer systematische Analyse von p53-Alterationen auf Proteinebene, d. h. mittels immunohistochemischer Methoden und auf DNA Ebene, in Form einer DNA-Sequenzierung, p53 im Detail untersucht und in

einer grossen Serie von Adenomen mit oben genannten pathologischen Prognoseparametern korreliert werden.

Um die Aggressivität der Adenome messen zu können, wurde das nukleare Protein Ki-67 als Surrogatmarker immunhistochemisch untersucht. Dieses Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, G2-, S- und M-Phase) exprimiert und beim Übergang in nicht proliferative Phasen (G0) schnell wieder abgebaut [27]. Der Nachweis Ki-67 positiver Zellen ist in vielen Tumorarten prognoserelevant und sollte auch in dieser Arbeit zur Quantifizierung der Proliferationsaktivität in Neoplasien dienen.

Für eine repräsentative Studie ist eine standardisierte Untersuchung mit möglichst hohen Fallzahlen wichtig. Zudem ist wünschenswert, dass diese Untersuchung unter nicht zu großem Zeit- und Materialverlust, aber dennoch effektiv abläuft. Um solche optimalen Bedingungen zu gewährleisten, wurde die vorliegende Studie in Form eines Tissue Microarrays (TMA) durchgeführt. Diese Gewebearraytechnik ist eine moderne Methode, die eine Untersuchung von bis zu 1000 verschiedenen Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger erlaubt [49, 84]. Auf TMA-Schnitten können alle Arten von In-situ-Methoden angewendet werden. Außerdem ist eine maximale Standardisierung dieser Studie dadurch gewährleistet, dass alle Analysen bei identischen Temperaturen, Inkubationszeiten und mit denselben Reagenzien stattfinden.

1. 3 Ziele der vorliegenden Arbeit:

- Bestimmung der Häufigkeit an immunhistochemisch messbarer p53-Proteinakkumulation in Kolonadenomen
- Bestimmung der p53-Mutationshäufigkeit in Kolonadenomen
- Analyse der p53-Ergebnisse in Bezug auf Tumorzellproliferation (Ki-67 LI) und klinisch-pathologische Parameter

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumorkollektiv

Zur Verfügung standen Tumoren, die von Januar 1995 bis Mai 2007 durch Biopsie, Mukosektomie oder aus Operationspräparaten gewonnen, im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht und archiviert wurden. Eingeschlossen in die Studie wurden 227 als „Adenom“ des Kolon diagnostizierte Tumoren von 163 Patienten. Die Adenome lagen in Form von formalinfixierten Paraffinblöcken vor, von denen in Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbte, 4 µm dünne Schnitte zur histologischen Begutachtung angefertigt worden waren. Bei dieser Begutachtung wurde der Atypiegrad der Gewebe von einem Pathologen befundet und die zu untersuchenden Areale für die TMA-Herstellung markiert. Mithilfe von entsprechenden Pathologieberichten des Instituts konnten folgende weitere Befunde dokumentiert werden: Wachstumsmuster, Tumorgröße, Tumorlokalisation, sowie Vorhandensein eines Karzinoms im gleichen Präparat.

Hyperplastische Polypen, serratierte Adenome, Adenome nicht sporadischer Genese (Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, FAP, HNPCC, etc.) und Adenome mit einer Größe kleiner als 0,5 cm waren Ausschlusskriterien.

2.2 TMA- Herstellung

Die Tissue-Microarray-Methode erlaubt es bis zu 1000 Gewebszylinder (Durchmesser 0,6 mm) aus histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einen einzigen Paraffinblock einzubringen. Abbildung 3 zeigt den Vorgang der TMA Herstellung.

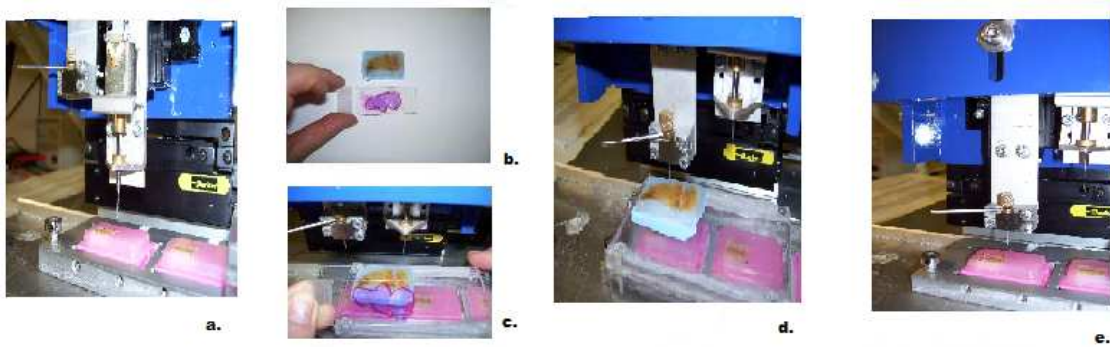
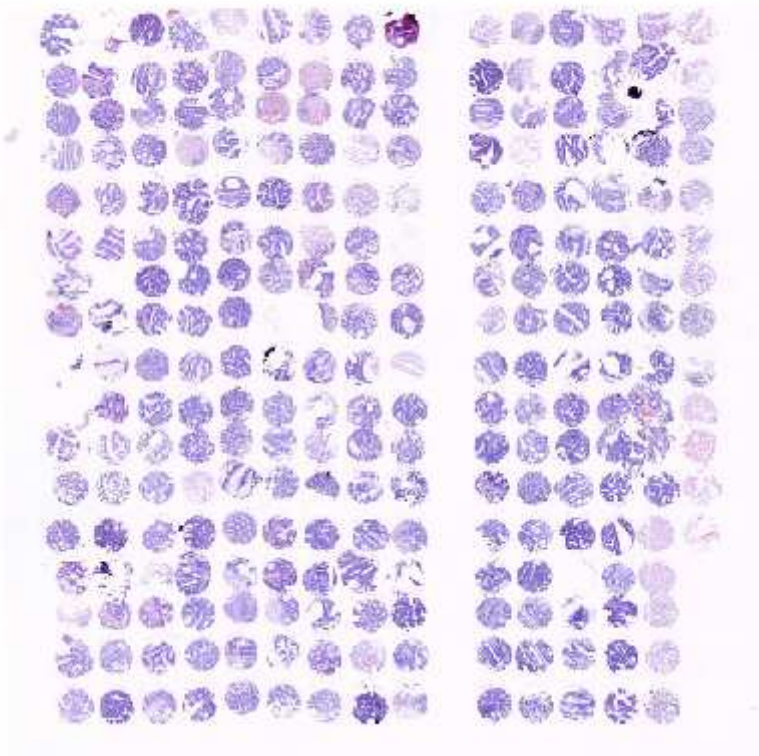


Abbildung 3: TMA-Herstellung. Das Gewebearray-Stanzgerät (unten) ist ein Präzisionsgerät, in dem ein an der Spitze geschärfter Hohlzylinder (innerer Durchmesser 0,6 mm) und einen 0,6 mm durchmessender Bohrer gehalten werden. Zunächst wird für jede Stanze in einen Empfängerblock ein Kanal gebohrt (a). Dann wird das zu entnehmende Areal auf einem HE-Schnitt genau lokalisiert (b,c). Aus dem jeweiligen Spenderblock („donor“) wird die markierte Gewebeprobe entnommen (d). Die entnommene Stanze wird nun in den Empfängerblock eingebracht (e), beim Ausstoßen hilft ein im Hohlzylinder befindlicher Stahldraht. Ein verstellbarer Eindring- Stopper garantiert eine konstante Länge von Gewebeproben und vorgefertigten Löchern.



So können eine große Anzahl von verschiedenen Gewebeproben auf einem 25 x 45 mm großen Paraffinblock eingebracht und von diesem bis zu 300 TMA „Slides“ für molekularbiologische Untersuchungen angefertigt werden. Abbildung 4 zeigt einen H&E-gefärbten Schnitt eines fertig hergestellten TMAs.

Abbildung 4: Tissue-Microarray (TMA)



2. 3 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen des p53 und des Ki-67 Antigens wurden hochaffine monoklonale Mausantikörper verwendet, die sich in der diagnostischen Histopathologie für die Verwendung bei In-vitro-Untersuchungen bewährt haben. Die Analyse wurde mit der standardisierten indirekten Immunoperoxidase-Methode unter Verwendung des DAKO Envision-Detection-System durchgeführt. 4 µm dünne Schnitte des TMA-Paraffinblocks wurden in absteigender Alkoholreihe entparaffiniert, anschließend zur Epitopfreilegung in verschiedenen Demaskierungspuffern hitzebehandelt. Die Art der Vorbehandlung, verwendeten Puffer sowie Hersteller der verwendeten Antikörper sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die nachfolgende Behandlung erfolgte im DAKO Immunfärbeautomaten (DAKO Autostainer). Für optimale Ergebnisse wurde für 20 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung inkubiert. Anschließend folgte eine 25-minütige Behandlung mit EnVision™-Reagenz, einer Peroxidase-gekoppelten Polymerstruktur, welche den Sekundärantikörper enthielt. Als Chromogen kam

Diaminobenzidin (DAB) für 10 Min zur Anwendung. Für Spülzwischenritte wurde Tris-HCL (pH 7,4 - 7,6, DAKO) verwendet. Um eine nukleare Blaufärbung zu erhalten, wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurde der Schnitt in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt® eingedeckelt.

Tabelle 1: verwendete Antikörper, deren Vorbehandlung und Hersteller

Protein	Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
p53	DO-1	Oncogene, Boston, MA, USA	1 : 2000	Mikrowelle 100°C/ 20 min TEC-Puffer (pH 7,8)
Ki-67	MIB-1	DAKO, Glostrup Dänemark	1 : 400	Mikrowelle 100°C/ 20 min Target Retrieval Solution™ (pH 9)

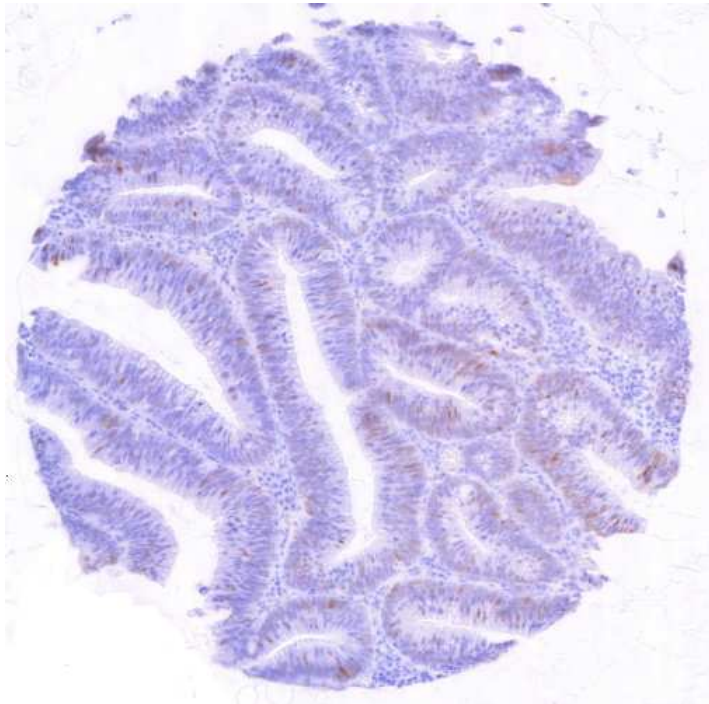
Für die Bewertung der p53-Färbung wurde in jedem Spot die Zahl der angefärbten Tumorzellen in Prozent bestimmt und die Färbintensität (FI) entsprechend einer semiquantitativen Skala von 0 bis 3 eingestuft. Die Färbung wurde nach festgelegten Kriterien bewertet:

- negativ FI 0
- schwach FI 1 in $\leq 70\%$ der Zellen oder FI 2 in $\leq 30\%$ der Zellen
- mittel FI 1 in $> 70\%$ oder FI 2 in $> 30\%$ und $\leq 70\%$ oder FI 3 in $\leq 30\%$
- Stark FI 2 in $> 70\%$ der Zellen oder FI 3 in $> 30\%$

Für Ki-67 wurde der Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen je Spot (Ki-67 Labeling Index; Ki-67 LI) bestimmt.

Beispiele für positive immunhistochemische Befunde sind in Abbildung 5 und 6.

Abbildung 5: Nukleare p53 Akkumulation in Adenomen mit schwacher (A) und starker Ausprägung (B)

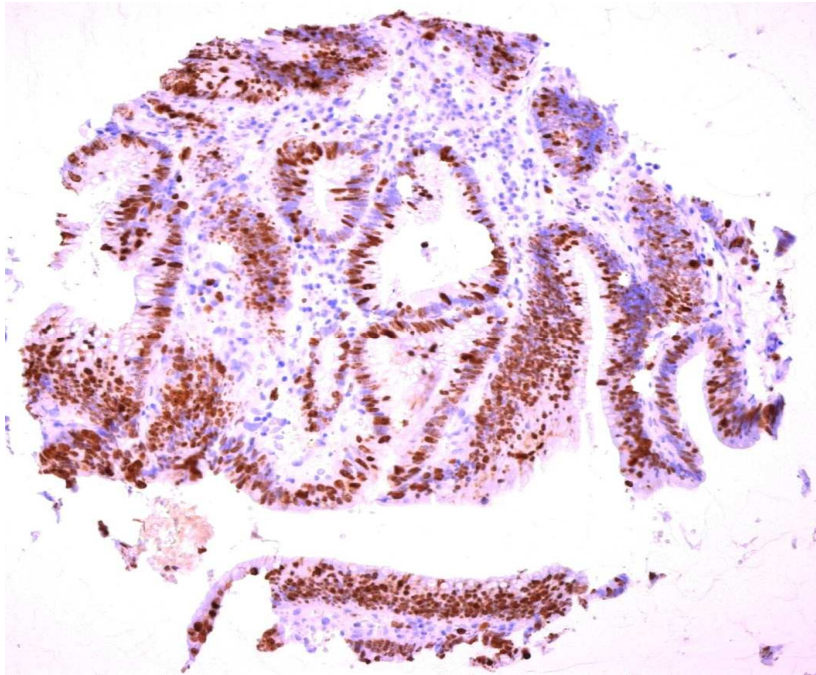


A



B

Abbildung 6: Ki-67 Expression eines Adenoms (Ki-67 LI ca. 60 %)



2. 4 Mutationsanalyse

2. 4. 1 Isolation genomischer DNA aus Gewebe

Gewebeareale mit geeignet hohem Tumoranteil ($\geq 70\%$) wurden am HE-Schnitt identifiziert. Aus diesem Areal im korrespondierenden Gewebeblock wurde eine 0,6 mm Stanze entnommen, entparaffiniert und mit Ethanol (100%) dehydriert. Nach einer 15-minütigen Trocknungsphase bei 37°C wurde das Gewebe mit 20 μ l Proteinase K (QIAGEN) und 180 μ l ATL Buffer (Lysepuffer, QIAGEN) überschichtet und bei 56° C über Nacht verdaut.

Die DNA Extraktion erfolgte mittels QIAmp® DNA Micro Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellervorschrift. Kurz beschrieben: Das Gewebe wird, wie oben beschrieben, verdaut. Die lysierte Probe wird auf eine Säule (QIAamp MinElute column) mit einer Silikongelmembran überführt. Die DNA im Gewebelysat bindet an die Membran. Mehrmaliges Waschen der Säule mit AW1 und AW2 Buffer (Waschpuffer) des Kits

wäscht Verunreinigungen aus, während die DNA an der Säule haften bleibt. Die gereinigte DNA wird mit Aqua dest. von der Membran gelöst (eluiert).

Die Bestimmung der Quantität und Qualität der DNA erfolgte durch Messungen am Nanodrop Spektrophotometer (PeqLab). Die aus den Eluat gewonnenen reinen DNA Proben wurden in verdünnter Form aliquotiert und bis zur Verwendung für die Polymerasen-Ketten-Reaktion kurzzeitig bei 4° C gelagert.

2. 4. 2 Polymerasenketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Standardmethode zur Vervielfältigung bekannter Nukleinsäuresequenzen der DNA für weitere Mutationsanalyse [71, 72]. Da die meisten Mutationen des p53-Gens in den Exons 5 bis 8 auftreten, wurden gezielt diese Exons amplifiziert. Die PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 25 µl nach folgendem Schema:

Tabelle 2: Verwendete Komponenten und Hersteller

Komponenten(Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Aqua dest. (Merck)		18,5 µl
PCR-Puffer: MgCl ₂ (Applied Biosystems)	15 mM	2,5 µl
Primer F und R (MWG Biotech AG)	je 2,5 pmol/µl	1µl
dNTPs: dATP,dGTP,dCTP,dTTP (Promega)	je100 mM	2µl
Amply Taq Gold (Applied Biosystems)	5 U/µl	0,2µl
DNA	50ng/µl	1 µl

Die verwendeten Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg) waren Oligonukleotide mit folgender Sequenz:

Tabelle 3: Primersequenz

Name	5` -> 3`	Produktgröße
Exon 5 Forward	CACTTGTGCCCTGACTTTCAAC	268 bp
Exon 5 Reverse	CAACCAGCCCTGTCGTCTCTC	
Exon 6 Forward	TCCCCAGGCCTCTGATTCTT	190 bp
Exon 6 Reverse	CCTTAACCCCTCCTCCCAGA	
Exon 7 Forward	GCCTCATCTTGGGCCTGTGTTATC	203 bp
Exon 7 Reverse	TCAGAGGCAAGCAGAGGCTG	
Exon 8 Forward	CTGATTTCTTACTGCCTCTTGC	216 bp
Exon 8 Reverse	TCTCCTCCACCGCTTCTTGTC	

Die nahezu exponentielle Vervielfältigung der Ausgangs-DNA erfolgte im Thermocycler von Eppendorf® (Tabelle 4):

Tabelle 4: PCR- Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Denaturierung	95° C	10 min	1
2. Denaturierung	95°C	15 sec	
3. Annealing	58°C	10 sec	
4. Elongation	72°C	20 sec	59
5. Termination	72°C	4 min	1
Aufbewahrung	4°C	∞	

Die PCR ist empfindlich gegenüber Verunreinigungen. Auch Fremd-DNA wird amplifiziert und kann so zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurden daher für jeden Amplifikationsansatz zwei Negativkontrollen angesetzt, welche anstatt der DNA nach obigem Schema ein äquivalentes Volumen an Aqua dest. enthielten.

Zur Beurteilung von Qualität und Ausbeute der PCR wurde eine Elektrophorese auf einem 1,7 %igem Agarose-Gel durchgeführt, welches mit 5 µl Ethidiumbromid (Amersham Biosciences) versetzt war. 7 µl jedes PCR-Produktes wurden mit 1 µl Loading dye solution (Ladepuffer, Fermentas) aufs Gel pipettiert. Als Längenstandard wurde 1µl 50 bp DNA Ladder (Fermentas) mit 6 µl Aqua dest. und 1 µl des Ladepuffers

aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA). Die Agarosegelelektrophorese erfolgte für ca. 30 Minuten bei 100 Volt in einer Elektrophoresekammer (peqlab Biotechnologies). Mithilfe eines UV-Transilluminators wurde anschliessend das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid im Fluoreszenzlicht angeregt und das PCR-Produkt visualisiert. Das Ergebnis wurde mit dem Gel-Dokumentations-Kamerasystem Devison DBox (Decon DC Science TEC) erfasst.

2. 4. 3 DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* wurde unter Anwendung des BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt [64, 78].

Um überschüssige Nukleotide und Primer zu eliminieren, wurde jedes PCR-Produkt vor der Sequenzierung mit ExoSAP-IT® (USB, Ohio) für 30 Minuten bei 37 °C und 15 Minuten bei 80 °C inkubiert.

Die Sequenzierreaktion durchlief nach Zugabe des BigDyes®, das bereits eine AmpliTaq Polymerase, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenz-markierten Didesoxy-Analoga enthält, im Thermocycler (Eppendorf®) folgendes Programm:

Tabelle 5: Sequenzierungsprogramm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. initiale Denaturierung	96°C	4 min	1
2. Denaturierung	96°C	10 sec	35
3. Annealing	50°C	10 sec	
4. Extension	60°C	2 min	
Aufbewahrung	4°C	∞	

Anschließend wurden die Proben mit 17 µl NaCl (3M), 170 µl Aqua dest. und 500 µl Ethanol (100%) gefällt und nach Formamidbehandlung als Lösungs- und Denaturierungsmedium mit dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert und mit zugehöriger Software ausgewertet.

2. 5 Statistik

Der Chi-square und der Fisher`s Exact Test wurde verwendet, um die Häufigkeit der nuklearen p53-Akkumulation und p53-Mutationen mit klinisch-pathologischen Parametern in Beziehung zu setzen. Für Vergleiche von Ki-67 Mittelwerten wurden zwischen Gruppen Varianzanalysen durchgeführt. Dabei kam das JMP Statistikprogramm (SAS Institute Inc.) zur Anwendung.

3. Resultate

Es wurden 227 Adenome (89 tubuläre, 10 villöse, 126 tubulovillöse Adenome) von 163 Patienten untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 68 Jahren (38 - 87 Jahren). Von den 227 Adenomen waren 144 „low grade“ und 83 „high grade“ intraepitheliale Neoplasien. Bei 83 Adenomen von 57 Patienten wurde gleichzeitig ein Kolonkarzinom (in einem Fall zwei synchrone Karzinome) diagnostiziert. 23 dieser Adenome waren „high grade“ intraepitheliale Neoplasien, die später ein Karzinom entwickelt haben.

Die Durchschnittgröße der Adenome betrug 1,6 cm (0,5 - 8 cm). 45 Adenome waren im rechten Kolon (Zäkum, Colon ascendens), 15 im Colon transversum und 147 im linken Kolon (Colon descendens, Sigma, Rektum) lokalisiert.

3.1 p53-Immunhistochemie der Kolonadenome

Die p53-immunhistochemische Färbung war als granuläre, nukleare Färbung gut zu erkennen. Beispiele für p53-positive Färbungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

Von den 227 ausgewählten Adenomen erwiesen sich 188 (81,7 %) als geeignet für die Analyse, 42 Spots enthielten kein sporadisches Kolonadenomgewebe. 47 % der 188 Adenomgewebe zeigten eine positive Färbung (als positiv wurden die Kategorien schwach, mäßig und stark aus Abschnitt 2.3 zusammengefasst), der Rest war negativ; Die Adenome waren zu 35 % schwach, 5,3 % mäßig und 6,9 % stark angefärbt. Die p53-Immunhistochemie (IHC) im Verhältnis zu Atypiegrad und Histologie, Adenomgröße, Patientenalter als auch Darmlokalisierung der Adenome wird in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: p53-IHC kolorektaler Adenome in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter

p53-IHC						
Tumorphänotyp	*Anzahl analysierbarer Proben	Negativ (%)	Schwach (%)	Mäßig (%)	Stark (%)	p-Wert
Dysplasiegrad						
low grade	116	61,2	35,3	2,6	0,9	< 0,0001
high grade	72	38,9	34,7	9,7	16,7	
Histologie						
tubular	75	68,0	28,0	1,3	2,7	0,0059
tubulovillös	104	41,3	40,4	7,7	10,6	
villös	7	42,9	42,9	14,3	0,0	
Altersgruppen						
< 60 Jahren	33	57,6	36,6	3,0	3,0	0,3075
60 - 80 Jahren	130	53,9	34,6	6,1	5,4	
> 80 Jahren	25	40,0	36,0	4,0	20,0	
Adenomgröße						
< 1cm	54	70,4	25,9	1,9	1,9	0,0220
1-2 cm	87	41,4	40,2	8,1	10,3	
> 2cm	36	44,4	41,7	5,6	8,3	
Lokalisation						
rechtes Kolon	34	73,5	26,5	0,0	0,0	0,0035
Kolon transversum	12	75,0	16,7	0,0	8,3	
linkes Kolon	126	44,4	38,9	7,9	8,7	

*Die Summe der analysierbaren Proben entspricht nicht in allen Fällen der Gesamtzahl (n = 188) aufgrund teilweise fehlender Daten.

Von den 72 „high grade“ Adenomen waren 44 (61,1 %) p53-positiv, darunter 12 (16,7 %) stark. 45 der 116 „low grade“ Adenome (38,8 %) waren positiv angefärbt, wobei hier nur ein Adenom (0,9 %) stark positiv war (Tabelle 6, Abbildung 7).

Bei der Beziehung zwischen der p53-IHC und der Histologie stieg mit zunehmendem Anteil an villöser Adenomstruktur die p53-Positivität an: Die tubulären Adenome sind zu 4 % mäßig und stark positiv, die tubulovillösen zu 18,3 %, die villösen Adenome nur zu 14,3 %, da hier auch n = 7 (p = 0,0059) (Tabelle 6, Abbildung 8) . Betrachtet man diese Beziehung getrennt für die „high grade-“ und „low grade“ Adenome, so scheint dieser Unterschied nur für die „low grade“ Adenome signifikant: 26,7 % der

„low grade“ Adenomen mit tubulärer Histologie waren p53- positiv, 50,9 % der tubulovillösen und 100 % der villösen ($p = 0,0105$) Adenome. Die „high grade“ Adenome mit tubulärer Histologie waren zu 53,3 % positiv, die tubulovillösen zu 67,4 % und die villösen nur zu 50 % ($p = 0,4946$; Anhang 7.1).

Bezüglich des Patientenalters zum Diagnosezeitpunkt zeigten sich ähnliche Verhältnisse: Mit zunehmendem Alter stieg der Anteil an mäßig und stark positiven Adenomen an, statistisch war dies nicht signifikant (Tabelle 6, Abbildung 9).

Die Adenomgröße in Bezug auf die p53-Positivität zeigte einen Unterschied nur beim Übergang der Adenome kleiner als 1cm zu den über 1 cm großen Adenomen ($p = 0,0220$): Die bis 1 cm großen Adenome waren zu 29,6 % positiv, die zwischen 1 und 2 cm zu 58,5 % ($p = 0,0218$ Tabelle 6, Abbildung 10). Dabei ist der Anstieg der mäßigen und starken p53-Positivität von 1,9 % jeweils ($< 1\text{cm}$) auf 8,1 % und 10,3 % (1 - 2 cm) beachtlich. Betrachtet man in dieser Beziehung die „low- und high grade“ Adenome getrennt, so ergab sich ein der Histologie ähnliches Bild: Die „low grade“ intraepithelialen Neoplasien unter 1 cm waren zu 22,2 % p53-positiv, die zwischen 1 und 2 cm großen zu 51,9 % und die über 2 cm großen zu 54,6 % ($p = 0,0056$). Bei den „high grade“ Adenomen gab es keinen signifikanten Unterschied ($< 1\text{ cm}$: 66,7 %; 1 - 2 cm: 68,57 %; $> 2\text{ cm}$: 56,0 % p53-positiv, $p = 0,5986$; Anhang 7.1).

Die meisten Adenome sind im linken Kolon lokalisiert ($n = 126$, $p = 0,0035$). Bezüglich der p53-Positivität zeigt sich ein „Shift“ vom rechten zum linken Kolon: Im rechten Kolon fanden sich wenige schwach p53-positive Adenome (26,7 %), im Kolon transversum waren 25 % positiv, darunter 8,3 % stark, und Adenome im linken Kolon waren zu 55,6 % p53-positiv, darunter 7,9 % mäßig und 8,7 % stark positiv (Tabelle 6, Abbildung 11). Derselbe Trend zeigte sich auch bei separater Betrachtung von „low-“ und „high grade“ Adenomen: „low grade“ (re. Kolon: 25 % pos; K. transversum: 14,3 %; li. Kolon: 45 %; $p = 0,0984$), bei den „high grade“ (re. Kolon: 27,8 %; K. transversum: 40,0 %; li. Kolon: 73,9 %; $p = 0,0020$; Anhang 7.1).

Abbildung 7: p53-IHC in Abhängigkeit vom Adenomatypiegrad – die Abszisse zeigt den Adenomdysplasiegrad an, die Ordinate den prozentualen Anteil der p53-Anfärbung der Adenome am Gesamtkollektiv.

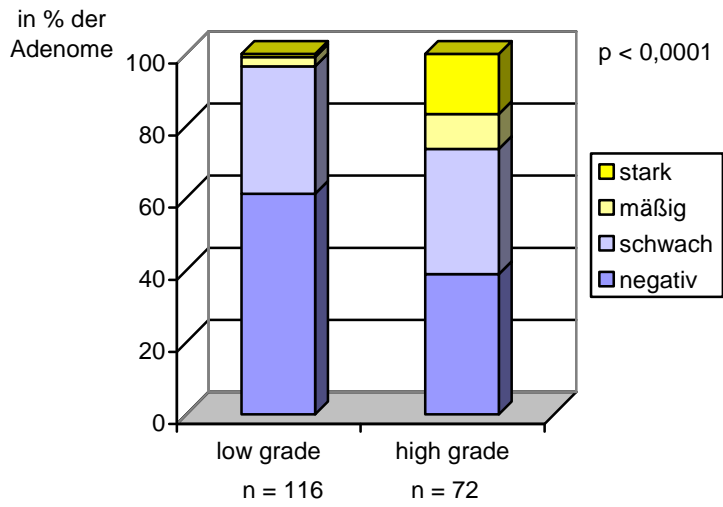


Abbildung 8: p53-IHC in Abhängigkeit von der Adenomhistologie.

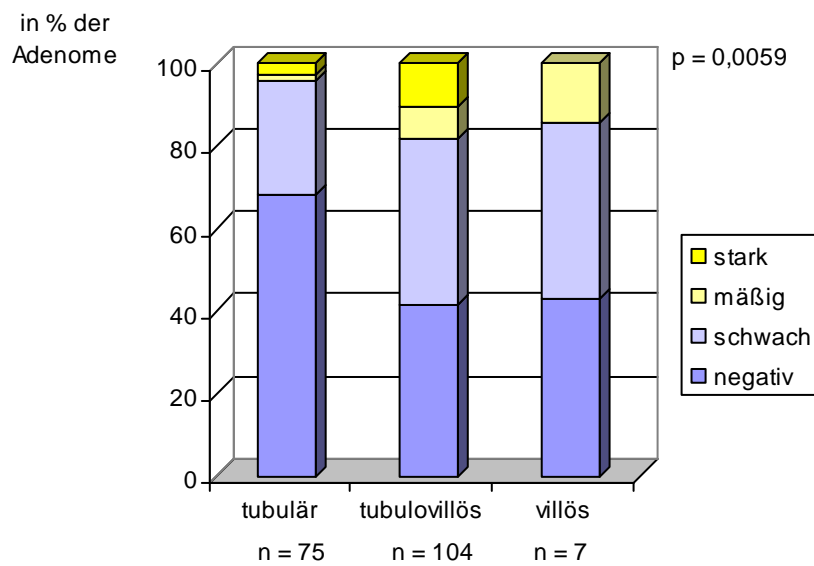


Abbildung 9: p53-IHC in Abhängigkeit vom Patientenalter bei der Diagnosestellung.

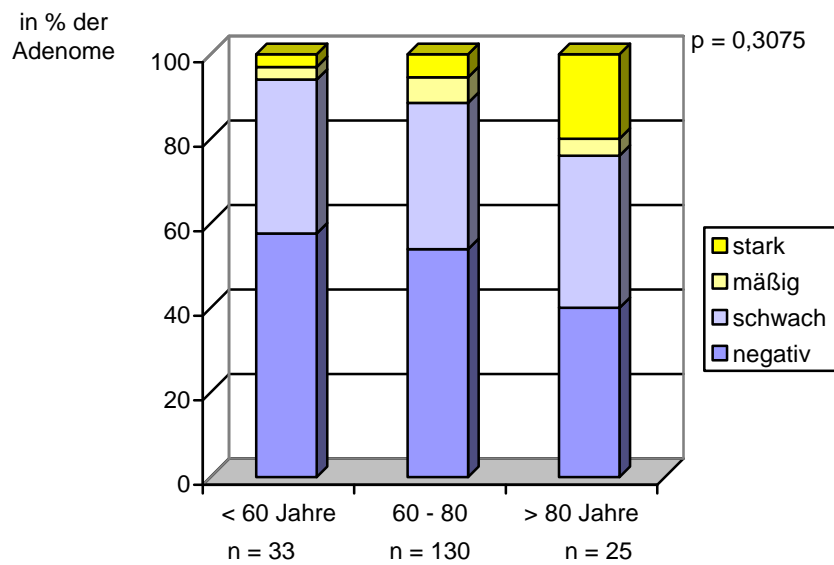


Abbildung 10: p53-IHC in Abhängigkeit von der Adenomgröße.

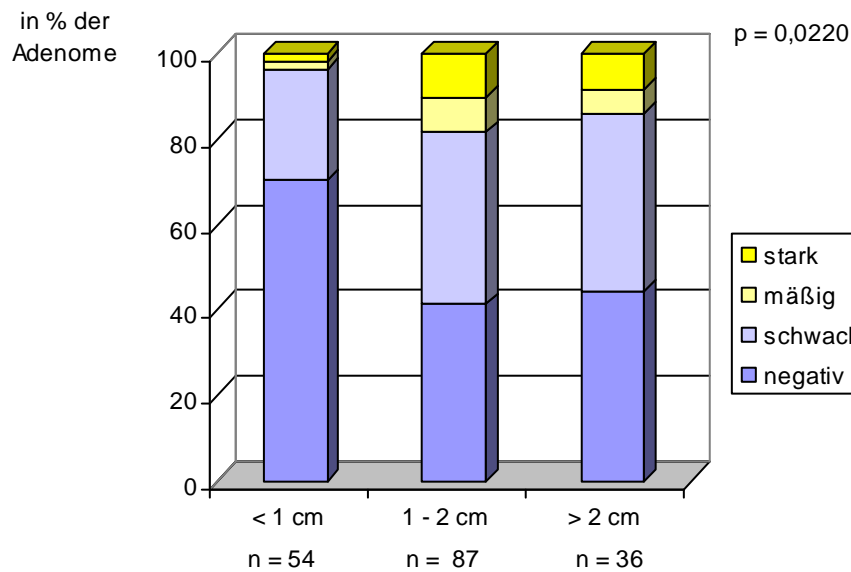
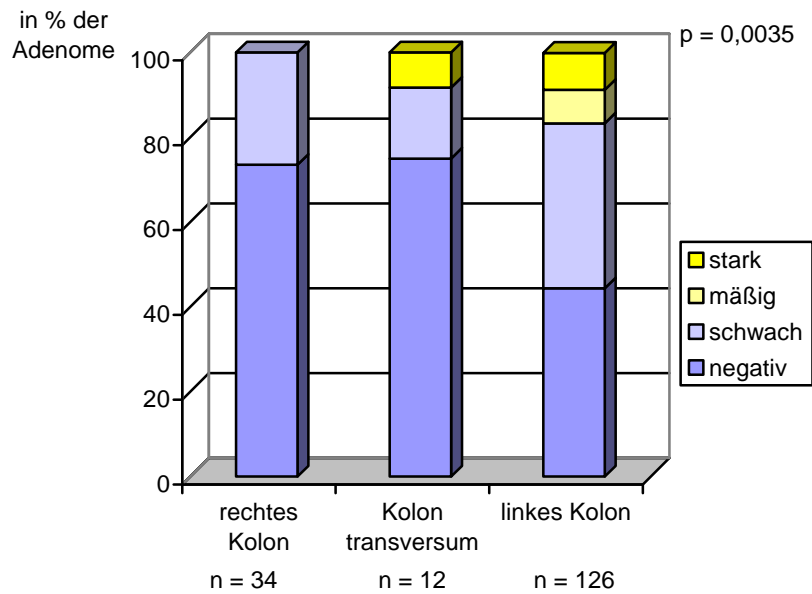


Abbildung 11: p53-IHC in Abhängigkeit von der Adenomlokalisierung.



Wie sich die nukleare p53-Akkumulation in Adenomen von Patienten mit einem gleichzeitig vorhandenen (synchronen) Kolonkarzinom verhält und welche Rolle die Entfernung zum vorhandenen Karzinom spielt, wird in Tabelle 7 und 8 analysiert. Für eine genaue Analyse wurden die verschiedenen Adenomatypiegrade getrennt aufgelistet.

Tabelle 7: p53-IHC in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines synchronen Kolonkarzinoms

		p53-IHC					
Tumorbiologie	Anzahl analysierter Proben	Negativ (%)	Schwach (%)	Mäßig (%)	Stark (%)	p-Wert	
Adenome synchronem Karzinom	mit 66	47,0	34,8	10,6	7,6	0,1253	
Adenome synchrones Karzinom	ohne 122	55,7	35,2	2,5	6,6		

Tabelle 8: p53-IHC in Abhängigkeit von der Nachbarschaft zu einem synchronen Kolonkarzinom

p53-IHC						
Tumorbiologie	Anzahl analysierter Proben	Negativ (%)	Schwach (%)	Mäßig (%)	Stark (%)	p-Wert
*Nachbarschaft zum Karzinom						
Low grade						
Fern	14	57,1	42,9	0,0	0,0	0,0671
Nah	10	90,0	10,0	0,0	0,0	
high grade						
Fern	5	0,0	20,0	80,0	0,0	0,0058
Nah	25	28,0	44,0	8,0	20,0	

* „fern“: >10 cm entfernt vom Karzinom, „nah“: < 10 cm

Ein zu einem Karzinom synchrones Adenom scheint sich hinsichtlich der p53-Positivität dieses Adenoms nicht wesentlich von Adenomen ohne synchrones Karzinom zu unterscheiden ($p = 0,1253$). Betrachtet man die Adenome mit synchronem Karzinom bezüglich der Karzinom-Nähe, so waren bei den „karzinom-nahen“ „high grade“ Adenomen, 5 Fälle stark positiv (20 %), -im Gegensatz zu denen, die „fern“ des Karzinoms lokalisiert waren (0 % stark) ($p = 0,0058$). Die „low grade“ Adenome waren alle schwach p53-positiv. Unter diesen „low grade“ Adenomen waren überraschend 6 der 14 „fernen“ Adenome positiv (42,9 %) und einer der 10 „nahen“ (10 %); dieser Zusammenhang war nicht signifikant ($p = 0,0671$; Abbildung 12 und 13).

Abbildung 12: p53-IHC der Adenome in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines Kolonkarzinoms.

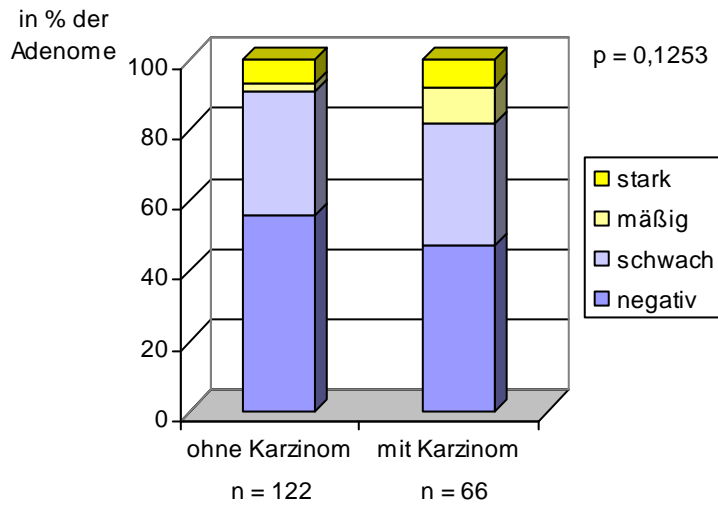
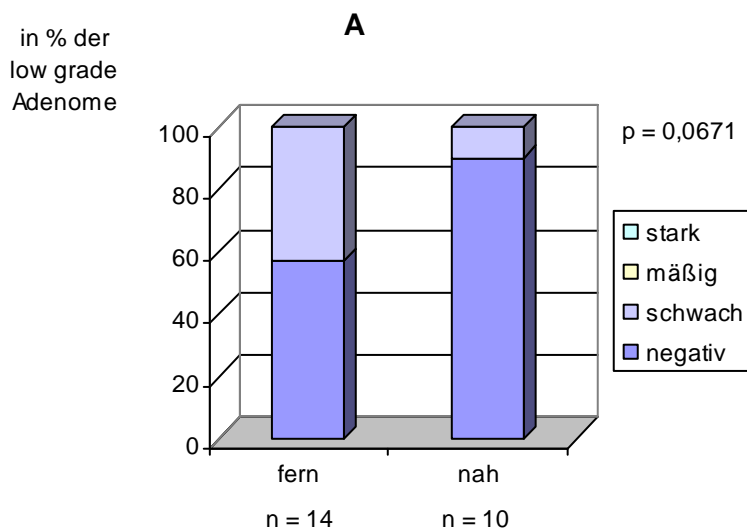
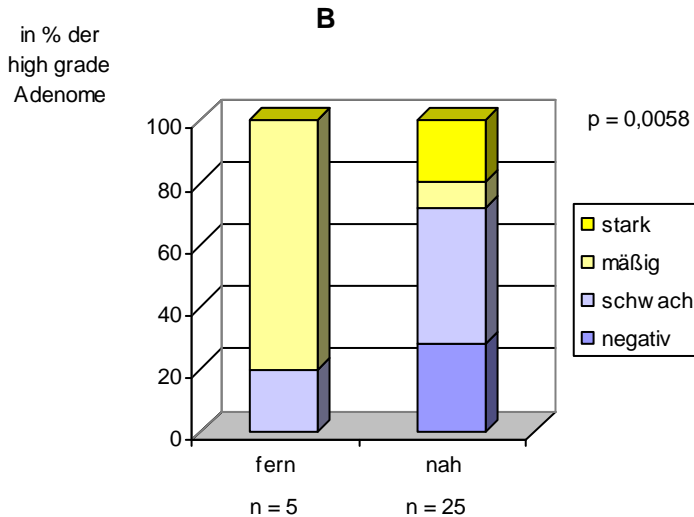


Abbildung 13: Beziehung zwischen der Nachbarschaft zu einem Karzinom und der p53-IHC eines Adenoms bei „low grade“ (A) und „high grade“ Adenomen (B)





3. 2 p53-Mutationsanalyse der Kolonadenome

Von den 227 Adenomen wurden 83 mittels DNA-Sequenzierung auf p53-Mutationen untersucht. Jede Mutation wurde zweifach mit unabhängigen DNA-Proben und PCR reproduziert, um falsch positive Fälle zu vermeiden. Die Adenome wurden nach starker p53-IHC Positivität ausgesucht und dabei eine möglichst gleiche Anzahl an „high grade“ und „low grade“ Adenomen angestrebt. Von 83 Adenomen waren insgesamt 16 (19 %) mutiert und 67 (81 %) entsprachen dem Wildtyp. 15 der mutierten Proben waren Basenpaarsubstitutionen (Missense-Mutationen) und eine stille Mutation (silent Mutation) (Tabelle 9). Daten der Mutationsanalyse in Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse der mutierten Adenome

p53-Mutationen							
Fallnr.	Codon	Exon	Austausch	Aminosäure	Resultat	Diagnose	IHC
11	244	7	GGC->AGC	Gly ->Ser	missense	low grade	negativ
28	245	7	GGC->AGC	Gly ->Ser	missense	high grade	mäßig
31	141	5	TGC->TGG	Cys -> Trp	missense	high grade	schwach
35	273	8	CGT->TGT	Arg -> Cys	missense	high grade	stark
40	285	8	GAG->AAG	Glu -> Lys	missense	high grade	stark
42	141	5	TGC->TGT	Cys-> Cys	silent	high grade	stark
49	266	8	GGA->AGA	Gly -> Arg	missense	high grade	stark
50	245	7	GGC->AGC	Gly -> Ser	missense	high grade	mäßig
51	173	5	GTG->TTG	Val -> Leu	missense	low grade	stark
52	245	7	GGC->AGC	Gly -> Ser	missense	high grade	stark
54	272	8	GTG->ATG	Val -> Met	missense	high grade	stark
56	152	5	CCG->CTG	Pro -> Leu	missense	high grade	stark
57	248	7	CGG->CCG	Arg -> Pro	missense	high grade	stark
67	152	5	CCG->CTG	Pro -> Leu	missense	low grade	negativ
70	239	7	AAC->GAC	Asn -> Asp	missense	low grade	schwach
85	213	6	CGA->CAA	Arg -> Gln	missense	high grade	stark

Tabelle 10: p53-Mutationen in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter

p53-Mutationen				
Tumorphänotyp	Anzahl analysierbarer Proben	Mutationen (n)	Mutationen (%)	p-Wert
Dysplasiegrad				
high grade	43	12	27,9	0,0349
low grade	40	4	10	
Histologie				
tubular	26	4	15,4	0,3087
tubulovillös	54	12	22,6	
villös	4	0	0,0	
Altersgruppen				
< 60 Jahren	13	1	7,7	0,0954
60 - 80 Jahren	58	10	17,2	
> 80 Jahren	12	5	41,7	
Adenomgröße				
< 1cm	18	2	11,1	0,3104
1 - 2 cm	41	11	26,8	
> 2cm	19	3	15,8	
Lokalisation				
rechtes Kolon	12	0	0	0,0633
Kolon transversum	3	1	33,3	
linkes Kolon	62	13	21,0	

Diese Ergebnisse sind ähnlich den Resultaten der immunhistochemischen Untersuchung. Auch hier lassen sich wesentlich mehr p53-Alterationen bei den „high grade“ als bei den „low grade“ Adenomen finden (27,7 % vs. 10 %; $p = 0,0349$, Tabelle 10). Zudem nimmt die p53-Mutationshäufigkeit der Adenome mit steigendem Patientenalter zu. Ebenso bestätigen die Daten zu Histologie und Adenomgröße in Bezug auf Mutationen die immunhistochemischen Ergebnisse. Auffällig ist der Unterschied zwischen den unter 1 cm großen und den über 1 cm großen Adenomen.

Nur die Korrelation von p53-Mutationen mit der Darmlokalisierung weist den in der Immunhistologie beobachteten Trend nicht auf. Trotzdem ist zu beobachten, dass wesentlich mehr Adenome der linken Kolonhälfte mutiert waren als von der rechten (0

% vs. 21 %). Von den 3 im Colon transversum gelegenen Adenomen wies nur eines eine Mutation auf.

Diese Ergebnisse erreichten aufgrund der geringen Probenzahl keine statistische Signifikanz ($p = 0,0633$). Deshalb wurde darauf verzichtet, zusätzlich eine Analyse getrennt für die einzelnen Atypiegrade darzustellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 bis 18 präsentiert.

Abbildung 14: p53-Mutationsvorkommen in Abhängigkeit vom Adenomatypiegrad- die Abszisse zeigt den Atypiegrad an, die Ordinate den prozentualen Anteil der Mutationshäufigkeit der Adenome am untersuchten Kollektiv.

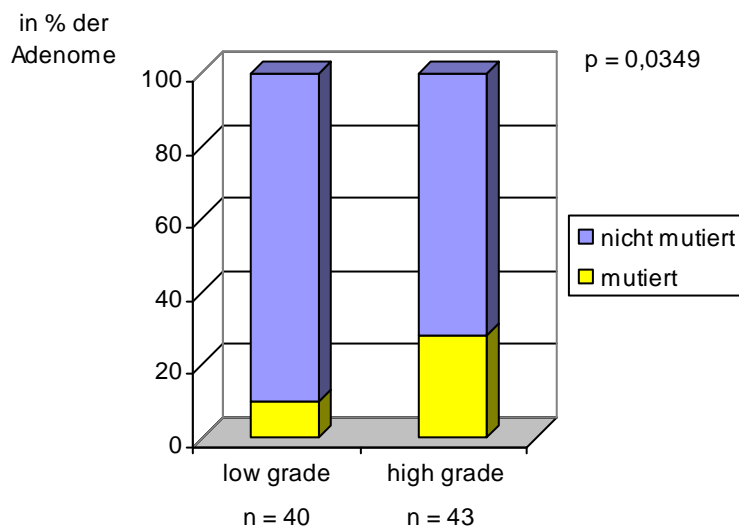


Abbildung 15: p53-Mutationsvorkommen in Abhängigkeit von der Adenomhistologie.

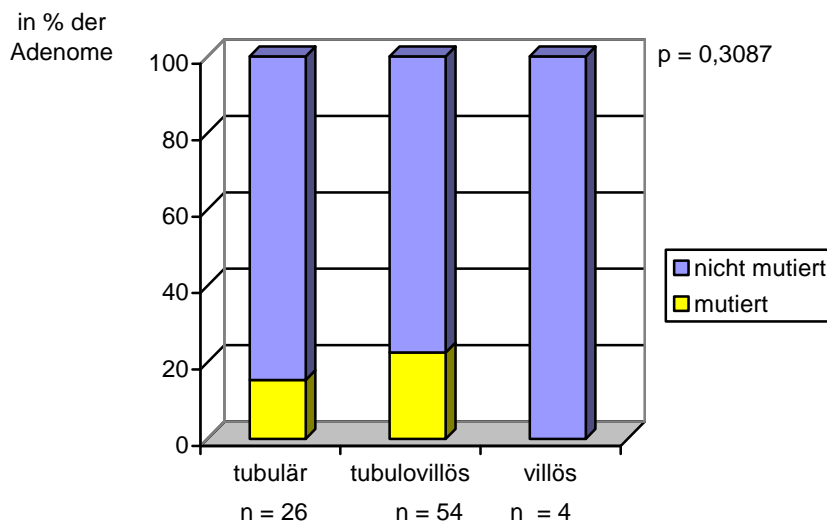


Abbildung 16: p53-Mutationsvorkommen in Abhängigkeit vom Patientenalter.

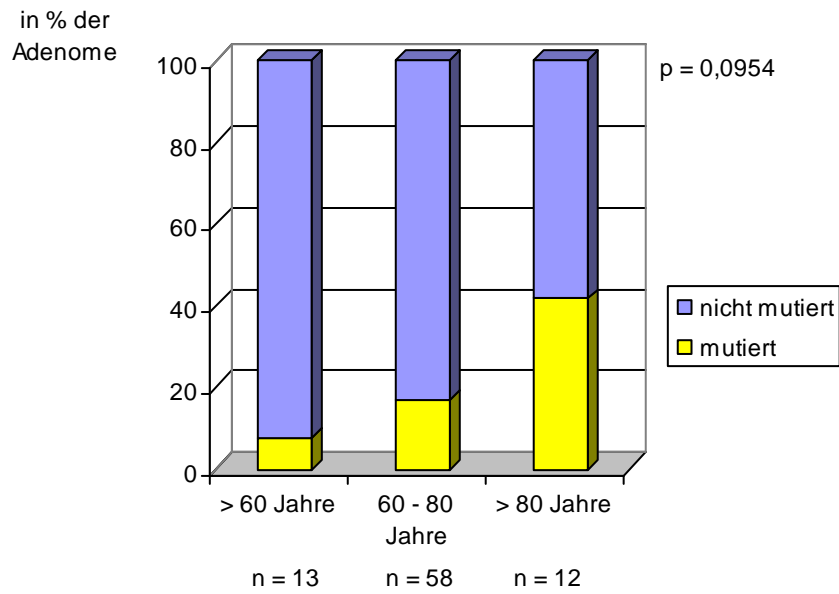


Abbildung 17: p53-Mutationsvorkommen in Abhängigkeit von der Adenomgröße.

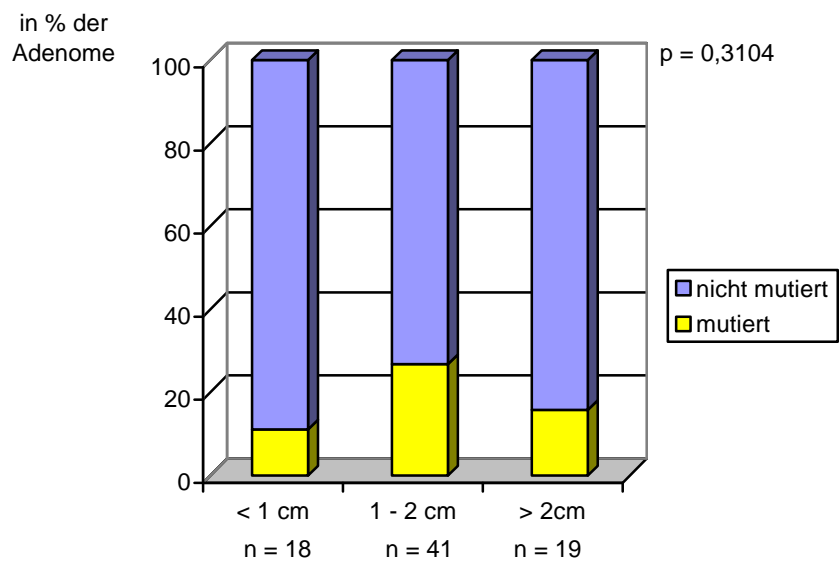
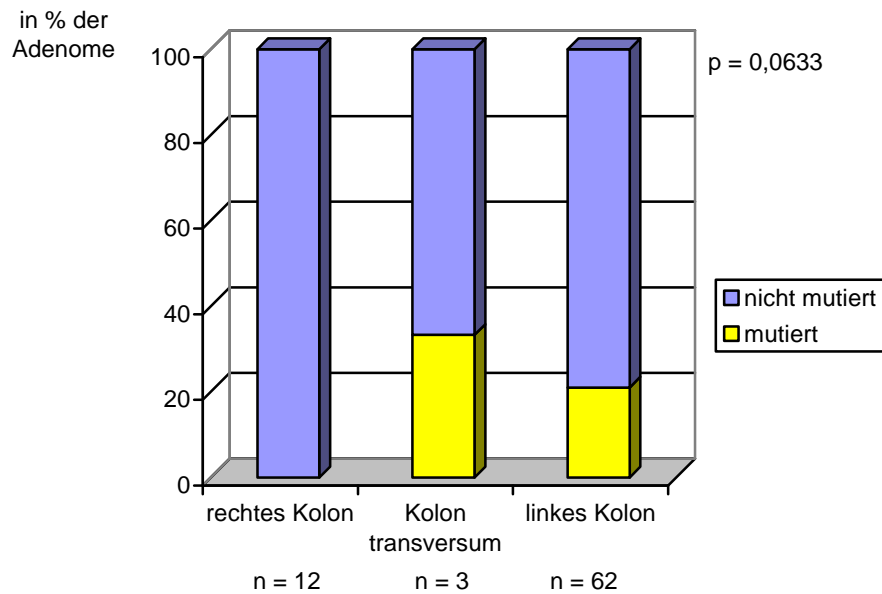


Abbildung 18: p53-Mutationsvorkommen in Abhängigkeit von der Adenomlokalisierung.



Die Korrelation von Adenomen mit und ohne synchrones Kolonkarzinom bezüglich der p53-Mutationshäufigkeit der Adenome und die Rolle, die eine Nähe zu dem vorhandenen Karzinom spielt, wird in Tabelle 11, 12 und Abbildung 19 und 20 dargelegt.

Tabelle 11: p53 Mutationshäufigkeit in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines synchronen Kolonkarzinoms

<i>P53-Mutationen</i>					
Tumorbiologie		Anzahl analysierbarer Proben	Mutationen (n)	Mutationen (%)	p-Wert
Adenome mit synchronem Karzinom	mit	54	8	14,8	0,1920
Adenome ohne synchrones Karzinom	ohne	29	8	27,6	

Tabelle 12: p53-Mutationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Nachbarschaft zu einem synchronen Kolonkarzinom

<i>P53-Mutationen</i>				
Tumorbiologie	Anzahl analysierbarer Proben	Mutationen (n)	Mutationen (%)	p-Wert
*Nachbarschaft zum Karzinom				
low grade				
Fern	10	1	10	0,2482
Nah	9	0	0	
high grade				
Fern	5	0	0	0,1007
Nah	23	6	26,1	

* „fern“: >10 cm entfernt vom Karzinom, „nah“: < 10 cm

Adenome von Patienten mit synchronem Karzinom scheinen sich hinsichtlich Veränderungen am p53-Gen nicht von Adenomen ohne ein solches zu unterscheiden (Abbildung 19). Betrachtet man nur die „Karzinom-Population“, so bestätigen sich die immunhistochemischen Ergebnisse: Bei den „high grade“ Adenomen sind 6 der „nahen“, aber keine der vom Karzinom „fernen“ Adenome mutiert. Dies galt wiederum nicht für die „low grade“ intraepithelialen Neoplasien (Abbildung 20 A, B). Auch hier lies eine sehr geringe Untersuchungszahl aufgrund fehlender Daten keine statistische Signifikanz zu.

Abbildung 19: p53-Mutationsvorkommen der Adenome in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines Karzinoms

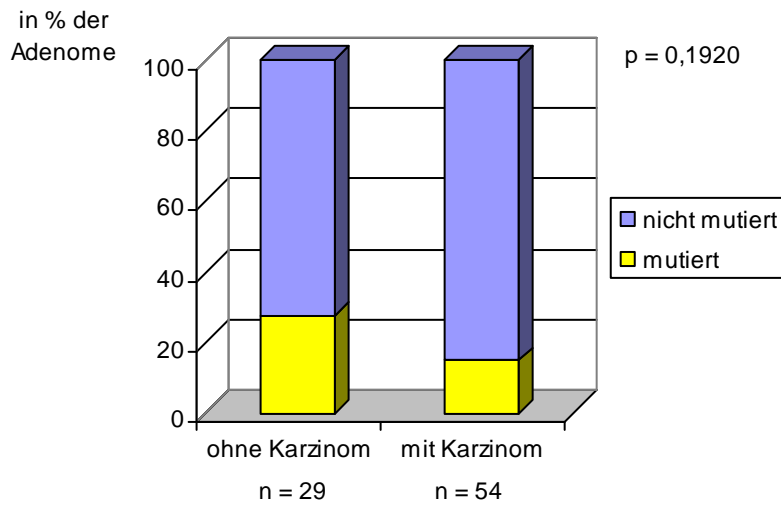
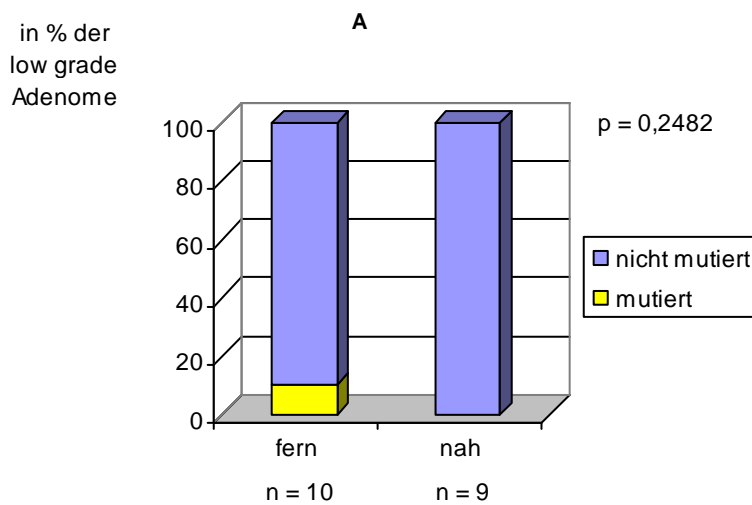
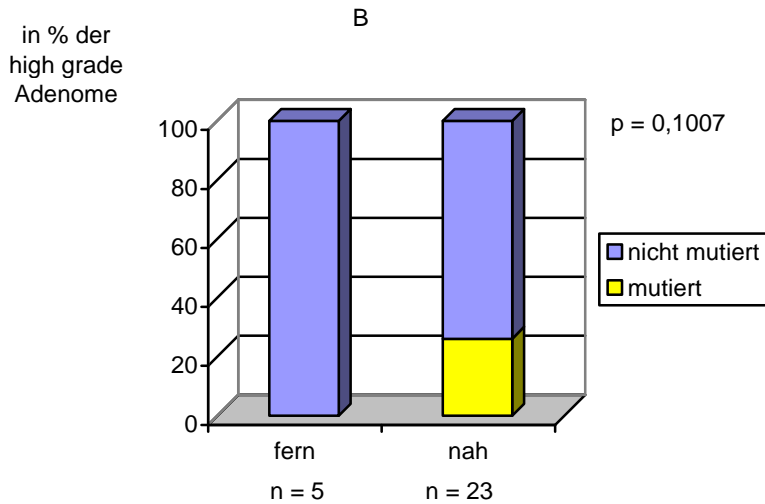


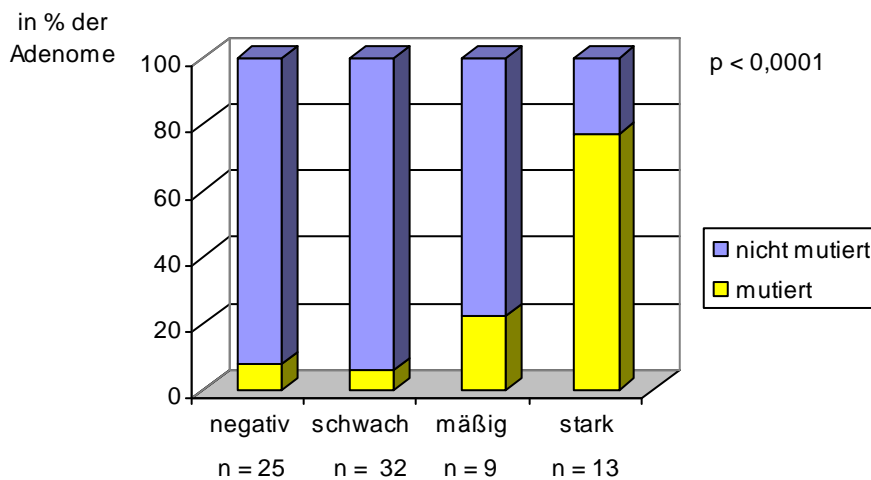
Abbildung 20: Beziehung zwischen der Nachbarschaft zu einem Karzinom und der p53-Mutationshäufigkeit eines Adenoms bei den „low grade“ (A) und „high grade“ Adenomen (B)





Die Übereinstimmung der Resultate beider Untersuchungsmethoden wird in Abbildung 21 illustriert ($p < 0,0001$). Je stärker die Immunhistochemiefärbung, desto häufiger traten Mutationen auf. Dabei ist interessant, dass 2 (8 %) der als negativ kategorisierten Adenome mutiert waren und 3 (23,1 %) der immunhistochemisch stark reaktiven Adenome keine Mutationen aufwiesen.

Abbildung 21: Vergleich der immunhistochemischen p53-Ergebnisse mit der p53-Mutationsanalyse



3. 3 Ki-67 Immunhistochemie der Kolonadenome

Als Marker für das Adenomwachstum wurde Ki-67 verwendet. Der Ki-67 LI konnte bei 187 Adenomen erhoben werden und betrug im Mittel 18,0 („low grade“ Adenome: $14,35 \pm 1,45$; „high grade“ Adenome: $24,23 \pm 1,86$).

Abbildung 22: Beziehung zwischen der Zellproliferation (Ki-67 LI) und der p53-IHC der Adenome. Ki67 LI Mittelwerte: negativ: 13,03; schwach: 21,44; mäßig: 25,5; stark: 35,4.

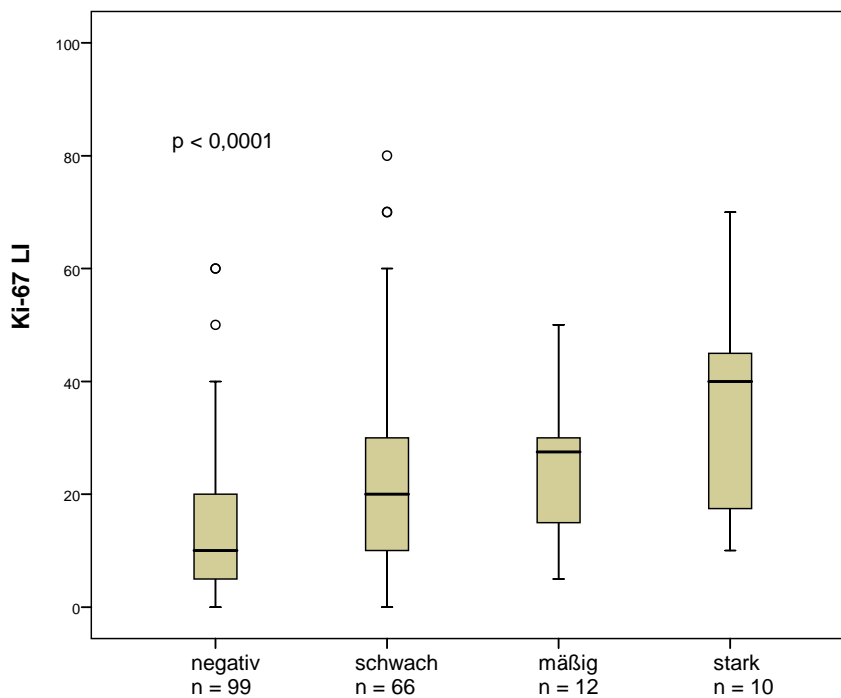


Abbildung 23: Beziehung zwischen der Zellproliferation (Ki-67 LI) und der p53-IHC bei den „low grade“ Adenomen. Ki-67 LI Mittelwerte: p53-negativ: 11,34; p53-positiv: 19,11.

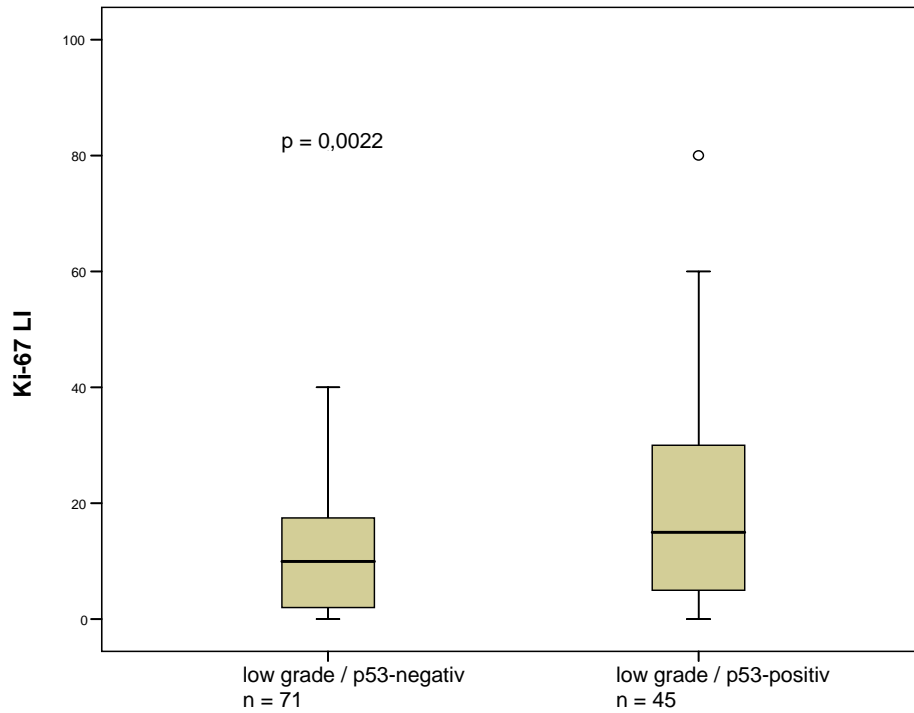


Abbildung 24: Beziehung zwischen der Zellproliferation (KI-67 LI) und der p53-IHC bei den „high grade“ Adenomen. Ki-67 LI Mittelwerte: p53-negativ: 17,33; p53-positiv: 28,72

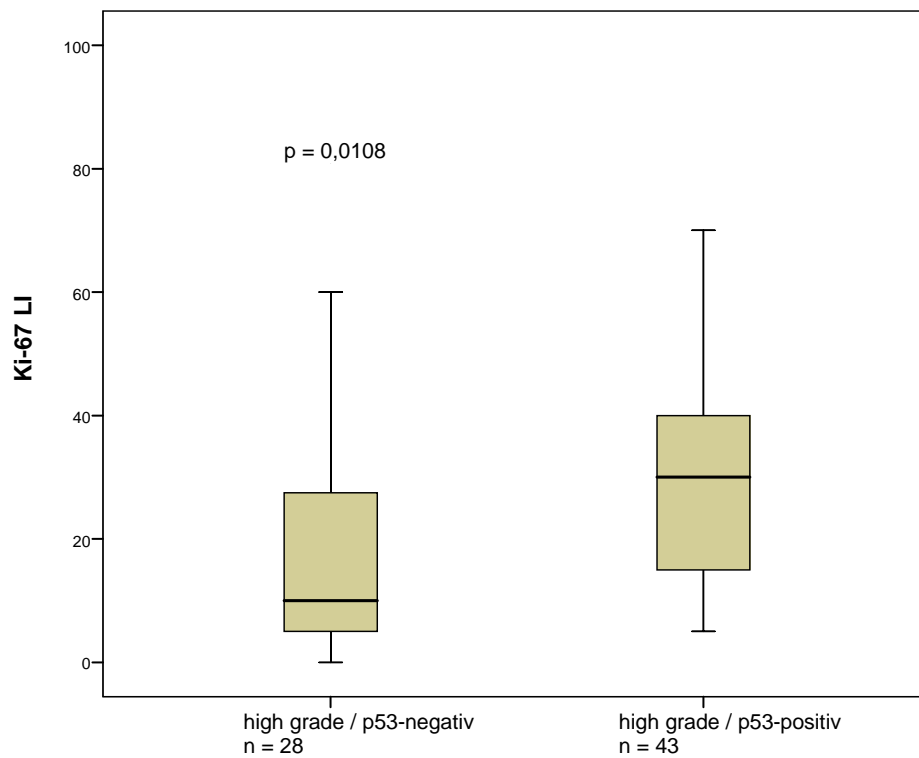
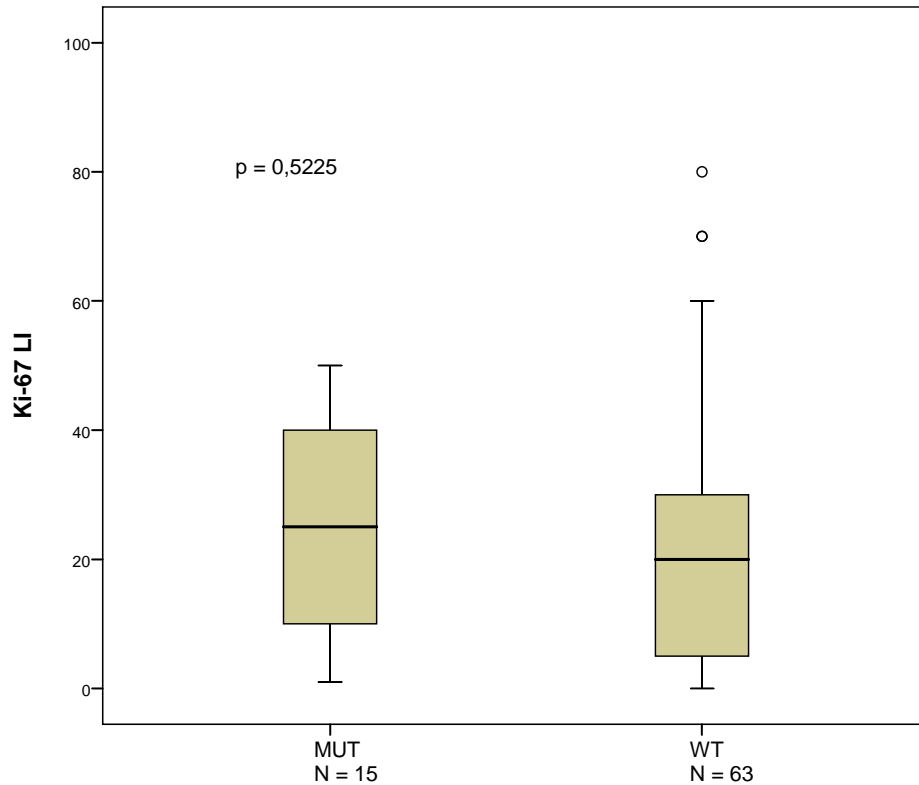


Abbildung 25: Beziehung zwischen der Zellproliferation und der p53 Mutationshäufigkeit. Ki-67 LI Mittelwerte: Mutierte (Mut): 24,73; Wildtyp (WT): 21,32



Die Korrelation von Ki-67 LI mit p53 ist signifikant: Der Ki-67 LI betrug bei den p53-negativen 13,03, den schwach positiven 21,44, den mäßigen 25,5 und den stark positiven Adenomen 35,4 ($p < 0,0001$, Abbildung 22).

Diese Korrelation ergab sich auch dann, wenn „low-“ und „high grade“ Adenome getrennt analysiert wurden (Abbildung 23 und 24).

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse korreliert mit dem Ki-67 LI deuten die selbe Tendenz an mit einem höheren Proliferationsindex bei mutierten im Vergleich zu nicht mutierten Adenomen; dieser Unterschied ist hier jedoch nicht signifikant (Abbildung 25).

4. Diskussion

4. 1 Ergebnisse und methodische Aspekte

4. 1. 1 Nukleare p53-Akkumulation in Kolonadenomen

In der vorliegenden Arbeit wurden 227 sporadische Kolonadenome mittels DNA-Mutationsanalysen und immunhistochemischen Färbungen auf p53-Alterationen untersucht.

Die Ergebnisse bestätigen, dass nicht nur Kolonkarzinome, sondern auch deren Vorstufen p53-Veränderungen aufweisen und dass p53-Alterationen mit anderen biologisch relevanten Parametern assoziiert sind. 47 % der untersuchten Kolonadenome waren immunhistochemisch positiv. Diese Häufigkeiten passen gut zu früheren Studien, die in Kolonadenomen p53-Positivitäten zwischen 3 und 52 % angeben [11, 20, 22, 32, 33, 41-43, 46, 61, 62, 73, 74, 76, 86, 89]. Wesentliche Ursache für Unterschiede zwischen verschiedenen Studien sind unterschiedliche Anteile der untersuchten „low-“ und „high grade“ Adenome. Aber auch hier stimmen vorliegende Daten mit denen aus der internationalen Literatur im Wesentlichen überein: Die p53-Positivität von „high grade“ Adenomen wurde mit 45 bis 75 % (Tabelle 13) angegeben (eigene Daten: 60 %), die von „low grade“ Adenomen mit 4 bis 44 % (Tabelle 13) (eigene Daten: 39 %). Studien, bei denen p53-Befunde für unterschiedliche Anteile an „low-“ und „high grade“ Adenomen angegeben wurden, finden sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Vergleich der Literaturbefunde mit vorliegenden Daten

Autor (Referenz)	Anzahl N	N Low grade	IHC pos	N High grade	IHC pos	Definition pos (cut off)*
Bocuzzi <i>et al.</i> [11]	48	36	47,2%	12	66%	1000-2000**
Einspahr <i>et al.</i> [22]	1093	681	4,5%	204	15,7%	≥30%
Hamana <i>et al.</i> [32]	123	99	9%	24	71%	>0%
Hao <i>et al.</i> [33]	72	56	19,6%	16	50%	>10%
Ieda <i>et al.</i> [40]	139	134	9%	5	42%	>0%
Kaklamanis <i>et al.</i> [41]	72	28	11%	19	52,6%	>0%
Karamitopoulou <i>et al.</i> [42]	91	78	17,8%	13	69,2 %	> 10%
Papatheodoridis <i>et al.</i> [61]	76	32	15,6%	44	64%	>5%
Pignatelli <i>et al.</i> [62]	36	30	33%	6	83%	mind.1000**
Saleh <i>et al.</i> [73]	49	29	28%	20	50%	≥20%
Saleh <i>et al.</i> [74]	56	45	28,9%	11	45,4%	>20%
Sameshima <i>et al.</i> [76]	59	45	15,5%	8	62,5%	k. A
Speroni <i>et al.</i> [89]	100	84	39,2%	16	75%	>10%
Hosaka <i>et al.</i> [39]	68	68	44,1%	68	61,8%	k. A

* cut off : Grenze von positiv gefärbten Tumorzellen, ab der von p35-Positivität gesprochen wurde.

** absolute Anzahl an positiv gefärbten Tumorzellen

k. A: keine Angabe

Die Konkordanz vorliegender Ergebnisse mit denen der Literatur beweist auch die Effizienz und Zuverlässigkeit der TMA-Technik zur Untersuchung von Genexpressionen mit standardisierten Methoden.

Ungeachtet der unterschiedlichen Häufigkeitsangaben für die p53-Positivität kommt in allen Studien eine nukleare p53-Akkumulation bei den „high grade“ Adenomen weit häufiger vor als bei den „low grade“ Adenomen.

Welcher Zusammenhang zwischen p53-Veränderungen, der Morphologie und der Adenomgröße besteht, ist umstritten. Pignatelli *et al.* [62] fanden bei einer Untersuchung von 36 Kolonadenomen keine statistisch signifikante Korrelation einer p53-Anhäufung mit tumormorphologischen Parametern wie Größe und Histologie. Gleiches wird in weiteren Studien behauptet [47, 61, 65, 74, 89]. Zu beachten sind gleichwohl die geringen Fallzahlen (n = 48, n = 123, n = 72, n = 139, n = 91, n = 76, n = 36, n = 56, n = 59, n = 100, Tabelle 13). In einer großen Untersuchung von Einspahr *et al.* [22] an 1093 Kolonadenomen wurde Gegenteiliges beobachtet: 1,8 % der unter 1 cm großen Adenome waren p53-positiv und 14,4 % der mindestens 1 cm großen Neoplasien ($p < 0,0001$). Ferner waren 16,1 % der Adenome mit villöser histologischer Struktur (tubulovillös und villös) p53-positiv angefärbt im Gegensatz zu 3,7 % bei den tubulären Adenomen. Auch in vorliegender Untersuchung war eine p53-Proteinanhäufung mit Tumorphistologie als auch Tumormgröße signifikant assoziiert (Tabelle 6). Mit steigendem Anteil an villöser Adenomhistologie stieg die Häufigkeit der p53-Positivität an.

Da eine p53-Dysfunktion eine Entstehung weiterer Mutationen begünstigt, könnte dieses Ergebnis darauf hinweisen, dass eine p53-Alteration molekulare Ereignisse fördert, die zu einer Änderung der Histologie von tubulär zu villös beitragen. Zu diesem Befund passt die Beobachtung von Samec eines steigenden Malignitätspotenzials, d.h. einer höheren Karzinominzidenz in diesen Adenomen, von 4 % bei tubulären Adenomen über 18 % bei tubulovillösen auf 48 % bei villösen Adenomen. Weitere Studien berichten Ähnliches [12, 88]. Gleiches gilt für die Größe der Adenome, deren „maligne Potenz“ von 0,4 % bei < 10 mm Größe stetig steigt und bei > 40 mm Größe 68 % beträgt [75]. Unsere Daten unterstützen auch Letzteres: Die Korrelation der Adenomgröße mit der p53-Positivität ähnelt den Resultaten der Histologie. Der Unterschied des Atypiegrades aller Adenome über der Adenomgröße ist in dieser Studie hochsignifikant ($p < 0,0001$). Schon in frühen Studien wurde beobachtet, dass Anteile eines invasiven Karzinoms häufiger in großen und villösen Adenomen vorkommen [29, 57, 67]. In vorliegender Studie wurde jedoch erstmals selbiger Zusammenhang mit p53-Veränderungen untersucht und auch getrennt für „low-“ und „high grade“ Adenome analysiert.

Neben der Histologie, Größe und auch Anzahl der Adenome stellt das Patientenalter einen weiteren Parameter für die Entartungswahrscheinlichkeit dar [57]. Die Forschergruppe der National Polyp Study fand ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von „high grade“ „Dysplasien“ heraus, wenn das Patientenalter über 60 Jahren liegt [57]. Dies könnte Ausdruck des zunehmenden Einfluss schädigender Substanzen oder auch von Spontanmutationen und somit genetischer Veränderungen im menschlichen Zellgenom im Alter sein. Bei Adenomen führt dies letztlich zu einer Karzinomentwicklung. Diese Theorie unterstützend ist auch das Auftreten von Kolonadenomen ungefähr 10 Jahre vor dem eines Karzinoms. Die Daten der vorliegenden Studie waren diesbezüglich statistisch nicht signifikant. Trotzdem unterstützen die eigenen Daten diese Beobachtung, insofern, als dass der Anteil an p53-positiven kolorektalen Adenomen bei älteren Menschen höher lag als bei Jüngeren: Die Häufigkeit starker p53-Positivität der Adenome stieg von 3,0 % (< 60 Jährige) über 5 % (> 60 Jährige) auf 20 % (> 80 Jährige) an, bei der Mutationsanalyse ist dieser Unterschied noch eindrücklicher (Abbildung 16).

Die westliche Welt gilt als Hochrisikoregion für Kolonkarzinome, hier kommen diese häufig im linken Kolon vor. Nicht verwunderlich ist, dass auch die meisten Adenome im Rektosigmoid auftreten [29, 57, 100]. In einer Studie wurde das Vorkommen von Adenomen distal der linken Flexur als unabhängiger Faktor für das Auftreten einer hochgradigen Atypie gewertet [44]. Eine Begründung dafür könnte eine längere Stuhlverweildauer in der sogenannten Hochdruckzone (Sigma, Rektum) und dem damit verbundenen größeren Einfluss von Kanzerogenen sein. Die Forscher der National Polyp Study führten dieses Phänomen eher auf die ansteigende Größe und villöse Struktur der Adenome im distalen Kolon als auf die Lokalisation per se zurück. Ein molekularbiologisches Korrelat dieser Beobachtung bieten Ergebnisse von Darmon *et al.* [20]. Sie fanden bei einer Untersuchung von 84 Adenomen in Adenomen des linken Kolons eine höhere immunhistochemische p53-Positivität, als in denen des rechten Kolons.

Dieses Ergebnis können wir mit den eigenen Daten bestätigen. Die p53-Positivität aller Adenome war bei denen im linken Kolon signifikant am höchsten, gefolgt vom Kolon transversum und schliesslich denen im proximalen Kolon ($p = 0,0035$). Interessant ist, dass dieses Verhältnis bei separater Betrachtung der „low-“ und „high grade“ Adenome

bei beiden Gruppen deutlich wird, aber nur bei den „high grade“ Läsionen signifikant ist („high grade“: $p = 0,0020$, „low grade“ $p = 0,0984$, Anhang 7.1). Vermutlich sind die molekularbiologischen Veränderungen, die durch den Einfluss von Kanzerogenen auf distales Kolonepithel veranlasst werden, p53-Alterationen. Es bleibt in Zukunft weiterhin zu untersuchen, welche Gene noch beteiligt sind.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, inwiefern Adenome, die synchron zu einem Karzinom im Darm auftraten, häufiger p53-Veränderungen zeigen. Karamitopoulou *et al.* untersuchten diesen Zusammenhang, in dem sie 91 Adenome in zwei Gruppen aufteilten: Zu der ersten Gruppe zählten 50 Adenome ohne ein synchrones Karzinom im Darm, zur zweiten Gruppe 41 mit einem solchen Karzinom. Sie fanden eine höhere p53-Positivität in Adenomen der Gruppe 2 (53 %) als in Gruppe 1 (40 %). Außerdem waren unter den Adenomen in Gruppe 2 signifikant mehr Adenome mit starker Positivität als in Adenomen der Gruppe 1. Auch Saleh *et al.* [73] fanden in Adenomen, die mit Karzinomen assoziiert vorkamen, eine stärkere p53-Positivität (41 %) als in Adenomen ohne gleichzeitiges Karzinom (30 %). Letztere Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,42$). In einer weiteren publizierten Studie wurden 72 Adenome in gleicher Weise untersucht und eine p53-Positivität in 30 % der Gruppe ohne Karzinom und in 24 % in der Gruppe mit Karzinom gefunden, es bestand keine statistische Signifikanz [41].

In unseren Ergebnissen konnte kein Unterschied in der p53-Positivität von Adenomen ohne und mit gleichzeitig vorhandenen Karzinomen gefunden werden (mit: 53,1 % positiv; ohne: 44,4 % positiv $p = 0,1253$, Abbildung 12). Grund für diese Befunde mag die geringe Fallzahl der Untersuchung dieses Zusammenhangs sein. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Gruppe der „Adenome mit gleichzeitig vorhandenem Karzinom“ in unseren als auch in den publizierten Studien eine undifferenzierte Gruppe ist. Muss ein Adenom eines Patienten, welcher gleichzeitig ein Karzinom beherbergt, anfälliger für p53-Alterationen sein, wenn dieses Adenom nicht in direkter Beziehung zu dem Karzinom steht?

Saleh *et al.* [73] argumentierten, dass Karzinomzellen auf ein dysfunktionales p53-Protein- aufgrund seiner Funktion als Tumorsupressor - hinweisen. Was unterscheidet diese Karzinomzellen von evtl. synchronen Adenomzellen? Bestehen synchrone Adenome, so lautet die Argumentation, könnten diese aufgrund z.B. lokaler Einflüsse/Gegebenheiten ebenso für weitere Mutationen (z.B. im p53-Gen)

empfindlicher sein (als solitäre Adenome ohne Karzinom), so dass diese synchronen Adenome auch zu einer malignen Entartung neigen. Diese Hypothese vorausgesetzt, wirft die Frage auf, ob die gesteigerte Empfänglichkeit für weitere Mutationen von Adenomen auf eine Darmlokalisation beschränkt ist? Sind es globale oder lokale Einflüsse? Um diese Beziehung genauer zu untersuchen, trennten wir die Gruppe der „Adenom mit synchronem Karzinom“ entsprechend ihrer Entfernung zum Karzinom in „ferne“ und „nahe“ Adenome ein und untersuchten sie getrennt für die Kategorien „low“ und „high grade“ auf molekulare p53-Veränderungen hin. Nach eigenen Daten war bei den „high grade“ Adenomen die p53-Positivität höher bei Adenomen, die „nah“ an einem Karzinom auftraten, im Vergleich zu denen, vom Karzinom „fernen“ ($p = 0,0058$). 5 der „nahen“ „high grade“ Adenome waren stark positiv, aber keines der „fernen“. Die „low grade“ Adenome zeigten umgekehrt höhere Positivität bei den „fernen“ Adenomen als bei den „nahen“, allerdings war die immunhistologische Färbung nur sehr schwach und dieses Verhältnis nicht signifikant ($p = 0,0671$). Interessant ist dieses Ergebnis insofern, dass „high grade“ Adenome nicht nur mehr p53 nuklear akkumulieren als „low grade“ Adenome, sondern auch, dass besonders die „high grade“ Adenome, die in direkter Nachbarschaft zum Karzinom stehen, eher p53-Veränderungen aufweisen und somit zu maligner Transformation neigen, wie Saleh *et al.* bereits vermuteten. Höchstwahrscheinlich sind es auch diese, die tatsächlich invasive Karzinomanteile entwickeln. Das Resultat der „low grade“ Adenome zeigt, dass hier erstens selten p53-Mutationen vorkommen und zweitens, nicht diese entartungsgefährdet sind, sondern über die Stufe „high grade“ in Karzinome transformieren, was wiederum das Tumormodell von Vogelstein und Fearon unterstützt.

4. 1. 2 p53-Mutationen der Kolonadenome

In aktueller Studie betrug die Häufigkeit von p53-Mutationen der 83 Adenome annähernd 20 %. Hierbei waren 27 % der „high grade“ Adenome mutiert und 10 % der „low grade“. Auch diese Daten korrelieren mit den bisher wenigen Studien (Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der Literaturbefunde mit vorliegenden Daten

Autor (Referenz)	Anzahl n	low grade n	Mutationen low grade (%)	high grade n	Mutationen high grade n (%)
Baker <i>et al.</i> [6]	25 (6 Mut)	k. A	k. A	k. A	k. A
Hao <i>et al.</i> [34]	70	51	4,8 % leicht- 16,8 % mittlegradig	19	10 (52,6 %)
Ohue <i>et al.</i> [58]	37	37	7 % leicht- 14% mittlegr.	k.A.	k.A.
Kikuchi <i>et al.</i> [45]	43	11	0	32	2 (6,23 %)
Yamaguchi <i>et al.</i> [103]	4(1 Mut)	k. A	k. A	k. A	k. A
Van wyk <i>et al.</i> [96]	59	48	2	11	2

k. A: keine Angabe

Mut: Mutierte

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse entsprechen den immunhistologischen Resultaten. Allerdings erlaubte eine geringe Fallzahl für Mutationen kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Entsprechend der Literatur zeigten sich auch hier häufiger p53-Mutationen bei den „high grade“ als bei „low grade“ Adenomen („high grade“: 12 Mutationen versus „low grade“: 4 Mutationen, Tabelle 10). Ebenso beweisen die Ergebnisse der Korrelation mit Adenomgröße und Histologie, dass die immunhistologischen Resultate häufig auf zugrundeliegende Mutationen zurückzuführen sind. Besonders eindrücklich ist ferner die ansteigende Mutationshäufigkeit der Adenome ab einer Größe von 1 cm. Nach früheren Studien liegt bei dieser Größe auch die kritische Schwelle für das Auftreten von malignen Risikofaktoren: In den S3-Leitlinien „Kolorektales Karzinom“ ist ein Adenom mit einer Größe ab 1 cm gemäß des „Low-/High-Risk-Adenom Konzeptes“ ein „High-Risk-Adenom“.

Entsprechend der Immunhistologie unterschieden sich Adenome von Patienten mit oder ohne synchrones Kolonkarzinom nicht in ihrer Mutationshäufigkeit. Betrachtet man jedoch die Adenome mit synchronem Karzinom separat und analysiert die Rolle der Entfernung zum Karzinom bezüglich p53-Mutationen, so waren Mutationen nur bei den „karzinom-nahen“ „high grade“ Adenomen zu finden, aber keine bei den „fernen“. Die „low grade“ Adenome waren insgesamt seltener mutiert (ein Adenom der „fernen“ war mutiert).

Diese Ergebnisse zeigen nicht nur ein größeres Mutationsvorkommen bei „high grade“ intraepithelialen Neoplasien, sondern liefern auch einen praktischen Hinweis für die erhöhte Entartungswahrscheinlichkeit dieser Läsionen.

4. 1. 3 p53-Immunhistochemie im Vergleich zu Mutationsanalyse

Die Übereinstimmung der Resultate beider angewendeten Untersuchungsmethoden zeigt Abbildung 21. Mutationsanalytische Methoden sind zeit- und kostenaufwendig, deshalb gilt die Immunhistochemie weitgehend als Standardmethode für die Detektion von genetischen p53-Alterationen. Der Hintergrund ist, dass p53-Mutationen im Gen zu einer veränderten Konformation des entsprechenden Proteins führen. Dieses besitzt im Gegensatz zum Wildtyp-Protein eine verlängerte Halbwertszeit (das 20 fache der Zeit), welche es für immunhistochemische Färbemethoden verfügbar macht [25]. So sind p53-positive Immunfärbungen allgemein als starker Hinweis auf das Vorliegen von Mutationen akzeptiert [19, 69]. Trotzdem gibt es geringe Diskrepanzen zwischen p53 Immunhistochemie- und Mutation: 2 der p53-immunhistochemisch negativen Adenome wiesen p53-Mutationen auf, und 3 stark positive Adenome waren nicht mutiert. Ähnliche Resultate wurden auch in früheren Studien schon beschrieben [34, 58] (Tabelle 14, Abbildung 25). Bei Ersterem können Punktmutationen vorliegen, deren Basenaustausch zum Einbau eines Stopcodons und so zu einem verkürzten Protein mit Instabilität und folglich kurzer Halbwertszeit führt (Nonsense-Mutation). Dieses ist in den zwei genannten Proben jedoch nicht der Fall. Es handelt sich um Missense-Mutationen mit Einbau eines kettenverlängernden Codons (Tabelle 9). Denkbar ist hier, eine unzureichend verlängerte Halbwertszeit des mutierten Proteins, so dass immunhistochemische Anfärbbarkeit nicht gewährleistet werden kann [18, 34, 58]. Weiterhin sind Veränderungen der Tertiärstruktur des p53-Proteins möglich, so dass der immunhistochemische Antikörper nicht mehr binden kann. Zusätzlich können Färb- und Fixierungsmethoden die Sensitivität der verschiedenen Antikörper schwächen. Dies

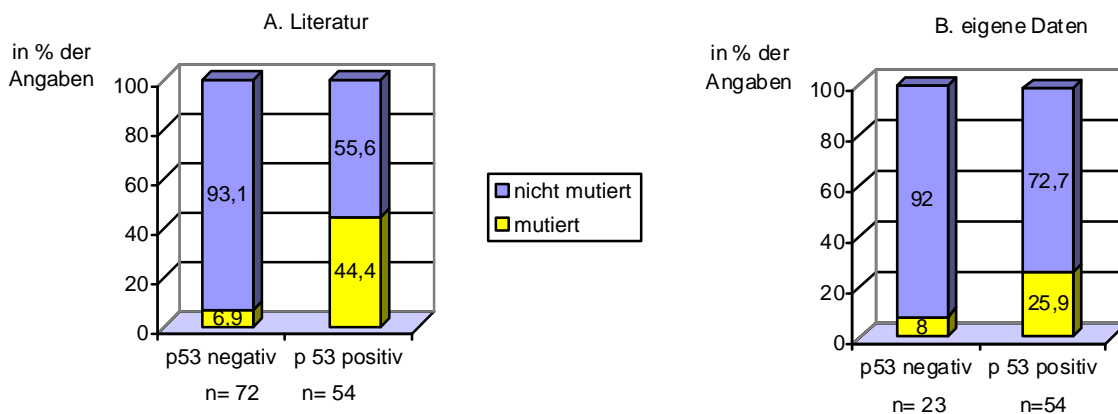
könnte begründen, dass eine Mutation vorliegt, welche nicht mit Immunfärbemethoden erkannt und somit als p53-negativ interpretiert wird. Grund für eine starke p53 Positivität ohne eine vorliegende Mutation könnte sein, dass eine verlängerte Halbwertszeit des Proteins nicht nur Veränderungen auf genetischer Ebene sein müssen, sondern auch auf epigenetischer. In Studien wurden posttranslationale Einflüsse und auch Modulation der p53-Expression durch Viren oder Proteine, wie mdm-2 vorgeschlagen [34]. Auf Genebene wäre eine Deletion eines Allels (LOH) in diesen Adenomen möglich. Das verbleibende gesunde Allel ist oft für eine p53-Funktion ausreichend. (In einer unpublizierten Studie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf werden die Deletionen dieser Adenome untersucht). Dies resultiert in positiven immunhistochemischen Ergebnissen, ohne Auffinden von Mutationen. Ferner schließt das Vorkommen der meisten p53-Mutationen in den Exons 5 bis 8 nicht aus, dass auch Genveränderungen in den nicht analysierten Exons außerhalb der genannten Exons vorkommen.

Tabelle 15: Einige Kolonadenom-Studien mit Daten zu p53-Immunhistochemie (IHC) und p53-Mutationsanalyse (DNA-Sequenzierung)

Autor (Referenz)	Anzahl (n)	p53 IHC positive MUT	p53 IHC pos. WT	p53 IHC neg. MUT	p53 IHC neg. WT	Definition pos (cut off)
Hao <i>et al.</i> [34]	70	13	5	3	49	k.A.
Ohue <i>et al.</i> [58]	37	3	21	1	12	k.A.
Kikuchi <i>et al.</i> [45]	43	1	k.A.	1	k.A.	>0 % pos. Zellen
Baas <i>et al.</i> [4]	19	8	4	1	6	k.A.

k.A: keine Angabe

Abbildung 26: Übereinstimmung der eigenen Daten mit denen der Literatur im Vergleich von p53-IHC mit p53-Mutationen. (Nur Hao *et al.*, Ohue *et al.*, Baas *et al.* sind berücksichtigt).



4. 1. 4 Proliferationsverhalten

Der zur Detektion des Ki-67 Antigens verwendete Klon MIB-1 hat sich in der diagnostischen Histopathologie und Zellbiologie als wertvoll für den Nachweis proliferierender Zellen bewiesen [16, 28, 38]. Charakteristisch für Adenomgewebe ist eine Anfärbung über die basalen Proliferationszonen der intestinalen Krypten hinaus [104]. In vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine p53-Akkumulation positiv mit aggressiverem Proliferationsverhalten einhergeht ($p < 0,0001$). Dieses Phänomen war auch getrennt für die „high grade“ gesteigert und für die „low grade“ Adenome zu beobachten. Auch die mutierten Adenome hatten einen höheren Ki-67 LI als die nicht mutierten. Gleiches wurde in früheren Studien schon belegt [46, 74], wobei die Anzahl der untersuchten Adenome mit $n = 54$ und $n = 39$ deutlich unter unseren lagen. Nicht verwunderlich ist daher, dass bei Kikuchi *et al.* [46] und Vernillo *et al.* [97] ($n = 78$) keine statistische Signifikanz für diesen Zusammenhang erreicht wurde. Ansteigender Ki-67 LI und somit stärkeres Wachstumsverhalten wurde in erstgenannten Studien auch mit fortgeschrittenem Grading der Adenome signifikant assoziiert gefunden.

Mehrere Studien untersuchten Ki-67 als Marker für die Aggressivität von Kolonkarzinomen. Suzuki *et al.* [92] konnten in einer Untersuchung von 58 Karzinomen einen höheren Ki-67 Labeling Index in Dukes B und C Karzinomen beweisen als in Dukes A Karzinomen ($p < 0,01$), jedoch keinen Zusammenhang zur

Lymphinvasion. Keine Assoziation zum Staging sowie Lymphknoten-, als auch Metastasenstatus konnten Benetti *et al.* [8] Lanza *et al.* [51] und Berenzi *et al.* [9] finden (n = 55 und n = 35), ebenso weitere Studien [36, 50].

Trotz der unklaren prognostischen Rolle des Ki-67 Antigens in Kolonkarzinomen, sind in vielen Tumoren Ki-67 positive Zellen mit Tumorprogression und ungünstiger Prognose [31, 54, 70, 95] assoziiert. Ruiz *et al.* [70] und Nocito *et al.* [54] konnten zeigen, dass das Ki-67 Antigen bei ausreichender Studiengröße und mithilfe von Tissue Microarrays (TMA) gut bezüglich Prognoserelevanz bei Kolonkarzinomen untersucht werden kann. Nicht signifikante Ergebnisse früherer Studien können auf intratumorale Heterogenitäten der Ki-67 Anfärbung zurückzuführen sein. Bei Untersuchungen mit geringer Probenzahl kann dies zu uneindeutiger Evaluation führen [70]. In allen Versuchen zeigt sich, dass die immunhistochemische Bestimmung dieses Antigens eine einfache und verlässliche Methode ist um Proliferationsaktivität in Tumoren zu bestimmen. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen werden nötig sein, um die Bedeutung dieses Markers für das Voranschreiten der Kolonkarzinogenese zu bestimmen. Dennoch gibt das vorliegende hochsignifikante Ergebnis der Korrelation von Ki-67 und p53 einen starken Hinweis darauf, dass p53-positive Adenome ein aggressives Proliferationsverhalten aufweisen. Eine Analyse im TMA-Format ist hierfür in besonderem Maße geeignet.

4. 2. Klinische Konsequenz – Schlussfolgerung

Schlussfolgernd ergibt sich aus den gesamten Daten, dass p53-positive Adenome tatsächlich objektivierbar maligner sind als negative, da Erstere mit ungünstigen tumorbiologischen Parametern und starkem Proliferationsverhalten assoziiert sind. Die Konsequenz ist, dass betroffene Personen ein erhebliches Risiko für eine Karzinomentwicklung haben dürften. Diese Patienten mit p53-positiven Adenomen müssen eine gründliche Therapie (komplette Resektion) mit engmaschigen Nachkontrollen erfahren, um wiederkehrende Adenome frühzeitig zu beseitigen und die Entwicklung eines invasiven Karzinoms zu verhindern. Dabei ist die Sorgfältigkeit dieser Maßnahmen durch z.B. eine komplette Koloskopie und vollständige Adenomentfernung besonders wichtig damit Adenomrezidive und Intervallkarzinome aufgrund übersehener Polypen und unvollständig entfernter Gewebsteile vermieden werden [59, 68].

An dieser Stelle sei auch die Interobserver-Variabilität von Pathologen bei der Adenomdiagnostik zu erwähnen. Die Interobserver-Variabilität ist für die Einteilung der ehemals mittelgradigen Adenome in „noch“ low grade oder „schon“ high grade [91] Atypie signifikant.

Um eine größere Sicherheit und Reproduzierbarkeit in der Diagnosestellung zu bekommen, sind anstatt der bisher nur histologischen Kriterien, molekular-biologische Untersuchungen anzustreben. In oben genannten Fällen könnte nach unseren Ergebnissen eine p53-Analyse helfen. Die Wahrscheinlichkeit einer p53-Alteration bei einem „low grade“ Adenom ist nach unseren Daten und denen publizierter Literatur gering. „p53-positiv“ würde demnach bei grenzwertig imponierendem Befund auf ein „high grade“ Adenom hinweisen. So wird eine adäquate Therapie mit weiteren Kontrollen ermöglicht. Eine „p53- negativ“ „low grade“ Diagnose würde den Patienten mit weniger aggressiver Therapie (inkomplette Resektion ev. akzeptabel) und Nachkontrollen nicht unnötig belasten. Molekulare Marker sind nötig, um konsequente und reproduzierbare Diagnosen zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Das Kolonkarzinom ist in der westlichen Welt bei Männern als auch Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Da über 90 % der Kolonkarzinome aus Adenomen entstehen und diese Vorläufer häufig auftreten, hat die Krebsvorsorgeuntersuchung in Form einer Koloskopie mit Adenomabtragung einen hohen Stellenwert. Bei der histologischen Einteilung der Adenome in „low grade“ und „high grade“ existiert eine hohe Interobserver-Variabilität. Vor dem Hintergrund des unterschiedlichen therapeutischen Vorgehens (lokale Polypenabtragung versus Segmentresektion) ergibt sich die Frage, ob molekulare Untersuchungen eine objektive Abschätzung der Aggressivität von Adenomen erlauben könnten.

Alterationen des p53-Tumorsuppressorgens sollen ein spätes Ereignis innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz darstellen. p53-Alterationen kommen daher nicht nur in Karzinomen, sondern auch in Adenomen häufig vor. Theoretisch können diese eine ungünstigere Prognose haben als p53-negative Adenome. Um p53 als Biomarker in der Adenomdiagnostik zu testen, haben wir mittels Tissue-Microarrays (TMA, Gewebechip) 227 Adenome unterschiedlichen Atypiegrades, Größe, Lokalisation, Wachstumsmuster und Nachbarschaft zum Karzinom hinsichtlich ihrer p53-Alterationen immunhistologisch und mutationsanalytisch untersucht. Als weiteren Marker für die Aggressivität untersuchten wir das Ki-67 Proliferationsantigen in Korrelation mit p53.

In dieser Studie korrelierte die immunhistologisch nachweisbare nukleare p53-Akkumulation mit Atypiegrad, Größe, Histomorphologie, Proliferationsrate und Lokalisation der Adenome. „High grade“ Adenome zeigten in 61,1 % (16,7 % 3+), „low grade“ Adenome dagegen in nur 38,8 %, (1 % 3+) p53-Positivität. Große Adenome (> 1 cm) waren signifikant stärker p53-positiv (10,3 %) als solche < 1 cm (1,9 %, $p = 0,0220$). Mit Zunahme des villösen Anteils an der Gesamtfläche des Adenoms stieg ebenfalls die p53-Positivität (2,7 % in tubulären Adenomen, 10,6 % in gemischt tubulovillösen Adenomen, $p = 0,0059$). Die Häufigkeit starker p53-Positivität war in den im linken Kolon lokalisierten Adenomen (8,7 %) signifikant höher als in denen des rechten Kolons (0 %, $p = 0,0035$). Interessanterweise konnte bei „high grade“ Adenomen, die sich in enger Nachbarschaft zu p53-positiven Karzinom befanden, ebenfalls gehäuft eine starke nukleare p53-Akkumulation nachgewiesen werden (20 %

der zum Karzinom „nahen“ 3+) im Unterschied zu den vom Karzinom „fernen“ „high grade“ Adenomen (0 % der „karzinom-fernen“ 3+) (Tabelle 8). Dieses Merkmal war bei „low grade“ Adenomen nicht nachweisbar.

Der Ki-67 Labeling Index (LI) korrelierte stark mit der p53-Positivität der Adenome (Ki-67 LI von 13,0 bei 99 p53-negativen Adenomen, 23,81 bei 88 p53-positiven Adenomen; $p < 0,0001$). „High grade“ Adenome zeigten stets einen höheren Ki67 LI als „low grade“ Adenome: p53-Positivität war sowohl in 116 „low grade“ (Ki-67 LI: 19,1) wie auch in 71 „high grade“ Adenomen (Ki-67 LI: 28,7) signifikant mit dem Ki-67 Proliferationsmarker assoziiert.

Die p53-Mutationsanalyse der Exons 5 bis 8 der aus 83 Adenomen (40 „low grade“, 43 „high grade“) gewonnenen DNA zeigte 16 Mutationen (12 in „high grade“ und 4 in „low grade“ Adenomen; Tabelle 9). Die Ergebnisse der p53-Mutationsanalyse korrelierten mit denen der p53-Immunhistochemie (Abbildung 21, $p < 0,0001$). Von den 54 immunhistologisch p53-positiven Adenomen waren 14 mutiert, von den 25 p53-Negativen waren 2 mutiert. Viele der Ergebnisse sind mit denen der publizierten Literatur vergleichbar. Das zeigt, dass die Verwendung von Tissue-Microarrays zur Untersuchung von molekularen Parametern auf Gewebe sich hervorragend eignet. Von Vorteil ist die Möglichkeit eine große Anzahl von verschiedenen Geweben auf einem einzigen Objektträger mit verschiedenen In-situ-Methoden unter vollständig identischen Laborbedingungen effizient und repräsentativ zu untersuchen.

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass p53- Alterationen mit ungünstigen klinischen und morphologischen Parametern assoziiert sind und sich unserer Meinung nach als potentiell objektiver Parameter für die Einschätzung der „Adenom-Malignität“ eignet. Speziell in (großen) „high grade“ Adenomen haben sich p53- Schädigungen gezeigt. Als klinische Konsequenz kann aufgrund dieser Ergebnisse eine p53-Analyse in Adenomen erfolgen um in schwierigen Fällen „high grade“ von „low grade“ zu unterscheiden. p53-positive Adenome sind demnach eher als „high grade“ zu werten und unbedingt im Gesunden zu entfernen sowie engmaschige Nachkontrollen sind zu empfehlen. Hier wäre bei entsprechender Größe eine Segmentresektion anzuraten, da bereits ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung besteht. p53-negative Adenome sind dagegen eher „low grade“ und eine Abtragung mit Nachkontrolle ausreichend. Molekulare Marker können so zukünftig in der Selektion von risikoreichen, malignen Adenomen und für eine objektive Diagnostik in der Beurteilung von Kolon-Präkanzerosen von signifikantem Nutzen sein.

6. Literatur

- [1] Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338: 1481-1487.
- [2] Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Racz I, Dite P, Hajer J, Zavoral M, Lechuga MJ, Gerletti P, Tang J, Rosenstein RB, Macdonald K, Bhadra P, Fowler R, Wittes J, Zauber AG, Solomon SD, Levin B (2006) Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 355: 885-895.
- [3] Archer MC, Bruce WR, Chan CC, Corpet DE, Medline A, Roncucci L, Stamp D, Zhang XM (1992) Aberrant crypt foci and microadenoma as markers for colon cancer. *Environ Health Perspect* 98: 195-197.
- [4] Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR (1994) An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 172: 5-12.
- [5] Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221.
- [6] Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50: 7717-7722.
- [7] Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER (1999) Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 340: 101-107.
- [8] Benetti A, Berenzi A, Grigolato P (1992) Growth fraction of colorectal carcinoma (Ki67): a comparative study. *Int J Biol Markers* 7: 93-96.
- [9] Berenzi A, Benetti A, Bertalot G, Rodolfi A, Portolani N, Giulini SM, Pulcini G, Vinco A, Tiberio G (1992) Ki67 immunohistochemical evaluation in colorectal cancer and normal colonic mucosa. Possible clinical applications. *Pathologica* 84: 155-163.
- [10] Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, Tang J, Rosenstein RB, Wittes J, Corle D, Hess TM, Woloj GM, Boissarie F, Anderson WF, Viner JL, Bagheri D, Burn J, Chung DC, Dewar T, Foley TR, Hoffman N, Macrae F, Pruitt RE, Saltzman JR, Salzberg B, Sylwestrowicz T, Gordon GB, Hawk ET (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 355: 873-884.

- [11] Boccuzzi A, Terzolo M, Leonardo E, Cappia S, Tappero G, Paccotti P, Angeli A (1995) High frequency of p53 expression in colo-rectal adenomatous polyps. *Anticancer Res* 15: 1407-1410.
- [12] Bond JH (1995) Follow-up after polypectomy: consensus? *Eur J Cancer* 31A: 1141-1144.
- [13] Brown LJ, Smeeton NC, Dixon MF (1985) Assessment of dysplasia in colorectal adenomas: an observer variation and morphometric study. *J Clin Pathol* 38: 174-179.
- [14] Burlefingher R, Ottenjann R (1991) [Colorectal cancer--diagnosis, early detection and staging]. *Internist (Berl)* 32: 321-329.
- [15] Caspari R, Friedl W, Mandl M, Moslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G, et al. (1994) Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 343: 629-632.
- [16] Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168: 357-363.
- [17] Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY (2005) Genetic alteration of p53, but not overexpression of intratumoral p53 protein, or serum p53 antibody is a prognostic factor in sporadic colorectal adenocarcinoma. *Int J Oncol* 26: 65-75.
- [18] Colomer A, Erill N, Verdu M, Roman R, Vidal A, Cordon-Cardo C, Puig X (2003) Lack of p53 nuclear immunostaining is not indicative of absence of TP53 gene mutations in colorectal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11: 130-137.
- [19] Cunningham J, Lust JA, Schaid DJ, Bren GD, Carpenter HA, Rizza E, Kovach JS, Thibodeau SN (1992) Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 52: 1974-1980.
- [20] Darmon E, Cleary KR, Wargovich MJ (1994) Immunohistochemical analysis of p53 overexpression in human colonic tumors. *Cancer Detect Prev* 18: 187-195.
- [21] Demers RY, Neale AV, Budev H, Schade WJ (1990) Pathologist agreement in the interpretation of colorectal polyps. *Am J Gastroenterol* 85: 417-421.
- [22] Einspahr JG, Martinez ME, Jiang R, Hsu CH, Rashid A, Bhattacharya AK, Ahnen DJ, Jacobs ET, Houlihan PS, Webb CR, Alberts DS, Hamilton SR (2006) Associations of Ki-ras proto-oncogene mutation and p53 gene overexpression in sporadic colorectal adenomas with demographic and clinicopathologic characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1443-1450.
- [23] Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

- [24] Fenger C, Bak M, Kronborg O, Svanholm H (1990) Observer reproducibility in grading dysplasia in colorectal adenomas: comparison between two different grading systems. *J Clin Pathol* 43: 320-324.
- [25] Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8: 531-539.
- [26] Friedl W, Caspari R, Propping P (1994) [Diagnosis of familial adenomatosis polyposis]. *Dtsch Med Wochenschr* 119: 27-30.
- [27] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133: 1710-1715.
- [28] Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G (1992) Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168: 85-86.
- [29] Gillespie PE, Chambers TJ, Chan KW, Doronzo F, Morson BC, Williams CB (1979) Colonic adenomas--a colonoscopy survey. *Gut* 20: 240-245.
- [30] Giovannucci E (2001) An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 725-731.
- [31] Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Rybski JA, Rangel CS, Richter LC, Miller TP (1988) Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 71: 1157-1160.
- [32] Hamana T, Kawai K, Serizawa A, Tsutsumi Y, Watanabe K (1994) Immunohistochemical demonstration of p53 protein in colorectal adenomas and adenocarcinomas. Reliable application of the heat-induced antigen retrieval method to formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Pathol Int* 44: 765-770.
- [33] Hao XP, Gunther T, Roessner A, Price AB, Talbot IC (1998) Expression of mdm2 and p53 in epithelial neoplasms of the colorectum. *Mol Pathol* 51: 26-29.
- [34] Hao XP, Frayling IM, Sgouros JG, Du MQ, Willcocks TC, Talbot IC, Tomlinson IP (2002) The spectrum of p53 mutations in colorectal adenomas differs from that in colorectal carcinomas. *Gut* 50: 834-839.
- [35] Harris AL (1990) Mutant p53--the commonest genetic abnormality in human cancer? *J Pathol* 162: 5-6.
- [36] Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, LeRiche J (1992) Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 51: 147-152.
- [37] Herskowitz I (1987) Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 329: 219-222.

- [38] Holt PR, Moss SF, Kapetanakis AM, Petrotos A, Wang S (1997) Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 131-135.
- [39] Hosaka S, Aoki Y, Akamatsu T, Nakamura N, Hosaka N, Kiyosawa K (2002) Detection of genetic alterations in the p53 suppressor gene and the K-ras oncogene among different grades of dysplasia in patients with colorectal adenomas. *Cancer* 94: 219-227.
- [40] Ieda S, Watatani M, Yoshida T, Kuroda K, Inui H, Yasutomi M (1996) Immunohistochemical analysis of p53 and ras p21 expression in colorectal adenomas and early carcinomas. *Surg Today* 26: 230-235.
- [41] Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Baigrie RJ, Heryet A, Lane DP, Harris AL (1993) p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 142: 87-93.
- [42] Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Vogt U, Wegmann W (1995) p53 protein expression in colorectal adenomas: an immunohistochemical study using an antigen retrieval system. *Histopathology* 27: 517-523.
- [43] Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T (1992) Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* 97: 244-249.
- [44] Khatibzadeh N, Ziaee SA, Rahbar N, Molanie S, Arefian L, Fanaie SA (2005) The indirect role of site distribution in high-grade dysplasia in adenomatous colorectal polyps. *J Cancer Res Ther* 1: 204-207.
- [45] Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, Iino H, Fukayama M, Koike M, Mori T, et al. (1992) Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52: 3965-3971.
- [46] Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT (1997) Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 431: 111-117.
- [47] Kim YW, Lee S, Park JH, Yoon TY, Park YK, Yang MH (1995) An immunohistochemical study of the expression of p53 protein in colon cancer. *J Korean Med Sci* 10: 176-182.
- [48] Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823.
- [49] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847.
- [50] Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW (1992) Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer* 70: 2602-2609.

- [51] Lanza G, Jr., Cavazzini L, Borghi L, Ferretti S, Buccoliero F, Rubbini M (1990) Immunohistochemical assessment of growth fractions in colorectal adenocarcinomas with monoclonal antibody Ki-67. Relation to clinical and pathological variables. *Pathol Res Pract* 186: 608-618.
- [52] Levine JS, Ahnen DJ (2006) Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med* 355: 2551-2557.
- [53] Nagy R, Sweet K, Eng C (2004) Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23: 6445-6470.
- [54] Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194: 349-357.
- [55] Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E (2002) Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 98: 241-256.
- [56] O'Brien BL, DiPalma JA (1995) Molecular biology and colorectal cancer: genetic alterations, inherited syndromes, and applications to colon cancer screening. *Dig Dis* 13: 182-189.
- [57] O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, Dickersin GR, Ewing S, Geller S, Kasimian D, et al. (1990) The National Polyp Study. Patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 98: 371-379.
- [58] Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, Yana I, Ohnishi T, Enomoto T, Inoue M, et al. (1994) A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res* 54: 4798-4804.
- [59] Pabby A, Schoen RE, Weissfeld JL, Burt R, Kikendall JW, Lance P, Shike M, Lanza E, Schatzkin A (2005) Analysis of colorectal cancer occurrence during surveillance colonoscopy in the dietary Polyp Prevention Trial. *Gastrointest Endosc* 61: 385-391.
- [60] Pandrea IV, Mihailovici MS, Carasevici E, Szekely AM, Reynes M, Tarcoveanu E, Dragomir C (1995) An immunohistochemical study of P53 protein on colorectal carcinomas. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 99: 171-178.
- [61] Papatheodoridis GV, Kapranos N, Tzouvala M, Triantafyllou K, Elemenoglou I, Karamanolis DG (1998) p53 and bcl-2 protein expression in rectosigmoid adenomas. *Am J Gastroenterol* 93: 1136-1140.
- [62] Pignatelli M, Stamp GW, Kafiri G, Lane D, Bodmer WF (1992) Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in colorectal adenomas. *Int J Cancer* 50: 683-688.

- [63] Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI (1997) Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg* 132: 371-374; discussion 374-375.
- [64] Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341.
- [65] Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC (1991) p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138: 807-813.
- [66] Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Sunga A, Fakhri M, Alberts DS, Marshall JR (2006) Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer* 118: 1777-1781.
- [67] Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC, Frasca JM (1979) Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer* 43: 1847-1857.
- [68] Robertson DJ, Greenberg ER, Beach M, Sandler RS, Ahnen D, Haile RW, Burke CA, Snover DC, Bresalier RS, McKeown-Eyssen G, Mandel JS, Bond JH, Van Stolk RU, Summers RW, Rothstein R, Church TR, Cole BF, Byers T, Mott L, Baron JA (2005) Colorectal cancer in patients under close colonoscopic surveillance. *Gastroenterology* 129: 34-41.
- [69] Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP (1990) p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7555-7559.
- [70] Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118: 2190-2194.
- [71] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- [72] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- [73] Saleh HA, Aburashed A, Bober P, Tabaczka P (1998) P53 protein immunohistochemical expression in colonic adenomas with and without associated carcinoma. *Am J Gastroenterol* 93: 980-984.
- [74] Saleh HA, Jackson H, Banerjee M (2000) Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins: correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8: 175-182.

- [75] Samec HJ (1988) [Colorectal cancer. Precancerous conditions]. *Wien Med Wochenschr* 138: 285-287.
- [76] Sameshima S, Kubota Y, Sawada T, Watanabe T, Kuroda T, Tsuno N, Higuchi Y, Shinozaki M, Sunouchi K, Masaki T, Saito Y, Muto T (1996) Overexpression of p53 protein and histologic grades of dysplasia in colorectal adenomas. *Dis Colon Rectum* 39: 562-567.
- [77] Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 348: 883-890.
- [78] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- [79] Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H (1998) Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 82: 60-69.
- [80] Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M (2000) Diagnostic criteria for gastrointestinal carcinomas in Japan and Western countries: proposal for a new classification system of gastrointestinal epithelial neoplasia. *J Gastroenterol Hepatol* 15 Suppl: G49-57.
- [81] Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Flejou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H (2000) The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 47: 251-255.
- [82] Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M (2001) Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists. *J Gastroenterol* 36: 445-456.
- [83] Schmiegel W PC, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rödel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmit W, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK (2008) S 3 Leitlinie "Kolorektales Karzinom". *Z Gastroenterol* 46: 1-73.
- [84] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-1975.
- [85] Seifert E (1988) [Colorectal carcinoma--diagnostic requirements from the clinical point of view]. *Rontgenblätter* 41: 176-179.
- [86] Sheikh RA, Min BH, Yasmeeen S, Teplitz R, Tesluk H, Ruebner BH, Tobi M, Hatfield J, Fligel S, Lawson MJ (2003) Correlation of Ki-67, p53, and Adnab-9

- immunohistochemical staining and ploidy with clinical and histopathologic features of severely dysplastic colorectal adenomas. *Dig Dis Sci* 48: 223-229.
- [87] Shike M, Winawer SJ, Greenwald PH, Bloch A, Hill MJ, Swaroop SV (1990) Primary prevention of colorectal cancer. The WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ* 68: 377-385.
- [88] Shinya H, Wolff WI (1979) Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg* 190: 679-683.
- [89] Speroni AH, Vanzulli SI, Meiss RP (1998) Adenomas of the colon: overexpression of p53 protein and risk factors. *Endoscopy* 30: 623-626.
- [90] Stevens T, Burke CA (2003) Colonoscopy screening in the elderly: when to stop? *Am J Gastroenterol* 98: 1881-1885.
- [91] Sugai T, Habano W, Uesugi N, Jiao YF, Nakamura S, Sato K, Chiba T, Ishii M (2002) Molecular validation of the modified Vienna classification of colorectal tumors. *J Mol Diagn* 4: 191-200.
- [92] Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M (1992) Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 15: 317-320.
- [93] Terry MB, Neugut AI (1998) Cigarette smoking and the colorectal adenoma-carcinoma sequence: a hypothesis to explain the paradox. *Am J Epidemiol* 147: 903-910.
- [94] Tiemersma EW, Wark PA, Ocke MC, Bunschoten A, Otten MH, Kok FJ, Kampman E (2003) Alcohol consumption, alcohol dehydrogenase 3 polymorphism, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 419-425.
- [95] Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY (1991) Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* 19: 545-550.
- [96] van Wyk R, Slezak P, Hayes VM, Buys CH, Kotze MJ, de Jong G, Rubio C, Dolk A, Jaramillo E, Koizumi K, Grobbelaar JJ (2000) Somatic mutations of the APC, KRAS, and TP53 genes in nonpolypoid colorectal adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 202-208.
- [97] Vernillo R, Lorenzi B, Banducci T, Minacci C, Vindigni C, Lucenti Fei A, Lorenzi M (2008) Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in colorectal adenomas and prediction of malignancy and development of new polyps. *Int J Biol Markers* 23: 89-95.
- [98] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532.
- [99] Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X (2004) Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23: 2330-2338.

- [100] Winawer SJ, O'Brien MJ, Waye JD, Kronborg O, Bond J, Fruhmorgen P, Sobin LH, Burt R, Zauber A, Morson B (1990) Risk and surveillance of individuals with colorectal polyps. Who Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ* 68: 789-795.
- [101] Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF, et al. (1993) Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 329: 1977-1981.
- [102] Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Bond JH, Waye JD, Schapiro M, Panish JF, et al. (1996) Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 334: 82-87.
- [103] Yamaguchi K, Sugano K, Fukayama N, Nakashima Y, Saotome K, Yokoyama T, Yokota T, Ohkura H (1997) Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol* 92: 307-312.
- [104] Yang HB, Hsu PI, Chan SH, Lee JC, Shin JS, Chow NH (1996) Growth kinetics of colorectal adenoma-carcinoma sequence: an immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 27: 1071-1076.
- [105] Yoon H, Benamouzig R, Little J, Francois-Collange M, Tome D (2000) Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *Eur J Cancer Prev* 9: 151-164.

7. Anhang

7.1 Ergebnisse der p53-Immunhistochemie in Korrelation zu Tumorklinik in Abhängigkeit vom Grading

<i>P53-Immunhistochemie</i>				
Histologie	Anzahl analysierbarer Proben	p53-negativ	p53-positiv	p-Wert
low grade				
tubulär	60	73,3	26,7	0,0105
tubulovillös	55	49,1	50,9	
villös	1	0,0	100,0	
high grade				
tubulär	15	46,7	53,3	0,4946
tubulovillös	49	32,7	67,4	
villös	6	50,0	50,0	

<i>P53-Immunhistochemie</i>				
Größe	Anzahl analysierbarer Proben	p53-negativ	p53-positiv	p-Wert
low grade				
< 1cm	45	77,8	22,2	0,0056
1-2 cm	52	48,1	51,9	
> 2cm	11	45,5	54,6	
high grade				
< 1cm	9	33,3	66,7	0,5986
1-2 cm	35	32,4	68,6	
> 2cm	25	44,0	56,0	

P53-Immunhistochemie

Lokalisation	Anzahl analysierbarer Proben	p53-negativ	p53-positiv	p-Wert
low grade				
Rechtes Kolon	16	75,0	25,0	0,0984
Kolon transversum	7	85,7	14,3	
Linkes Kolon	80	55,0	45,0	
high grade				
Rechtes Kolon	18	72,2	27,8	0,0020
Kolon transversum	5	60,0	40,0	
Linkes Kolon	46	26,1	73,9	

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater und Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Prof. Dr. med. G. Sauter bedanken. Ich möchte mich für die Unterstützung, die intensive wissenschaftliche Betreuung und die Bemühung bei der Planung und Fertigstellung dieser Arbeit herzlich bedanken. Großer Dank.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer OA Dr. A. H. Marx für die freundliche Unterstützung und Engagement. Vielen Dank für konstruktive Ideen für die Studie.

Außerdem ein großer Dank an Dr. rer. nat. R. Simon für die freundliche Unterstützung und Offenheit für Fragen bei der statistischen Ausarbeitung meiner Ergebnisse.

Ein großer Dank geht auch an das Laborteam für das Engagement und die Unterstützung, besonders auch an Martina Mirlacher für die freundliche Bereitstellung des Materials.

Ganz speziell möchte ich mich an dieser Stelle bei Agata Blaszczyk und Gabi Riek aus dem Sequenzierservice bedanken für die Anleitung, die Bemühung und Fürsorge beim Vermitteln von Laborfertigkeiten.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. med. W. Niedermeyer für seine über viele Jahre kontinuierliche Hilfsbereitschaft und anregende Diskussionen. Durch ihn habe ich gelernt die Medizin aus den verschiedensten Perspektiven zu sehen. Vielen Dank!

Außerdem möchte ich mich bei allen, besonders bei Elisa und Irina, bedanken, die mich durch Anregungen und mit viel Herz, Offenheit und Hilfsbereitschaft durch die Arbeit begleitet haben und zu mehr als nur Kommilitonen geworden sind.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter Margaret Oelsner und meinem Onkel Ellis Richmond, die mein wissenschaftliches Interesse durch konstruktive Gespräche stets gefördert haben. Ich danke für die Fürsorge und den Beistand während meiner gesamten Studiumszeit.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Roselyne Oelsner
geboren in Hamburg

SCHULAUSBILDUNG:

2000-2003 Gymnasium Klosterschule
06/2003 Abiturabschlussprüfung, Schwerpunkt: Biologie,
Chemie
1994-2000 Gesamtschule Wilhelmsburg
1990-1994 Grundschule Eckerkoppel

HOCHSCHULAUSBILDUNG:

2003-dato Universität Hamburg, Humanmedizinstudium
08/2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 02/2009 Praktisches Jahr
11/2008-12/2008 Famulatur Unfallchirurgische Notaufnahme,
Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus,
Hamburg
4/2008-5/2008 Famulatur Innere Medizin, AK St. Georg
Hamburg
8/2006-9/2006 Famulatur Thorax-,Viszeral- und Gefäßchirurgie,
Marienkrankenhaus Hamburg
7/2006-8/ 2006 Famulatur Allgemeinmedizin Arztpraxis,
Hamburg

PROMOTIONSARBEIT:

Seit 01/2007 Beginn der Dissertation „p53-Alterationen in
Kolonadenomen- Beziehung zu Zellproliferation
und Klinik“ Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Hamburg, 30.07.2009

Roselyne Oelsner

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: R.Oelsner